

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Régulations traductionnelles lors de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC)

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline Biologie, médecine et santé

Spécialité Biologie cellulaire

Présentée

et soutenue publiquement par

COLMAN Hélène

Le 7 Avril 2010, devant le jury ci-dessous

- Président*** M. Jacques Le Pendu, Directeur de Recherche INSERM, IRT1 Nantes
- Rapporteurs*** M. Michel Ventura, Chargé de Recherche CNRS, Université de Bordeaux II
Mme Anne-Marie Roque-Afonso, MCU-PH, Hopital Paul Brousse, Villejuif
- Examineurs*** Mme Berthe-Marie Imbert, PU-PH, Faculté de pharmacie de Nantes
M. Dimitri Lavillette, Chargé de Recherche CNRS, ENS de Lyon
- Directeur de thèse*** M. Cyrille Féray, PU-PH, CHU de Nantes.

Table des matières

INTRODUCTION	15
I. Généralités sur le virus de l'hépatite C	17
1) Historique de la découverte du virus	17
2) Classification du virus	17
3) Particule virale	17
4) Génome viral et variabilité du virus.....	18
4.1. Organisation du génome du VHC.....	18
4.2. Variabilité du VHC	19
5) Epidémiologie	19
6) Physiopathologie	21
7) Diagnostic et traitement	22
7.1. Diagnostic	22
7.2. Traitement.....	23
8) Tropisme cellulaire	24
II. Le cycle viral	25
1) Entrée du virus.....	26
2) Traduction	28
3) Maturation de la polyprotéine virale	29
4) Les protéines du virus.....	30
4.1. Protéines structurales.....	30
4.1.1. Protéine de capsid.....	30
4.1.2. Protéines d'enveloppe E1 et E2.....	30
4.1.3. Protéine F.....	31
4.2. Protéines non-structurales.....	31
4.2.1. La protéine P7	31
4.2.2. La protéine NS2 (protéase)	31
4.2.3. Protéines NS3 et NS4A (protéase et hélicase).....	32
4.2.4. La protéine NS4B	32
4.2.5. La protéine NS5A	32
4.2.6. La protéine NS5B (ARN polymérase ARN-dépendante).....	33

5) Réplication.....	33
5.1. Le complexe de réplication	33
5.2. La région 3'NC.....	34
5.3. Réplication.....	36
5.4. Régulation de la réplication du VHC.....	37
6) Assemblage des particules virales	37
7) Modèles d'étude du VHC	38
7.1. Modèles d'étude cellulaires.....	38
7.2. Modèles animaux	40
III. La traduction IRES-dépendante du VHC	42
1) Mécanismes d'initiation de la traduction	42
1.1. Traduction coiffe-dépendante.....	42
1.2. Traduction IRES-dépendante	44
1.2.1. Les IRES viraux.....	44
1.2.2. IRES cellulaires	45
2) La traduction IRES-dépendante du VHC.....	45
2.1. Structure de l'IRES du VHC.....	45
2.2. La traduction IRES-dépendante du VHC.....	48
3) Régulation de la traduction IRES-dépendante du VHC.....	50
3.1. Régulation de l'initiation de la traduction par des facteurs agissant en cis : les séquences virales	50
3.1.1. Rôle de la région 3'NC dans l'initiation de la traduction	50
3.1.2. Séquence de la capsid.....	51
3.2. Régulation de l'initiation de la traduction par des facteurs agissant en <i>trans</i>	52
3.2.1. Régulation de l'initiation de la traduction par des protéines virales.....	52
3.2.1.1. Protéine de capsid	52
3.2.1.2. Protéines non-structurales	52
3.2.1.3. Stimulation indirecte de la traduction IRES-dépendante	53
3.2.2. Régulation de l'initiation de la traduction par des protéines cellulaires : les ITAFs	53
3.3. Régulation de la traduction IRES-dépendante lors du cycle cellulaire	55
3.4. Régulation de la transition entre traduction et réplication	55

4) Implications de la variabilité de la séquence de l'IRES	56
4.1. Variabilité et compartimentation de l'IRES	56
4.1.1. Variabilité de l'IRES du VHC.....	56
4.1.2. Compartimentation des variants IRES.....	57
4.2. Implications cliniques de la variabilité de l'IRES	58
4.2.1. Traduction IRES-dépendante du VHC et interféron	58
4.2.2. Variabilité de l'IRES et interféron.....	59

IV. Interactions entre le VHC et la cellule hôte 60

1) Interactions entre le VHC et la réponse immunitaire de l'hôte	60
1.1. Perturbation de la réponse interféron.....	60
1.2. Réponse immunitaire adaptative.....	62
1.3. Essais de vaccins	64
2) Interaction des protéines virales avec les voies cellulaires.....	65
2.1. Interactions avec les voies de l'apoptose	66
2.1.1. Modulation de l'apoptose induite par les récepteurs de mort cellulaire	67
2.1.2. Modulation de l'apoptose induite par la voie mitochondriale	67
2.1.3. Perturbation de l'apoptose induite par la protéine P53.....	67
2.1.4. Autres mécanismes de modulation de l'apoptose par NS5A.....	68
2.2. Régulation du cycle cellulaire et de la croissance cellulaire par NS5A.....	68
2.3. Interaction de la protéine de capsid avec la mitochondrie	69
2.4. Rôle possible de la protéine de capsid dans la stéatose et la carcinogénèse	70
2.5. Régulation de la transcription de l'hôte.....	70
3) MicroARN et VHC	71
3.1. Les microARN.....	71
3.2. MicroARN et virus.....	74
3.2.1. MicroARN codés par les virus	74
3.2.2. MicroARN comme mécanisme de défense antiviral	74
3.2.3. ARN interférence lors de l'infection par le VHC.....	75
3.2.4. Utilisation de microARN cellulaires par le VHC.....	75
3.2.5. Modulation des microARN cellulaires par le VHC.....	76

MATERIEL ET METHODES 81

I. Etude de l'activité traductionnelle des variants IRES du VHC 82

1) Patients et prélèvements	82
2) Constructions plasmidiques	82
2.1. PCR.....	83
2.2. Purification des produits PCR	85
2.3. Digestions Enzymatiques.....	85
2.4. Clonage des séquences 3'NC	86
2.5. Obtention des plasmides monocistroniques.....	86
2.6. Ligations.....	87
2.7. Transformations	87
3) Transcription d'ARN in vitro.....	88
4) Transfections des constructions dans les cellules	90
4.1. Cultures cellulaires	90
4.2. Transfections.....	90
4.2.1. Transfection de siRNA.....	91
4.2.2. Lecture luciférase	91
5) Analyses des ARN transfectés.....	92
5.1. Extractions d'ARN des cellules transfectées.....	92
5.2. Quantification des ARN totaux ou clivés par les ribozymes.....	93
5.2.1. Rétrotranscription	93
5.2.2. PCR quantitatives.....	93

II. Etude des interactions ITAFs-IRES par couplage covalent aux UV..... 96

1) Extraction et dialyse de protéines	96
2) Transcription d'ARN marqués au P32.....	96
3) Couplage covalent (UV cross-link)	97

III. Etude du transcriptome et du traductome des cellules infectées par la souche JFH1..... 99

1) Préparation des échantillons	99
1.1. Infection des cellules.....	99
1.2. Principe du fractionnement polysomique	99

1.3. Traitement des cellules à la cycloheximide et lyse.....	100
1.4. Fractionnements polysomiques	101
1.5. Extraction au Trizol LS des ARN des fractions collectées.....	101
1.6. Vérification et pool des ARN extraits	102
2) Hybridation des puces Agilent.....	103
2.1. Marquage des ARN.....	104
2.1.1. Rétrotranscription des ARN en ADNc.....	104
2.1.2. Transcription	104
2.2. Hybridation.....	105
3) Analyse des données des puces	106
4) Western blot	108
4.1. Extraction des protéines totales	108
4.2. Dosage des protéines extraites	108

RESULTATS 111

I. Etude de la régulation traductionnelle de l'IRES du VHC112

1) Travaux antérieurs de l'équipe : compartimentation traductionnelle du VHC.....	112
2) Contrôles de l'existence d'un promoteur interne dans l'IRES du VHC.....	113
2.1. Modèle d'étude utilisé : plasmide bicistronique	113
2.2. Existence d'un promoteur interne dans l'IRES du VHC.....	115
2.3. Contrôle n°1 : siRNA anti F-luciférase	116
2.4. Contrôle n°2 : Transfection d'ARN transcrit in vitro.....	118
3) Recherche des protéines cellulaires (ITAFs) conditionnant le tropisme cellulaire de l'IRES.	119
4) Recherche d'un modèle pour l'étude du rôle de la 3'NC dans la traduction IRES-dépendante du VHC.....	122
4.1. Comparaison des modèles plasmidiques bi- et mono-cistroniques	123
4.2. Utilisation de ribozymes	125
4.2.1. Détermination du taux de clivage du ribozyme	126
4.2.2. Etude du rôle de la 3'NC dans des constructions avec un ribozyme	128
4.2.3. Introduction d'un ribozyme avant l'IRES.....	129

4.3. Etude du rôle de la région 3'NC dans la traduction avec un modèle ARN.....	132
5) Etude de la variabilité de la région 3'NC.....	133

II. Etude de la régulation traductionnelle des gènes cellulaires lors de l'infection par la souche JFH-1.....135

1) Description de l'étude	136
1.1. JFH-1	136
1.2. Profils polysomes obtenus	137
2) Analyse générale des puces à ADNc	138
2.1. Normalisation des puces	139
2.2. Clustering général.....	140
3) Interprétation des puces sous l'angle de la transcription, de la traduction et de l'expression	142
3.1. Principe des 3 niveaux d'interprétation : transcription, traduction, expression	142
3.2. Nombre de gènes régulés pour chaque niveau d'interprétation.....	142
4) Analyse de la transcription.....	144
5) Analyse des fractions polysomiques (ARN traduits).....	145
6) Analyse du ratio traductionnel.....	147
6.1. Catégories fonctionnelles régulées au niveau de la traduction	149
6.2. Recherche de motifs communs aux gènes régulés pour leur traduction	150
6.2.1. Motifs IRES ou 5'TOP.....	150
6.2.2. Analyse des longueurs des régions 5'NC et 3'NC des gènes régulés	150
6.2.3. Analyse des cibles potentielles des microARN.....	151
7) Etude de quelques protéines cellulaires.....	152
7.1. Etude des facteurs d'initiation de la traduction	152
7.2. Etude de quelques protéines d'intérêt	153

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 155

I. Régulation traductionnelle de l'IRES du VHC156

1) Modèles pour l'étude de l'action de la région 3'NC sur la traduction IRES-dépendante du VHC.....	156
1.1. Plasmides monocistroniques	156
1.2. Utilisation d'une séquence ribozyme autocatalytique pour obtenir une région 3'NC avec une fin exacte.....	157
1.3. Utilisation d'ARN monocistroniques transcrits in vitro pour l'étude de l'effet de la région 3'NC sur la traduction IRES-dépendante du VHC.....	158
1.4. Autres modèles d'étude de l'IRES.....	159
2) Etude de l'influence de la variabilité de la séquence 3'NC sur la traduction IRES-dépendante	160

II. Régulation traductionnelle des gènes cellulaires lors de l'infection ...163

1) Analyse du transcriptome	163
2) Analyse des régulations traductionnelles.....	165
3) Analyse de quelques facteurs d'initiation de la traduction	166
4) Rôle des microARN dans la régulation traductionnelle.....	167
5) Le modèle d'étude JFH1	168

ANNEXES 170

BIBLIOGRAPHIE 186

Liste des abréviations utilisées

aa	Acide aminé
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
ARE	AU-rich element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
BSA	bovine serum albumin, albumin de sérum bovin
Cdk	Cycline-dependant kinase
Cpm	coups par minute, mesure de la radioactivité
CT	cycle threshold, cycle seuil
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium, milieu Eagle modifié de Dulbecco
Dnase	Déoxyribonucléase
dNTP	désoxyribonucléotides
DO	densité optique
DTT	dithiothreitol
EDTA	acide éthylène diamine tetra acétique
eIF	Eukaryotic initiation factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ffu	Fluorescent focus assay, unité formant un foyer
Fluc	Firefly luciférase
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosine triphosphate
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
hnRNP	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HRP	Horse Radish Peroxidase
HVR	Hypervariable region

IRES	Internal Ribosome Entry Site, site d'entrée interne du ribosome
ISG	Interferon Stimulated Genes, gènes dont la transcription est stimulée par l'interféron
ITAF	IRES Trans Acting Factor
JFH1	Japanese Fulminante Hepatitis 1
kDa	kilo Dalton
La	Lupus autoantigen
LDL	Low density lipoprotein
MES	acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
miR	microRNA, microARN
MOI	Multiplicity of infection, ratio du nombre de particule virales sur le nombre de cellules cibles
NC	Non codant
nt	nucléotide
NTP	Nucléotides tri-phosphates
PABP	poly(A)-binding protein
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
Pb	Paire de bases
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell, cellule mononucléée du sang (lymphocytes, monocytes et macrophages)
PBS	Phosphate buffered saline, tampon phosphate salin
PCR	polymerase chain reaction, réaction de polymérase en chaîne
PEG	polyéthylène glycol
Pi	Phosphate inorganique
PKR	Protéine kinase R ou Eukarotic initiation factor 2 α kinase 2
PMSF	phenylmethylsulphonyl fluoride
PTB	polypyrimidine tract-binding protein
RE	Réticulum endoplasmique
RISC	RNA-induced silencing complex
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer, tampon de lyse pour extraction des protéines totales, utilisé à l'origine pour les expériences de radio-immuno-précipitation
Rluc	Renilla luciférase

Rpm	round per minute, tours par minute
SDS	Dodécylsulfate de sodium
siRNA	silencing RNA, ARN interférent
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS/TBST	Tris Buffered saline / Tris Buffered saline Triton
Tm	melting temperature, température d'hybridation
UV	Ultra-violets
VEMC	Virus de l'encéphalomyocardite
VHC	Virus de l'hépatite C

Liste des tableaux et figures

- Figure 1** : Représentation de la particule virale
- Figure 2** : Représentation schématique du génome du VHC
- Figure 3** : prévalence de l'infection par le VHC dans le monde
- Figure 4** : Représentation schématique du cycle viral du VHC
- Figure 5** : Représentation du mécanisme de binding du VHC à la cellule
- Figure 6** : Structure de la région 5' non-codante
- Figure 7** : Maturation de la polyprotéine du VHC
- Figure 8** : Représentation de la structure de la région 3' non-codante du VHC
- Figure 9** : Représentation schématique des réplicons sub-génomiques et complets
- Figure 10** : Mécanisme d'initiation coiffe-dépendant de la traduction
- Figure 11** : Structure de l'IRES du VHC
- Figure 12** : Mécanisme d'initiation de la traduction par l'IRES du VHC
- Figure 13** : Représentation de la structure de l'IRES avec les sites de fixation des éléments intervenant dans l'initiation de la traduction
- Figure 14** : Action des protéines virales sur la réponse interféron
- Figure 15** : Réponse immunitaire de l'hôte et perturbation par le VHC
- Figure 16** : Résumé des principales voies de l'apoptose
- Figure 17** : Maturation et mode d'action des microARN
- Figure 18** : Représentation du plasmide PIRF
- Figure 19** : Principe du fractionnement polysomique de cellules traitées par la cycloheximide
- Figure 20** : Efficacités traductionnelles (ratio R/F) de 19 IRES dans les cellules Huh7 et RAJI
- Figure 21** : Principe du modèle d'étude plasmidique bicistronique PIRF
- Figure 22** : Conséquences de l'existence d'un promoteur interne dans la séquence de l'IRES sur la mesure du ratio R/F
- Figure 23** : Effet du silencing de la luciférase F sur les activités F et R luciférase de différents IRES
- Figure 24** : Transfection d'ARN bicistroniques transcrits in vitro dans les cellules Huh7 et RAJI
- Figure 25** : Expériences de cross-link de différents IRES avec des extraits protéiques de lignées Huh7, RAJI, ou de biopsie hépatique

Figure 26 : Comparaison des profils cross-link des variants IRES plasmatiques et lymphocytaires avec des protéines de la lignée lymphocytaire RAJI

Figure 27 : Transfections de plasmides bicistroniques ou monocistroniques avec ou sans région 3'non-codante H77

Figure 28 : Principe de l'insertion d'une séquence ribozyme après la région 3'non-codante

Figure 29 : Position des amorces utilisées pour la quantification des ARN totaux et clivés au niveau du ribozyme

Figure 30 : Calcul du pourcentage de formes ARN non clivées au niveau du ribozyme

Figure 31 : Transfection de plasmides bicistroniques ou monocistroniques avec 3'non-codante H77 suivie d'un ribozyme

Figure 32 : Calcul du pourcentage de formes ARN non clivées au niveau du ribozyme situé avant l'IRES

Figure 33 : Transfection de plasmides bicistroniques ou monocistroniques comportant une séquence ribozyme avant l'IRES dans des cellules Huh7

Figure 34 : Transfection d'ARN monocistroniques avec ou sans région 3'non-codante H77, dans des cellules Huh7

Figure 35 : Transfections de plasmides bicistroniques ou monocistroniques et d'ARN monocistroniques, comportant la région 3'non-codante H77 ou con1

Figure 36 : Tracés de la DO 254 nm obtenus lors de la récupération des différentes fractions polysomiques

Figure 37 : Statistiques descriptives (Box-plots) des résultats de puces avant et après normalisation (Lowess)

Figure 38 : Clustering des données brutes de puces d'expression

Figure 39 : Diagrammes de Venn représentant le nombre de gènes statistiquement régulés lors de l'infection, pour chaque niveau d'interprétation

Figure 40 : Clustering des gènes significativement régulés au niveau de l'ARN total (transcriptome), avec les principales catégories fonctionnelles représentées dans chaque cluster

Figure 41 : Clustering des gènes significativement régulés au niveau de l'ARN polysomique (expression), avec les principales catégories fonctionnelles représentées dans chaque cluster

Figure 42 ; Représentation des principales catégories fonctionnelles significativement régulées au niveau de la transcription et de l'expression.

Figure 43 : Clustering des gènes significativement régulés au niveau du taux de traduction (ratio T/NT), avec les principales catégories fonctionnelles représentées dans chaque cluster

Figure 44 : Représentation des principales catégories fonctionnelles significativement régulées au niveau de la traduction (ratio T/NT)

Figure 45 : Détection par Western Blots des formes totales et phosphorylées des facteurs d'initiation de la traduction eIF2 α et eIF4E

Figure 46 : Détection par Western Blots des protéines La, JUN, GAPDH et β -actine

Tableau I : Caractéristiques des patients

Tableau II : liste des amorces utilisées pour le clonage

Tableau III : Liste des constructions plasmidiques dérivées du PIRF réalisées

Tableau IV : Liste des amorces utilisées pour amplifier les matrices des transcriptions in vitro

Tableau V : Liste des amorces utilisées pour les PCR quantitatives

Tableau VI : Liste des anticorps primaires utilisés pour les Western blots

Tableau VII : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les Western blots

Introduction

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un problème majeur de santé publique. En effet, 3 % de la population mondiale sont chroniquement infectés par ce virus, il n'existe pas de vaccin et le traitement actuel n'est efficace que chez 50 % des patients. L'infection chronique par le VHC peut entraîner le développement d'une cirrhose, et dans certains cas, la survenue d'un carcinome hépatocellulaire. Le virus pourrait avoir un rôle direct dans la carcinogénèse hépatique.

La traduction de l'ARN du VHC est initiée par un site d'entrée interne du ribosome, l'IRES. Cette région est cruciale pour le cycle viral et sa séquence est la plus conservée du génome entre les différents géotypes viraux. Son activité dépend de la séquence nucléotidique de l'IRES et elle est régulée par des protéines, virales et cellulaires. Comprendre la régulation de la traduction du virus permettrait d'avoir de nouvelles pistes thérapeutiques. En effet, le traitement actuel, combinant l'interféron et la ribavirine, n'est efficace que chez environ la moitié des patients. La recherche de nouvelles thérapies ciblées spécifiquement contre des protéines virales est limitée par la forte variabilité naturelle du virus, qui entraîne la sélection de mutants d'échappement. Le ciblage de régions du génome fonctionnellement importantes et conservées, ou des voies cellulaires dont se sert le virus, sont donc des pistes de recherche prometteuses pour de futurs traitements.

Le premier objectif de mon travail a été d'étudier les facteurs modulant l'efficacité traductionnelle de l'IRES, sous l'angle de la variabilité naturelle de cette région.

Mon deuxième objectif a été de comprendre les modifications traductionnelles des gènes cellulaires lors de l'infection par le VHC, car celles-ci n'ont jamais été étudiées. La régulation traductionnelle de la cellule pourrait avoir un rôle dans l'expression du génome viral et dans la pathogénie du VHC. On sait maintenant que la régulation de la traduction cellulaire joue un rôle important dans la pathogénie de certaines maladies, en particulier les cancers.

L'introduction abordera rapidement les généralités concernant le VHC et son cycle viral, avant de s'attarder un peu plus longuement sur la traduction IRES-dépendante du virus et sur les interactions existant entre le virus et la cellule infectée, qui sont les thématiques de mon travail de thèse.

I. Généralités sur le virus de l'hépatite C

1) Historique de la découverte du virus

En 1975, Feinstone découvre que certains patients atteints d'une hépatite ne présentent d'anticorps ni contre le virus de l'hépatite A, ni contre le virus de l'hépatite B (Feinstone et al., 1975). Ces agents responsables d'hépatites ont été nommés hépatites non-A non-B (NANBH). Il a été montré qu'au moins un de ces agents est transmissible au Chimpanzé, et celui-ci est resté longtemps le seul modèle d'étude de cette maladie. Le génome du VHC a finalement été caractérisé par Choo en 1989, après avoir été cloné (Choo et al., 1989). L'agent causal des Hépatites NANB prit alors le nom de virus de l'hépatite C. Le VHC a donc été caractérisé par des techniques de biologie moléculaire, sans que la particule virale n'ait été isolée. Il fut ensuite démontré que le VHC était le principal agent responsable des Hépatites NANB.

2) Classification du virus

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*. Malgré l'existence d'homologies de séquence avec les autres membres de cette famille, le VHC présente des propriétés biologiques relativement différentes, qui l'ont conduit à être classé dans un genre dont il est l'unique représentant, le genre *Hepacivirus*. Les *Flaviviridae* comprennent également les genres *Flavivirus* (virus de la dengue et de la fièvre jaune), et *Pestivirus* (virus animaux, dont la Peste porcine classique et la diarrhée virale bovine), ainsi que les virus GB-A et GB-B (responsables d'hépatites chez les tamarins), non classés, qui sont les plus proches du VHC au niveau de la séquence (Miller and Purcell, 1990).

3) Particule virale

Le VHC est un virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre, difficilement visualisable en microscopie électronique. L'ARN viral est contenu dans une capsidie protéique icosaédrique, entouré d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées les protéines d'enveloppe virales E1 et E2 (Figure 1).

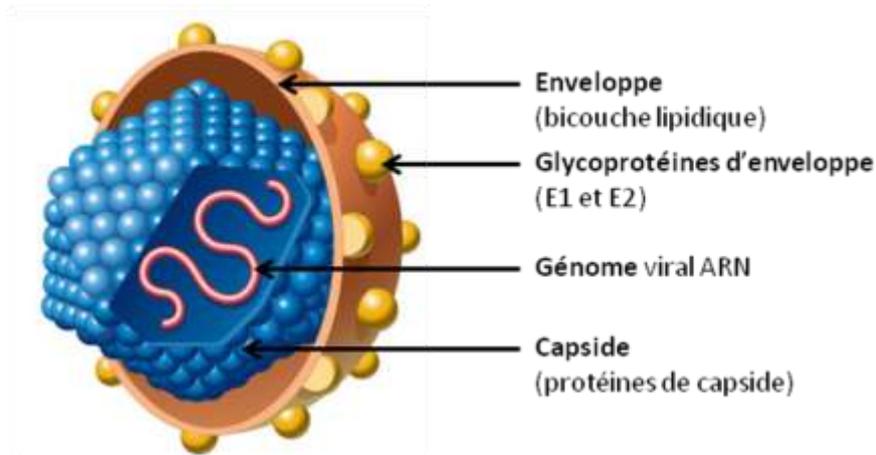


Figure 1 : Représentation de la particule virale (dessin de James A. Perkins)

4) Génome viral et variabilité du virus

4.1. Organisation du génome du VHC

Le génome du VHC est un ARN simple brin d'environ 9700 nucléotides (nt), de polarité positive (il sert directement de matrice pour la synthèse protéique) (Choo et al., 1991). Cet ARN comporte un cadre ouvert de lecture, flanqué par une région non-traduite à chaque extrémité, cette organisation génomique est conservée parmi les *Flaviviridae*. Le cadre ouvert de lecture est traduit en une seule polyprotéine qui est ensuite clivée en au moins 10 protéines virales, structurales (constituant la particule virale) et non structurales (servant principalement à la réplication du virus) (Figure 2). Il existe un cadre de lecture alternatif au niveau de la séquence codant pour la capsidie, qui permet la production d'une autre protéine virale, la protéine F, traduite grâce à un glissement du ribosome.

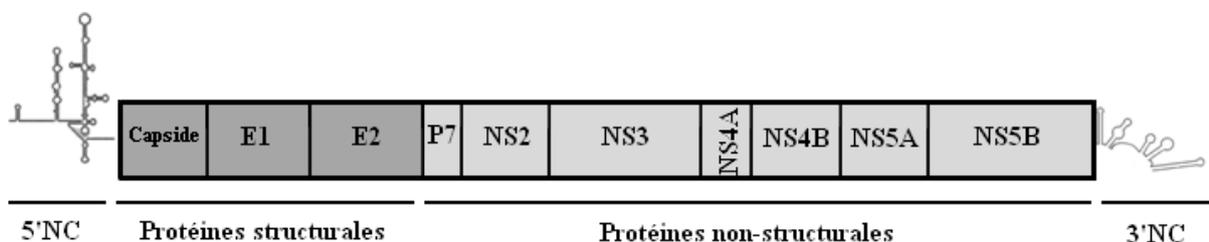


Figure 2 : Représentation schématique du génome du VHC

Les régions 5' et 3' non-codantes sont représentées avec leurs structures secondaires. Les régions codant pour les différentes protéines virales, structurales et non structurales, sont indiquées.

4.2. Variabilité du VHC

Le génome du VHC présente une grande variabilité génétique, en raison de l'absence de propriété de relecture/correction de son ARN polymérase ARN dépendante. Cependant, le taux de mutation varie suivant les différentes régions du génome du VHC, parmi lesquelles les régions 5'NC et 3'NC sont les plus conservées (Choo et al., 1991). Cela signifie qu'elles sont fonctionnellement importantes dans le cycle viral.

Les différentes souches du VHC sont classées en 6 génotypes (Simmonds et al., 2005), les souches d'un même génotype présentant environ 70% d'homologie de séquence. Chaque génotype comporte de nombreux sous-types, au sein desquels l'homologie de séquence est d'au moins 80 % (les sous-types sont identifiés par des lettres). Les génotypes 1 à 3 sont les plus répandus mondialement, alors que les génotypes 4, 5 et 6 se rencontrent surtout en Afrique et en Asie.

Le VHC présente également une variabilité intra-individuelle. En effet, chez un individu infecté il est présent sous forme d'un mélange de souches quasiment homologues, appelées quasiespèce (les souches d'une quasiespèce ont au moins 90% d'homologie de séquence). Cela correspond à une évolution du virus en réponse à la pression immunitaire de l'hôte.

5) Epidémiologie

3 % de la population mondiale sont infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C (VHC), soit environ 180 millions de personnes. La prévalence varie entre 0,1 et 5% selon les pays (Figure 3), les pays les plus touchés étant les pays d'Afrique et d'Asie.



Figure 3 : Prévalence de l'infection par le VHC dans le monde
(Site Ontario Hepatitis Treatment)

Dans les pays industrialisés, l'hépatite C est responsable de 70 % des cas d'hépatites chroniques, de 40% des cas de cirrhoses en stade terminal, de 60% des cas de carcinome hépatocellulaire et de 30% des transplantations hépatiques. En France, chaque année, environ 3500 morts sont attribuées au VHC (Marcellin, 2009).

La transmission du virus de l'hépatite C se fait par voie sanguine, principalement par transfusions (avant 1992 et le contrôle systématique des dons de sang), partage de seringues entre toxicomanes, et utilisation de matériel médical mal désinfecté.

6) Physiopathologie

La phase aiguë de la maladie survient après 7 semaines d'incubation en moyenne (2 à 12 semaines). Si cette phase passe le plus souvent inaperçue, elle peut dans certains cas se traduire par de la fatigue, des nausées, une douleur dans la région de l'hypochondre droit, un léger ictère et des urines foncées.

L'ARN viral est détectable dans le sang dès la 2^{ème} semaine, puis une élévation des transaminases peut être décelée (2 à 4 semaines après l'infection), accompagnée éventuellement des symptômes décrits ci-dessus.

L'infection devient chronique dans 80% des cas. La virémie persiste alors et la fibrose hépatique progresse, pouvant mener à la cirrhose (20 % des hépatites chroniques (Alberti and Benvegna, 2003)) et la stéatose, puis parfois à un carcinome hépatocellulaire, dans 5 à 10 % des cas. La stéatose, conséquence de l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes, est plus souvent observée chez les patients infectés chroniquement par du VHC de génotype 3.

L'hépatite chronique est souvent découverte fortuitement, ou seulement au moment où des symptômes liés à l'insuffisance hépatite apparaissent (ascite, hypertension portale).

L'infection par le VHC entraîne également souvent des manifestations extra-hépatiques, la plus fréquente étant la cryoglobulinémie mixte. Les cryoglobulines sont des immunoglobulines dirigées contre d'autres immunoglobulines que l'on trouve dans le sérum et qui précipitent de façon réversible à basse température. Il s'agit de complexes immuns circulants pouvant entraîner des vascularites se traduisant par des symptômes dermatologiques, nerveux, rénaux ou articulaires (Zignego and Craxi, 2008).

D'autres désordres auto-immuns sont rapportés, bien qu'il soit probable que d'autres facteurs que le VHC interviennent dans leur développement : thyroïdite de Hashimoto et syndrome de Sjögren (atteinte des glandes lacrymales et salivaires).

Plus rarement, l'infection par le VHC est associée à un ulcère cornéen ou à du lichen plat (affection dermatologique), ayant également une origine auto-immune.

L'infection par le VHC a également été reliée à l'apparition de lymphomes non-Hodgkinien chez certains patients, ces lymphomes peuvent régresser suite à l'élimination thérapeutique du virus, suggérant un rôle du VHC dans la prolifération de ces lymphocytes (Kelaidi et al., 2004).

Des hépatites fulminantes, très rares, ont également été rapportées, et le seul cas bien documenté a conduit à la découverte de la souche JFH1 (Kato et al., 2001).

7) Diagnostic et traitement

7.1. Diagnostic

Le diagnostic se fait par recherche des anticorps dirigés contre des protéines virales par un test ELISA de 3^{ème} génération (NS3, NS4, NS5 ou la protéine de capsid), présentant une sensibilité de 99 % (Rao et al., 2009). L'infection par le VHC comporte une fenêtre sérologique assez longue, de 2 à 3 mois, qui est l'intervalle de temps entre l'infection et la détection d'anticorps dirigés contre le virus. Il existe un test de détection de la capsid virale circulante qui n'offre pas d'avantage, en termes de diagnostic, sur la détection de la virémie par RT-PCR. Un nouveau test combinant la détection d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid et celle de la protéine de capsid elle-même (test combiné antigène-anticorps), permet la réduction de la fenêtre sérologique de plusieurs semaines.

La détermination du génotype de la souche infectante est importante pour le traitement. Le génotypage peut être réalisé de manière indirecte, par la détection d'anticorps dirigés contre différents épitopes de la protéine NS4 (Gault et al., 2003), cette technique permet la détection des 6 sérotypes, mais non de distinguer les sous-types. De manière beaucoup plus fréquente, le génotype est déterminé à partir de l'ARN viral, par hybridation avec des sondes spécifiques du génotype (sur bandelettes), ou par séquençage direct de la région NS5B, qui est la méthode de référence. La première méthode permet de détecter des co-infections par des génotypes différents.

La quantification de l'ARN viral est un test essentiel. Le système utilisant des sondes moléculaires branchées (hybridation de l'ARN viral avec des séquences complémentaires d'ADN couplées à des sondes ramifiées pouvant se fixer à des molécules de phosphatase alcaline, permettant la production de luminescence à partir d'un substrat) a fait place à la quantification par RT-PCR en temps réel, plus sensible. La quantification de l'ARN viral est importante pour le suivi de la virémie afin d'évaluer la réponse au traitement (Chevaliez and Pawlotsky, 2007). Ainsi le taux de guérison est de 90 % quand la virémie est négative à la 4^{ème} semaine et lorsque le traitement peut être donné sur une durée suffisante (24 ou 48 semaines).

Enfin, en dehors du diagnostic virologique, la biopsie hépatique est un outil majeur permettant de réellement indiquer ou non le traitement. Elle est réalisée pour connaître

l'étendue de la fibrose hépatique ainsi que l'activité inflammatoire. Des tests sanguins et l'élastométrie (mesure de l'élasticité hépatique grâce à des ultrasons), moins invasifs, permettent de prédire la fibrose hépatique.

7.2. Traitement

Le traitement existant depuis une dizaine d'années associe l'interféron α pégylé (la pégylation prolonge sa demi-vie dans l'organisme) et la ribavirine (analogue nucléosidique). Cette bithérapie permet la guérison d'environ 50 % des patients. Ce pourcentage diminue avec l'âge (élevé), la charge virale, le degré de fibrose, l'existence d'une immunosuppression, d'un diabète ou d'une consommation d'alcool associés et bien sûr du génotype du VHC. Les génotypes 2 et 3 peuvent être éliminés chez plus de 80% des patients, alors que les patients infectés avec les génotypes 1 ou 4 ne sont guéris que dans moins de 50% des cas (Manns et al., 2006). Par ailleurs, ces traitements sont mal tolérés, et de longue durée (de 24 à 72 semaines). De nouvelles molécules apparaissent depuis une dizaine d'années (Lamarre et al., 2003). Ces molécules sont essentiellement des inhibiteurs de protéase virale (Télaprévir et boceprevir), actuellement en phase 3 de développement et pourraient éliminer le virus, en association avec le traitement classique IFN + ribavirine, chez 60 à 70% des patients infectés avec le génotype 1, au lieu de 40% dans le groupe traité par bithérapie conventionnelle. D'autres molécules inhibant la polymérase NS5B sont en cours de développement. Enfin, les molécules inhibant la cyclophiline A, protéine cellulaire impliquée dans la réplication virale, est la 3^{ème} piste pour l'avancement des thérapies (Flisiak et al., 2009). Le point capital est que toutes ces thérapies seront adjuvantes de la bithérapie classique. En effet, ces molécules spécifiquement dirigées contre les protéines virales entraînent l'apparition de résistances. En effet, la variabilité du virus entraîne l'apparition de mutants échappant à l'action de ces molécules. Des résistances ont été décrites pour les inhibiteurs de la protéase et pour les anti-polymerases (Sarrazin and Zeuzem, 2010).

Selon l'issue du traitement, on peut distinguer 3 catégories de réponses : la réponse virale soutenue, caractérisée par un ARN viral indétectable 6 mois après l'arrêt du traitement, et correspondant probablement à une éradication du virus (Maylin et al., 2008), la non-réponse (chute de la virémie inférieure à 100 fois à la 12^{ème} semaine ou persistance d'une virémie à 24 semaines) et les patients répondeurs-rechuteurs pour lesquels la réplication virale disparaît pendant le traitement mais reprend après arrêt du traitement.

8) Tropisme cellulaire

Le VHC est un virus hépatotrope, ce qui signifie que sa principale cible cellulaire où a lieu sa réplication est l'hépatocyte. Il peut cependant infecter d'autres types cellulaires, comme les épithéliums digestifs et biliaires, les cellules hématopoïétiques, le système nerveux central (Wilkinson et al., 2009) et surtout les lymphocytes et les monocytes (Pal et al., 2006b). Les lymphocytes B en particulier semblent être un réservoir du VHC, expliquant la persistance de l'ARN viral observée chez certains patients après rémission clinique et élimination du VHC du plasma (Pham et al., 2010). De plus, certains patients atteints par le VHC développent un lymphome non-Hodgkinien, qui peut régresser suite à l'élimination thérapeutique du virus, suggérant un rôle du VHC dans la prolifération de ces lymphocytes (Kelaidi et al., 2004).

Bien que la présence du virus soit avérée dans ces différents types cellulaires, la réplication du virus à l'extérieur du foie fait toujours l'objet de débat (Boisvert et al., 2001; Zignego et al., 2007). En effet, la détection par RT-PCR d'ARN négatif du VHC, produit intermédiaire de la réplication présent en très petite quantité, est très difficile et sujette à des artefacts. Cependant, de l'ARN négatif du VHC a pu être détecté dans les PBMC ou dans les lymphocytes B par hybridation *in situ*, technique présentant moins d'artefacts que la PCR (Pal et al., 2006b).

D'autre part, la réplication du VHC a pu être montrée dans des lymphocytes en culture : des PBMC (lymphocytes et monocytes) provenant de patients infectés ont été mis en culture et la production de particules virales infectieuses a pu être mise en évidence (Bare et al., 2005; Sung et al., 2003). Des cultures primaires de PBMC ont aussi pu être infectées par le VHC, et une faible production de particules virales infectieuses a été mise en évidence, montrant que ces cellules sont permissives à l'infection par le VHC et à sa réplication (Cribier et al., 1995). De plus, des lignées lymphocytaires B et T (en particulier MT-2, MOLT-4 et DAUDI) permettent la réplication du VHC et la production de particules de certaines souches infectieuses (Nakajima et al., 1996).

Un autre argument en faveur de la réplication du VHC dans les lymphocytes est l'existence de variants de la quasi-espèce spécifiques de ce compartiment, différents phylogénétiquement des variants présents dans le plasma (provenant en majorité des hépatocytes) (Di Liberto et al., 2006; Ducoulombier et al., 2004; Roque-Afonso et al., 2005; Roque Afonso et al., 1999).

II. Le cycle viral

L'entrée du virus dans la cellule hôte se fait après fixation du virus à des co-récepteurs cellulaires, par la protéine d'enveloppe virale E2. Les membranes cellulaire et virale fusionnent ensuite dans l'endosome (par l'action de protéines de fusion virales), et la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme. Le génome ARN viral est à son tour libéré après décapsulation. Cet ARN de polarité positive est ensuite traduit en une polyprotéine, qui après clivage produit les différentes protéines, structurales (servant à la production de nouveaux virions) et non-structurales (servant principalement à la réplication). L'ARN viral est répliqué, par l'intermédiaire du brin négatif. Les ARN de polarité positive produits seront traduits ou encapsidés pour produire de nouvelles particules virales. Le mécanisme de relargage des particules virales hors de la cellule n'est pas complètement élucidé, il pourrait se faire en empruntant la voie de sécrétion constitutive de l'hôte (exocytose) (Figure 4).

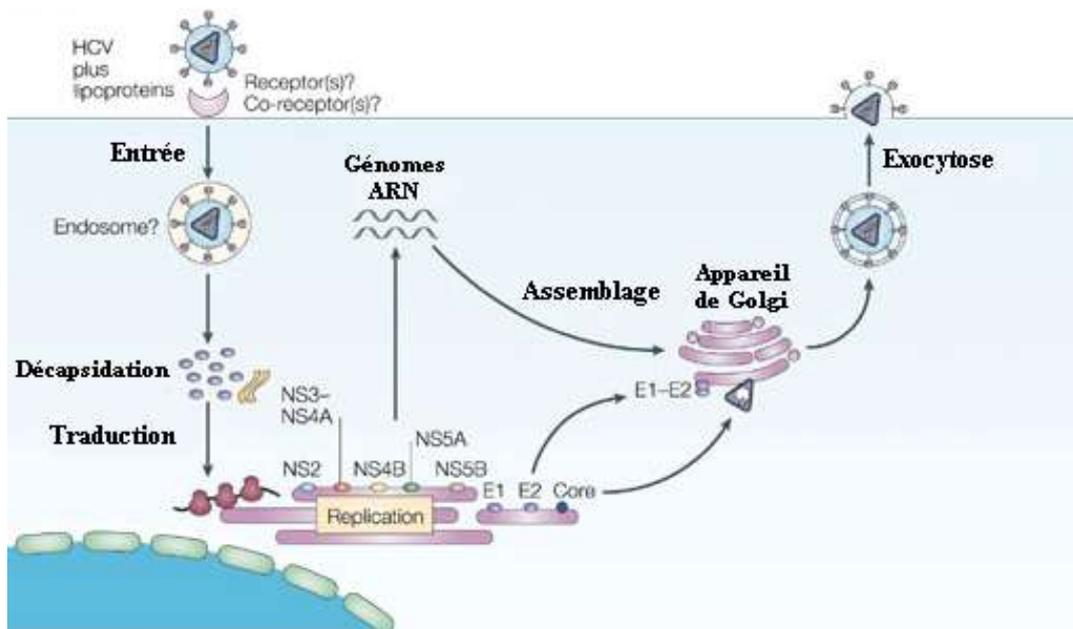


Figure 4 : Représentation schématique du cycle viral du VHC

(Rehermann et al, Nature Rev Immunology, 2005)

Après l'entrée du virus dans la cellule, le génome ARN est traduit en une polyprotéine qui sera clivée en au moins 10 protéines virales. La réplication du virus a lieu au sein d'un complexe de réplication associant des membranes cellulaires, les protéines virales non-structurales et des protéines cellulaires. Les virions, composés du génome ARN viral, de la protéine de capsid et des protéines d'enveloppe E1 et E2 sont assemblés et libérés par exocytose.

1) Entrée du virus

L'attachement du virus à la cellule se fait par interaction de la protéine d'enveloppe E2 avec des récepteurs cellulaires. Le premier récepteur cellulaire du VHC identifié est la tétraspanine CD81, exprimée de façon ubiquitaire. Il a été montré qu'une de ses boucles extracellulaires se fixe à E2 (Pileri et al., 1998). Par contre, le CD81 seul n'est pas suffisant pour permettre l'entrée du virus (Cormier et al., 2004).

L'interaction entre E2 et CD81 peut être bloquée par Ewi-2wint, un partenaire de CD81 (Rocha-Perugini et al., 2008), exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires mais pas au niveau des hépatocytes. Il pourrait donc être impliqué dans l'hépatotropisme du VHC.

SR-B1 (Scavenger receptor type I) est un autre récepteur impliqué dans l'attachement du VHC. Il est exprimé à très haut niveau sur les hépatocytes et les cellules stéroïdogéniques pour la captation du cholestérol, son ligand naturel est le HDL (high density lipoprotein). Il a été montré que E2 (probablement la région HVR1 de E2) interagit avec SRB1, cette interaction est facilitée par les HDL sériques (Kapadia et al., 2007).

Les récepteurs DC-SIGN (spécifiques des cellules dendritiques) et L-SIGN (spécifique du foie et des nœuds lymphatiques) interagissent également avec la protéine d'enveloppe E2 (Lozach et al., 2003). Ces récepteurs pourraient conditionner le tropisme hépatique du VHC, et permettre son entrée dans les cellules dendritiques (Gardner et al., 2003).

Il a également été montré que le récepteur LDL (LDL-R) permet l'entrée du virus lié aux LDL (Molina et al., 2007).

Les claudines et les occludines, composantes des jonctions serrées, interviennent aussi dans l'entrée du virus, à un stade plus tardif (post-attachement) (Evans et al., 2007; Liu et al., 2009b; Meertens et al., 2008).

Les autres récepteurs impliqués dans l'entrée du virus sont les récepteurs asialoglycoprotéines, récepteurs présents en grande quantité seulement sur les hépatocytes et ayant une grande affinité pour les glycoprotéines circulantes (Saunier et al., 2003); et les glycosaminoglycanes héparan sulfate, très ubiquitaires, pouvant servir de site d'attachement initial avant transfert à un autre récepteur de haute affinité (Barth et al., 2003).

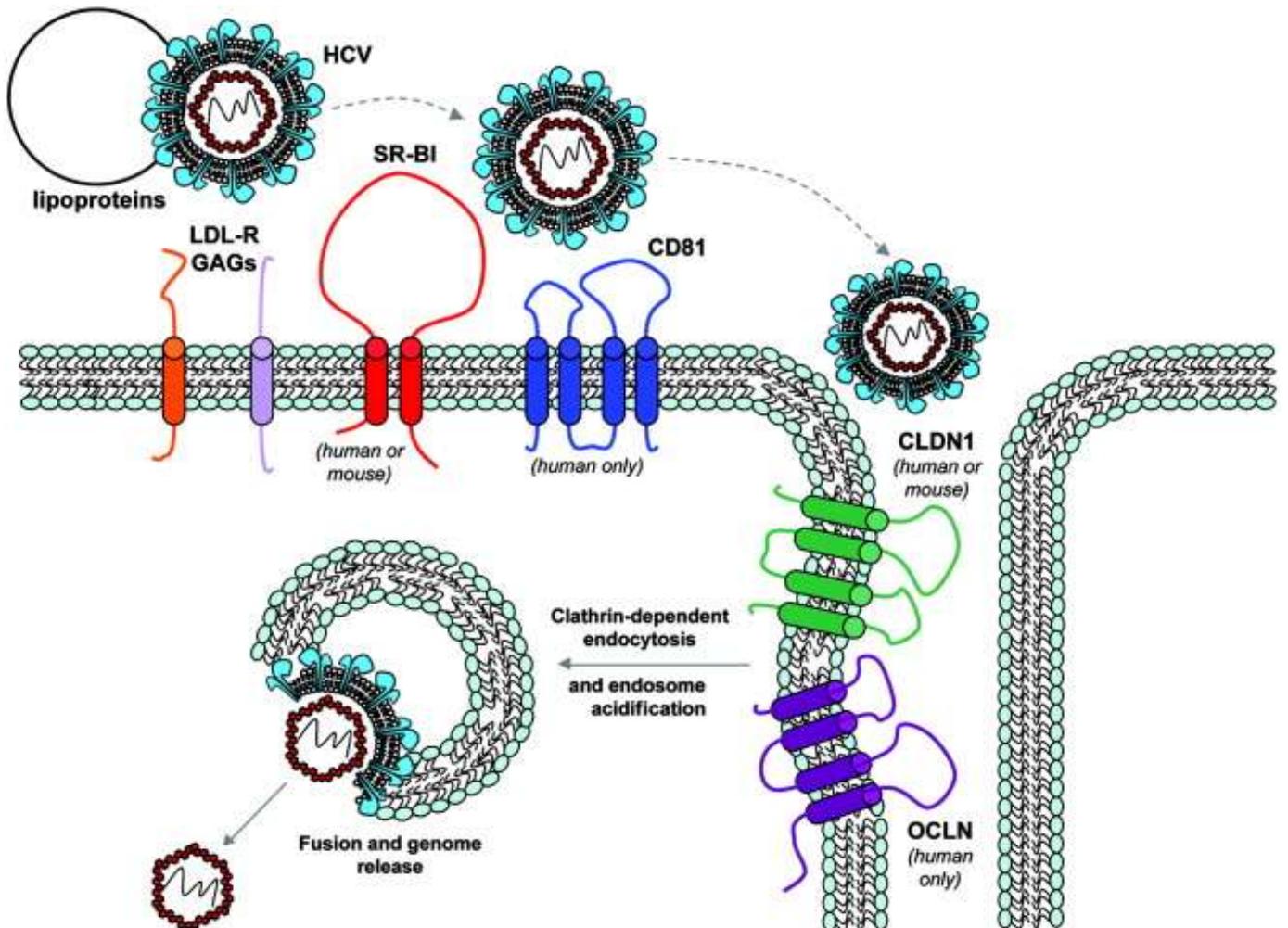


Figure 5 : Représentation du mécanisme d'entrée du VHC dans la cellule

(Eyre, *Hepatology*, 2009)

Le virion, associé à des lipoprotéines, se lie d'abord aux récepteurs des LDL (LDL-R) et les glycosaminoglycane (GAG). Il interagit ensuite avec une haute affinité aux récepteurs CD81 et SR-B1, puis aux claudines (CLDN1 : claudine-1) et occludines (OCLN), composantes des jonctions serrées. L'entrée se fait par endocytose, puis la fusion des membranes cellulaire et virale se produit à pH acide dans l'endosome.

L'entrée du virus dans la cellule se fait en plusieurs temps (Dubuisson et al., 2008). Le virion, associé aux LDL, s'attache d'abord aux glycosaminoglycane et/ou aux LDL-R par des interactions faibles. Une fois sur la membrane cellulaire, le virus peut interagir avec les récepteurs d'entrée comme CD81 et SRB1 avec une grande affinité. Le complexe virus-récepteur est alors transloqué vers les jonctions serrées, où les claudines et les occludines servent de cofacteurs pour l'endocytose. La fusion des membranes virale et cellulaire a lieu

dans l'endosome, à pH acide, et implique des protéines virales (peut être la protéine d'enveloppe E1)(Figure 5).

Il y a ensuite décapsidation et relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule, où il sera traduit en une polyprotéine.

2) Traduction

L'ARN du VHC ne possède pas de coiffe en 5' et sa traduction est initiée de façon coiffe-indépendante, grâce au site d'entrée interne du ribosome (IRES) situé dans la région 5'NC. La région 5'NC est longue de 341 nucléotides et possède de nombreuses structures secondaires et tertiaires. Les 40 premiers nucléotides de cette région constituent le domaine I, qui est impliqué dans la réplication, mais n'est pas indispensable à la traduction (Friebe et al., 2001; Luo et al., 2003).

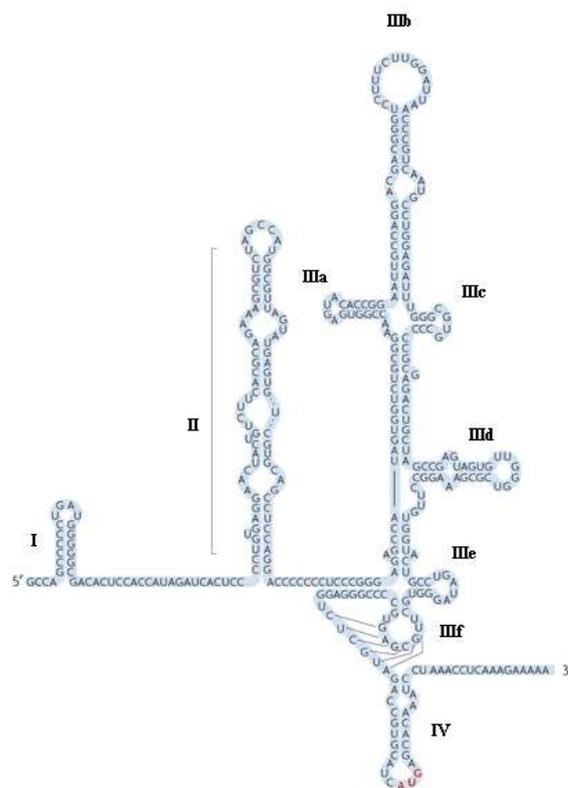


Figure 6 : Structure de la région 5'non-codante

La région 5'NC comprend quatre domaines, avec de nombreuses structures secondaires tige-boucles. Les domaines II à IV forment le site d'entrée interne du ribosome (IRES).

Le reste de la région 5'NC est essentiel à la traduction, les domaines II à IV constituant l'IRES, qui initie la traduction coiffe-indépendante de la polyprotéine virale (Honda et al.,

1999a; Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Il est à noter que les 30 premiers nucléotides de la séquence codante de la capsidite font partie du domaine IV de l'IRES et sont nécessaires à l'initiation de la traduction (Figure 6).

Les modalités de la traduction seront détaillées dans le chapitre III.

3) Maturation de la polyprotéine virale

Après traduction, la polyprotéine est adressée à la membrane du RE pour y être maturée. Elle est d'abord clivée par des peptidases cellulaires, qui reconnaissent les séquences signales présentes entre la capsidite et E1. Cela libère le précurseur de la protéine de capsidite (P23) qui est à nouveau clivé pour donner la protéine P21 mature (Targett-Adams et al., 2008). Les jonctions entre E1 et E2, après E2, puis entre p7 et NS2 sont ensuite clivées, toujours par des protéases cellulaires. L'auto-protéase virale NS2/3 clive ensuite les jonctions entre NS2 et NS3. La protéase virale NS3-4A clive la jonction entre NS3 et NS4A *en cis*, puis les autres jonctions *en trans* (Lohmann et al., 1996) (Figure 7).

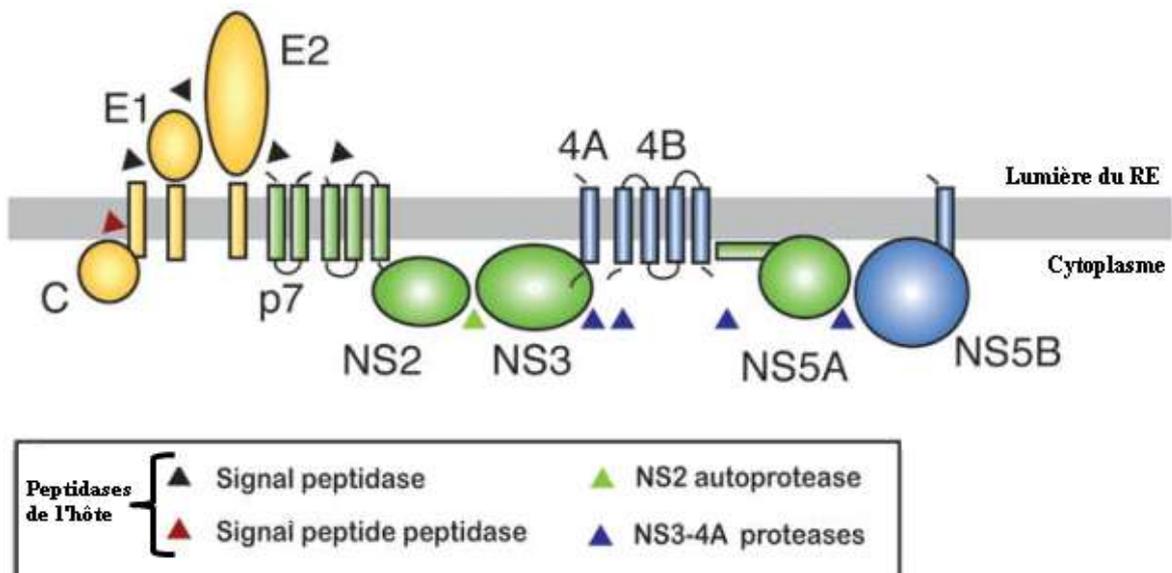


Figure 7 : Maturation de la polyprotéine du VHC

(d'après Murray, Nat Rev, Microbiol, 2008)

La polyprotéine virale est associée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Des protéases cellulaires clivent les jonctions entre la capsidite, E1, E2, p7 et NS2. La protéine de capsidite est à nouveau clivée par une protéase intramembranaire (signal peptide peptidase). L'auto-protéase virale NS2-3 clive la jonction entre NS2 et NS3, puis la deuxième protéase virale, NS3-4A, clive *en cis* la jonction entre NS3 et NS4, et *en trans* les autres jonctions. Pour les protéines virales associées à la membrane, les domaines transmembranaires sont représentés.

Les protéines E1 et E2 subissent ensuite une maturation incluant une N-glycosylation et l'assemblage des hétérodimères E1/E2 (Lavie et al., 2007).

4) Les protéines du virus

4.1. Protéines structurales

Elles interviennent principalement dans la formation de la particule virale. Faisant partie de la structure du virion, elles sont présentes dans la cellule hôte avant la réplication.

4.1.1. Protéine de capsid

La protéine de capsid peut se fixer à l'ARN viral et permet la formation de la capsid virale par auto-assemblage (Klein et al., 2004). Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 191 acides aminés (aa) de 23 kDa (P23) qui est ensuite clivé pour donner la protéine mature, P21 (Yasui et al., 1998).

La protéine de capsid interagit avec de nombreuses protéines et voies cellulaires qui pourraient jouer un rôle dans le cycle viral (Voir paragraphe IV).

Elle se localise au niveau du réticulum endoplasmique (RE), du noyau (Chang et al., 1994; Suzuki et al., 1995), de la mitochondrie (Schwer et al., 2004) et dans le cytoplasme en association avec des gouttelettes lipidiques (Boulant et al., 2007).

4.1.2. Protéines d'enveloppe E1 et E2

Ce sont des protéines transmembranaires, composantes de l'enveloppe virale. Elles sont glycosylées et s'assemblent en hétérodimères non covalents. Elles sont nécessaires pour l'entrée cellulaire et la fusion des membranes.

E2 contient une région hypervariable (HVR1, hypervariable région 1), de 27 aa qui peut présenter jusqu'à 80% de différences de séquence entre les différents génotypes. Pourtant, les propriétés physiques de chaque résidu et la conformation générale sont conservées, indiquant un rôle de cette région dans le cycle viral (Penin et al., 2001). E2 joue un rôle primordial dans les premières phases de l'infection : elle permet l'attachement viral par interaction avec un ou plusieurs récepteurs cellulaires (Bartosch et al., 2005). Elle représente également un des épitopes majeurs pour les anticorps neutralisants (Zibert et al., 1997).

Le rôle de la protéine E1 est moins bien connu, elle pourrait jouer un rôle dans la fusion membranaire (Lavillette et al., 2007).

4.1.3. Protéine F

Cette protéine, aussi appelée « frameshift protein » est traduite par un glissement du ribosome, décalant de cadre de lecture de 1 nt dans la région N-terminale de la capsid (Baril and Brakier-Gingras, 2005). Des anticorps neutralisants dirigés contre cette protéine ont été détectés chez des patients infectés de façon chronique (Walewski et al., 2001), ce qui prouve que cette protéine est bien synthétisée lors du cycle viral, mais son rôle est inconnu (Vassilaki et al., 2008).

4.2. Protéines non-structurales

Les protéines non-structurales sont principalement impliquées dans la réplication du génome viral.

4.2.1. La protéine P7

Il s'agit d'une protéine de 63 aa, intégrée à la membrane. Elle pourrait appartenir à la famille des viroporines et agir comme un canal à ions calcium (Gonzalez and Carrasco, 2003). Elle pourrait jouer un rôle dans l'assemblage et la production des particules virales (Steinmann et al., 2007).

4.2.2. La protéine NS2 (protéase)

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 21 à 23 kDa. Elle présente 2 signaux internes qui permettent son association avec la membrane du réticulum endoplasmique (ER). En association avec le domaine N-terminal de NS3, elle constitue une métalloprotéase zinc-dépendante, responsable du clivage entre NS2 et NS3 (Schregel et al., 2009).

De plus, son domaine protéase, mais pas son activité enzymatique, serait indispensable à l'assemblage des particules virales (Jirasko et al., 2008).

Elle interagit également avec la cellule hôte, elle pourrait réguler la transcription cellulaire et l'apoptose.

4.2.3. Protéines NS3 et NS4A (protéase et hélicase)

Le domaine N-terminal (2/3 de la protéine) de NS3 présente une activité protéase, et son domaine C-terminal présente une activité hélicase et NTPase.

L'activité protéase de NS3 nécessite son association avec NS4A. La protéase NS3-NS4A est responsable des clivages des jonctions NS3/NS4A (en *cis*) puis NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Bartenschlager et al., 1995).

L'activité hélicase de NS3 permet l'élimination des structures secondaires de l'ARN en utilisant l'énergie de l'hydrolyse des NTP (Tai et al., 1996). Cette activité pourrait jouer un rôle lors de la réplication de l'ARN viral. L'activité hélicase est régulée par le domaine protéase de NS3 et par NS5B (Zhang et al., 2005).

Ces protéines interagissent également avec des voies cellulaires, notamment la protéine P53.

4.2.4. La protéine NS4B

NS4B est une protéine de 261 aa intégrée à la membrane, localisée sur la membrane du RE (ou sur les membranes dérivées du RE). NS4B permet l'ancrage du complexe de réplication à la membrane (Elazar et al., 2004). Elle module également l'activité ARN polymérase de NS5B (Piccininni et al., 2002).

4.2.5. La protéine NS5A

NS5A est une zinc-métalloprotéine phosphorylée de 56 kDa. Elle est localisée sur les membranes du RE et de l'appareil de Golgi, ainsi qu'au niveau du complexe de réplication. La région C-terminale de NS5A possède un signal de localisation nucléaire, et une forme tronquée de NS5A est retrouvée dans le noyau (Sauter et al., 2009).

Cette protéine n'a pas de fonction enzymatique connue, mais elle joue un rôle dans la réplication, et interagit avec beaucoup de voies de signalisation cellulaires. NS5A se fixe à la protéine cellulaire hVAP-33 dans le complexe de réplication (Tu et al., 1999). Une forme hyperphosphorylée de NS5A existe (58 kDa), elle serait impliquée dans la régulation de la réplication (Evans et al., 2004). NS5A se fixe également directement à NS5B et pourrait réguler son activité (Shimakami et al., 2004).

NS5A pourrait également jouer un rôle dans l'assemblage car elle peut se fixer à la protéine de capsid et à l'ApoA1, composant principal des HDL (Benga et al., 2010).

NS5A interagit avec de nombreuses voies cellulaires, notamment l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire.

4.2.6. La protéine NS5B (ARN polymérase ARN-dépendante)

NS5B est une ARN polymérase ARN-dépendante. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée, elle correspond à la structure classique des ARN polymérases rappelant une main droite, avec les structures correspondant à la paume, aux doigts et au pouce (Bressanelli et al., 1999). Elle est capable d'initier la synthèse d'ARN *de novo*, sans avoir besoin d'amorce (Shim et al., 2002). C'est une protéine membranaire localisée dans la membrane du RE, son domaine fonctionnel étant exposé sur la face cytosolique.

Elle interagit elle aussi avec la protéine cellulaire hVAP-33 impliquée dans la formation du complexe de réplication (Gao et al., 2004), ainsi qu'avec la cyclophiline A, dont l'activité isomérase est indispensable à la réplication (Chatterji et al., 2009).

5) Réplication

La réplication du VHC passe par la synthèse d'un ARN de polarité négative par une ARN polymérase ARN dépendante (NS5B). Cet intermédiaire de réplication est utilisé pour la synthèse d'ARN de polarité positive, qui servira à l'assemblage d'un virion, sera traduit ou à nouveau répliqué.

5.1. Le complexe de réplication

L'ARN viral est répliqué au sein d'un complexe de réplication associé aux membranes cellulaires (Wolk et al., 2008) qui comprend l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B, la plupart des autres protéines virales non structurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A), et des protéines cellulaires (Kusakawa et al., 2007; Stone et al., 2007).

Le complexe de réplication est associé à un « web réplicatif » composé de membranes cellulaires probablement dérivées du réticulum endoplasmique. L'altération des membranes cellulaires est induite par la protéine virale NS4B.

Toutes les protéines non structurales, à l'exception de NS5A, doivent être traduites en *cis* par le cadre ouvert de lecture de la molécule d'ARN pour que celle-ci puisse être répliquée. Les protéines virales sont donc probablement assemblées dans le complexe de

réplication d'une façon séquentielle, juste après leur traduction. La seule protéine agissant en *trans*, NS5A, pourrait rejoindre le complexe de réplication par l'intermédiaire d'une protéine cellulaire, hVAP-33 (human vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa).

La protéine NS4B pourrait ancrer la formation du complexe de réplication, qui se forme sur des membranes avec des lipides. NS3 est directement impliqué dans la synthèse d'ARN, probablement par sa fonction hélicase. Cette activité hélicase est fortement augmentée en présence de NS4A. L'ARN polymérase NS5B est une phosphoprotéine associée à la membrane, elle interagit avec la protéine membranaire hVAP-33. Des siRNA contre hVAP-33 bloquent l'association de NS5B à la membrane et inhibent la réplication de l'ARN (Gao et al., 2004). NS5B peut être phosphorylée par PKR2, ce qui pourrait réguler la réplication (Kim et al., 2004c), mais on ne sait pas si cette phosphorylation influence la fonction de NS5B.

5.2. La région 3'NC

La région 3'NC du VHC est cruciale pour l'initiation de la synthèse du brin négatif. Elle a une longueur variant entre 200 et 235 nucléotides, elle est constituée de 3 régions distinctes, une région variable, une région composée de la répétition de U/UC, et une région très conservée de 98 nucléotides, la région X (Blight and Rice, 1997; Kolykhalov et al., 1996; Tanaka et al., 1995) (Figure 8).

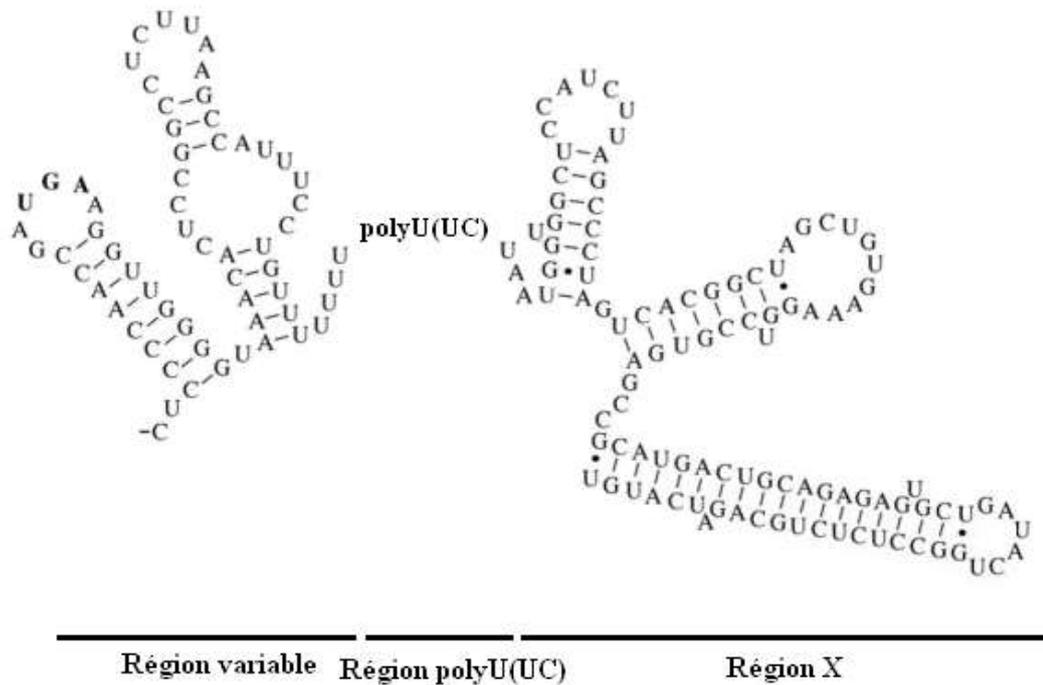


Figure 8 : Représentation de la structure de la région 3' non-codante du VHC

La région variable est composée de deux structures tige-boucles. Elle est suivie d'une région polyU/UC de longueur variable, et de la région X de 98 nt, comportant 3 structures tige-boucles et très conservée entre les génotypes.

La région variable suit immédiatement le codon stop de la polyprotéine, et sa longueur varie entre 27 et 70 nucléotides entre les différents génotypes viraux. Cette région variable est cependant conservée entre les souches virales appartenant à un même génotype (Han and Houghton, 1992). Deux structures tige-boucle ont été identifiées dans cette région, la première boucle comprenant les 15 derniers nucléotides de la séquence de NS5B (Han and Houghton, 1992; Kolykhalov et al., 1996).

La région poly (U/UC) comprend une répétition de U et une région C(U)_n. Cette région varie beaucoup en longueur et en séquence entre les différentes souches. Il a été montré que l'efficacité de la réplication dépend de la longueur de cette séquence (Kolykhalov et al., 1997; You and Rice, 2008).

La région X est formée de 3 régions tige-boucles stables, et est très conservée entre tous les génotypes ((Blight and Rice, 1997; Kolykhalov et al., 1996), preuve de son importance fonctionnelle dans la réplication, et possiblement aussi dans la traduction. La région 3'NC du VHC n'est pas suivie d'une queue polyadénylée (polyA) comme c'est le cas pour les ARNm

cellulaires, mais la région X pourrait la remplacer fonctionnellement pour l'initiation de la traduction.

5.3. Réplication

Le VHC se réplique en produisant un ARN total de polarité négative. Ensuite, des ARN positifs sont synthétisés à partir de cet intermédiaire (5 à 10 fois plus que d'ARN négatifs), ils seront utilisés pour la traduction, la réplication et l'assemblage de nouveaux virions.

La réplication doit donc être initiée à partir de l'extrémité 3' des brins des 2 orientations, ce qui fait que les séquences 3'NC et 5'NC doivent contenir des éléments permettant l'initiation et la régulation de la réplication de l'ARN.

Dans la région 5'NC, les 125 premiers nucléotides de la région 5'NC (domaines I et II de l'IRES) sont nécessaires et suffisants à la réplication, mais la réplication est plus efficace si la 5'NC entière est présente (Friebe et al., 2001).

Dans la région 3'NC, les 150 derniers nucléotides, incluant la région X et 52 nt de la région poly U/UC sont indispensables à la réplication, la région de la 3'NC plus en amont ayant un rôle de facilitation (Friebe and Bartenschlager, 2002; Ito and Lai, 1997).

On peut remarquer une symétrie intéressante entre les signaux de réplication des régions 5' et 3'NC.

La région X est cruciale pour la réplication, elle interagit avec l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B, mais d'autres sites de fixation de NS5B pourraient exister à d'autres endroits du génome, au niveau de la portion 3' de la séquence de NS5B et de la région poly U/UC (Cheng et al., 1999).

La région poly(U/UC) est également nécessaire à la réplication (Friebe and Bartenschlager, 2002; Kolykhalov et al., 1997), elle pourrait participer à la circularisation du génome, qui se produit pour la réplication des autres Flavivirus. Cette séquence fixe plusieurs protéines cellulaires (comme la protéine PTB), qui pourraient participer à des interactions ARN-ARN (Ito and Lai, 1997) ou à la fixation du complexe réplicase à l'ARN. La longueur de la région poly(U/UC) pourrait influencer la réplication virale, les virus présentant une région poly(U/UC) plus longue ayant un avantage réplcatif chez les chimpanzés (Kolykhalov

et al., 1997). Les mêmes observations ont été réalisées sur des réplicons subgénomiques ((Friebe and Bartenschlager, 2002).

La région variable de la 3'NC, par contre, ne semble pas nécessaire à la réplication (Friebe and Bartenschlager, 2002), mais elle joue un rôle facilitant puisque la délétion de cette région diminue l'efficacité de l'amplification des réplicons subgénomiques (Yi and Lemon, 2003).

Certains éléments conservés de la région codante de NS5B, agissant en *cis*, sont nécessaires à la réplication (Diviney et al., 2008). NS5B contient une séquence cruciforme formée de 3 tiges-boucles (5BSL3.1, 5BSL3.2, 5BSL3.3), parmi celles-ci, la boucle 5BSL3.2, est essentielle à la réplication (Diviney et al., 2008).

5.4. Régulation de la réplication du VHC

La fixation de protéines virales ou cellulaires sur les régions 5' et 3' non-codantes pourrait moduler la structure secondaire et/ou tertiaire de l'ARN viral et faciliter sa reconnaissance par le complexe réplicase. Ces protéines pourraient également recruter d'autres facteurs cellulaires et permettre le dialogue à distance entre les deux extrémités du génome.

Les protéines cellulaires HuR, hnRNP C, PTB et GAPDH se fixent dans la région poly(U/UC) de la 3'NC (Gontarek et al., 1999; Petrik et al., 1999; Spangberg et al., 2000) et pourraient donc jouer un rôle dans la régulation de la réplication. Des protéines du groupe NFAR interagissent à la fois avec les régions 5' et 3'NC, permettant la circularisation du génome et favorisant la réplication (Isken et al., 2007). D'autre part, le miR-122, microARN spécifique du foie, régule la réplication en se fixant sur une région du 5'UTR (Jopling et al., 2005). Il pourrait participer au repliement de l'ARN ou à la séquestration de l'ARN dans les complexes de réplication.

6) Assemblage des particules virales

Les particules virales sont assemblées au niveau des gouttelettes lipidiques présentes dans le cytoplasme (Miyazari et al., 2007). Celles-ci sont associées à des membranes

plasmiques, en partie dérivées du RE. Les protéines de capsides peuvent se fixer à l'ARN viral et s'auto-assemblent pour former la nucléocapside. Des protéines non-structurales pourraient également intervenir dans l'assemblage des virions (Benga et al., 2010; Jirasko et al., 2008; Ma et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Les particules virales sont ensuite excrétées par la voie d'exocytose cellulaire constitutive, et sont entourées d'une enveloppe dérivée de la membrane du RE de l'hôte, dans laquelle sont enchassées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. La sécrétion des particules virales par les hépatocytes pourrait être liée à celle des VLDL (very low density lipoproteins) (Huang et al., 2007).

7) Modèles d'étude du VHC

7.1. Modèles d'étude cellulaires

Il existe très peu de modèles d'étude cellulaires du VHC car ce virus ne se réplique pas dans les cultures cellulaires, et il a fallu attendre la mise au point du système réplicon puis l'isolement de la souche JFH1 pour étudier la réplication du virus.

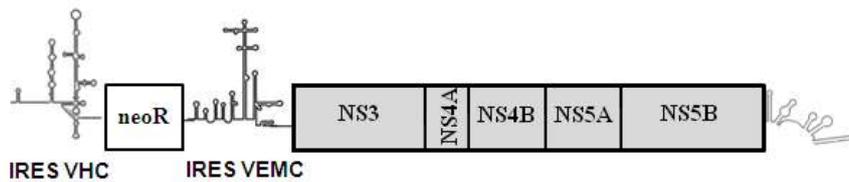
Beaucoup de tentatives d'infections de cellules en cultures par du VHC ont été réalisées (transfections de particules ou du génome ARN), et une réplication du virus a pu être détectée dans des lignées de lymphocytes B et T, des PBMC, des lignées dérivées d'hépatomes et des cultures primaires d'hépatocytes humains et de chimpanzés. Cependant, cette réplication est souvent transitoire et se produit à un très bas niveau (Bartenschlager and Lohmann, 2001).

En 1999, le premier réplicon, se répliquant efficacement dans la lignée Huh-7, a été mis au point (Lohmann et al., 1999). Il s'agit d'une construction plasmidique subgénomique, codant pour les protéines structurales du VHC, mais pas pour les protéines structurales, celles-ci n'étant pas nécessaires à la réplication du virus. Le réplicon bicistronique est constitué de la région IRES du VHC, dirigeant la traduction de la néomycine phosphotransférase (confère une résistance à la molécule cytotoxique G418, permettant la sélection des cellules dans lesquelles le réplicon se réplique), puis l'IRES de l'ECMV codant pour les protéines non-structurales du VHC (NS3 à NS5B), et enfin la région 3'NC du VHC (Figure 9).

Cette construction est transcrite *in vitro* et est transfectée dans des cellules Huh7 sous forme ARN. Le système réplicon ne peut se répliquer efficacement dans les Huh-7 grâce à l'acquisition de mutations adaptatives, apparaissant dans la séquence codante des protéines non-structurales. Le premier réplicon subgénomique a été obtenu à partir de la souche con1

(génotype 1b), des réplicons de génotype 1a n'ont pu être obtenus qu'en utilisant la lignée Huh-7.5, permissive à la réplication. Cette lignée a été obtenue à partir de cellules Huh-7 permettant la réplication du réplicon con1 (seules 10% des cellules Huh-7 naïves acceptent la réplication), dont il a été éliminé par un traitement avec de l'interféron α . Cette lignée permet la réplication du virus dans 75 % des cellules (Blight et al., 2002). Il a été montré que ces cellules permissives présentent une inactivation de RIG-1, récepteur de motifs viraux qui déclenche la réponse interféron (Foy et al., 2005).

1) Réplicon sub-génomique



2) Réplicon complet

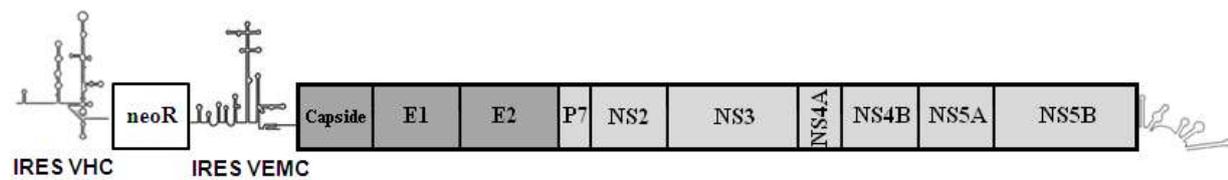


Figure 9 : Représentation schématique des réplicons sub-génomiques et complets

Un gène de résistance à la néomycine (*neoR*) est traduit sous la dépendance de l'IRES du VHC. Les protéines virales sont exprimées sous la dépendance de l'IRES du VEMC. Le réplicon subgénomique comprend uniquement les séquences codant pour les protéines non-structurales, nécessaires à la réplication. Le réplicon complet code pour toutes les protéines du VHC, structurales et non structurales.

Cette lignée permissive a permis également la réplication de réplicons complets, contenant la totalité du génome, protéines structurales incluses (Figure 9). Cependant, ils ne permettent pas la production de particules virales (l'apparition de mutations adaptatives dans le génome semble empêcher la production de particules (Bukh et al., 2002)).

Des réplicons subgénomiques monocistroniques, ne contenant pas de séquences non-VHC (le gène de résistance à G418 et l'IRES du VEMC) ont pu être étudiés dans cette lignée ne demandant pas de mutations adaptatives et donc pas de sélection.

En 2001 a été isolé un clone particulier de génotype 2a, JFH-1, à partir d'un patient présentant une hépatite fulminante. Sa séquence diffère des autres clones du génotype 2a

surtout au niveau de la région 5'NC, de la capside, de NS3 et NS5A. Une autre particularité de cette souche est sa monoclonalité (pas de présence de quasiespèces), propriété partagée par les souches du VHC responsables d'hépatites fulminantes (Kato et al., 2001).

Le réplicon sub-génomique dérivé de JFH1 se réplique de façon très efficace dans la lignée Huh-7, sans nécessiter l'acquisition de mutations adaptatrices comme c'était le cas pour les réplicons obtenus jusque là.

De plus, la transfection de l'ARN génomique complet transcrit *in vitro* permet la réplication et la production de particules infectieuses, dans Huh-7 et chez le chimpanzé (Wakita et al., 2005). L'infectivité de ces particules virales est faible dans les cellules Huh-7 (0,5 %), mais elle est fortement augmentée en utilisant la lignée permissive Huh7.5 ou la lignée dérivée Huh-7.5.1, dans lesquelles on peut obtenir presque 100 % d'infection.

Cette souche JFH1 est donc capable d'effectuer un cycle viral complet et de produire des particules virales infectieuses, sans mutations adaptatives ni sélection. C'est pourquoi ce modèle est très utilisé depuis 2005 pour les études *in vitro* du VHC, et des chimères ont été réalisées entre différents génotypes (Pietschmann et al., 2006). La réalisation d'un cycle viral complet en culture a pu être obtenue également avec d'autres souches du VHC, elles se répliquent cependant de façon moins efficace que JFH1 (Yi et al., 2006).

Le modèle des pseudo-particules a été mis au point pour l'étude de l'accrochage et de l'entrée du virus. Elles ont été obtenues par assemblage des glycoprotéines complètes du VHC et leur expression à la surface de particules du rétrovirus murin MLV. Un gène rapporteur, comme la GFP, peut être introduit dans le génome du rétrovirus, il sera intégré et exprimé dans les cellules infectées. Ces pseudo-particules sont très infectieuses, avec le même tropisme cellulaire que le virus lui-même. Ce modèle est utile pour l'identification des récepteurs du VHC, et a montré que CD81 et LDLr sont nécessaires, mais non suffisants à l'entrée du virus (Bartosch et al., 2003).

7.2. Modèles animaux

Hormis l'homme, seul le chimpanzé est sensible à l'infection par le VHC. Des chimpanzés infectés avec du VHC présentent des symptômes similaires à ceux des humains, la seule différence étant que la maladie évolue vers la chronicité chez seulement 40 % d'entre eux (au lieu de 80% environ chez l'homme). Le chimpanzé a donc été très utilisé pour l'étude du VHC, pour définir les éléments nécessaires à la réplication, et étudier la réponse

immunitaire de l'hôte dès les premiers stades de l'infection. Le chimpanzé reste le meilleur modèle animal pour l'infection par le VHC, mais son utilisation pose des problèmes d'ordre pratique et éthique, et de nouveaux modèles animaux, encore imparfaits, ont été créés.

Des souris transgéniques exprimant une ou plusieurs protéines virales ont été mises au point (Moriya et al., 1998; Pasquinelli et al., 1997; Wang et al., 2009), mais les résultats de ces études sont souvent contradictoires, peut-être à cause de la diversité des souches murines utilisées et de l'expression des protéines VHC à des niveaux différents. De plus, ces modèles ne permettent l'étude ni du cycle viral complet, ni de la réponse immunitaire de l'hôte.

Des hépatocytes humains, provenant de donneurs infectés ou infectés *ex vivo* ont pu être greffés chez des souris SCID (severe combined immune deficiency, souris immunodéficientes) (Mercer et al., 2001). L'avantage des modèles murins est qu'ils sont d'une utilisation plus simple que les chimpanzés, et qu'il s'agit d'hépatocytes humains. Cependant, l'infection ne persiste qu'un mois environ, ce qui limite l'utilisation de ce modèle pour évaluer l'effet de nouvelles thérapies contre le VHC, et d'autre part, la greffe d'hépatocytes humains n'est pas très reproductible. L'étude de la réponse immunitaire n'est pas possible dans ce modèle, elle demanderait l'introduction des composants du système immunitaire humain chez la souris (Ploss and Rice, 2009).

Un autre modèle d'étude possible est le marmouset, qui peut être infecté par le virus GB, Faviviridae apparenté au VHC (Muerhoff et al., 1995). Des chimères VGB/VHC infectieuses ont été créés, contenant une partie de l'IRES ou la région HVR de E2 du VHC. D'autres chimères contenant d'autres parties du génome du VHC pourront certainement être créées, et ce modèle pourrait s'avérer utile pour tester des thérapies anti-VHC. Il a d'ailleurs été montré qu'un inhibiteur de la protéase du VHC inhibe également la réplication du VGB *in vivo*. Cependant, il s'agira toujours d'un virus un peu différent et de plus la clinique chez le marmouset n'est pas la même que chez l'homme, l'infection évolue sur un mode aigu et non chronique.

Tous les modèles animaux ont leurs limites, mais leur amélioration pourra néanmoins permettre d'étudier certains aspects de l'infection par le VHC.

III. La traduction IRES-dépendante du VHC

L'initiation est l'étape limitante de la traduction des ARN messagers. Elle peut se faire selon deux modes : coiffe-dépendant ou IRES-dépendant (coiffe-indépendant).

1) Mécanismes d'initiation de la traduction

1.1. Traduction coiffe-dépendante

La plupart des ARNm eucaryotes recrutent les ribosomes grâce à la fixation du complexe 43S à leur extrémité 5' NC. Ce complexe 43 S est composé de la sous-unité ribosomale 40S, associée aux facteurs d'initiation eIF3, eIF5 et eIF2 α (couplé à un GTP). Le facteur d'initiation eIF2 est associé à un ARN de transfert (couplé à une méthionine).

Ce complexe reconnaît l'ARNm par fixation de eIF3 à la sous-unité eIF4G du complexe coiffe-dépendant eIF4F. En plus de eIF4G (qui est la structure permettant l'assemblage de ce complexe), le complexe eIF4F comprend eIF4E, qui se fixe directement à la coiffe (guanine méthylée à l'extrémité 5' NC), et eIF4A, une hélicase qui défait les structures secondaires de l'ARN lors de l'étape de scan. EIF4G se fixe également à PABP (poly(A)-binding protein), circularisant ainsi l'ARNm par interaction avec la queue polyA en 3'. Le complexe de pré-initiation 43 S balaie ensuite l'ARN de 5' en 3' jusqu'à l'identification du codon d'initiation AUG. Ce balayage est assisté par les facteurs d'initiation eIF1 et eIF1A. La fixation stable du complexe 43S au codon AUG forme le complexe d'initiation 48S. La sous-unité ribosomale 60S se joint à ce complexe, formant le complexe d'initiation 80S. La reconnaissance du codon d'initiation AUG et l'arrivée de la sous-unité 60S entraînent l'hydrolyse des GTP portés par eIF2 et eIF5B. Le complexe 80S peut ainsi catalyser la formation de la première liaison peptidique (Preiss and Hentze, 2003) (Figure 10).

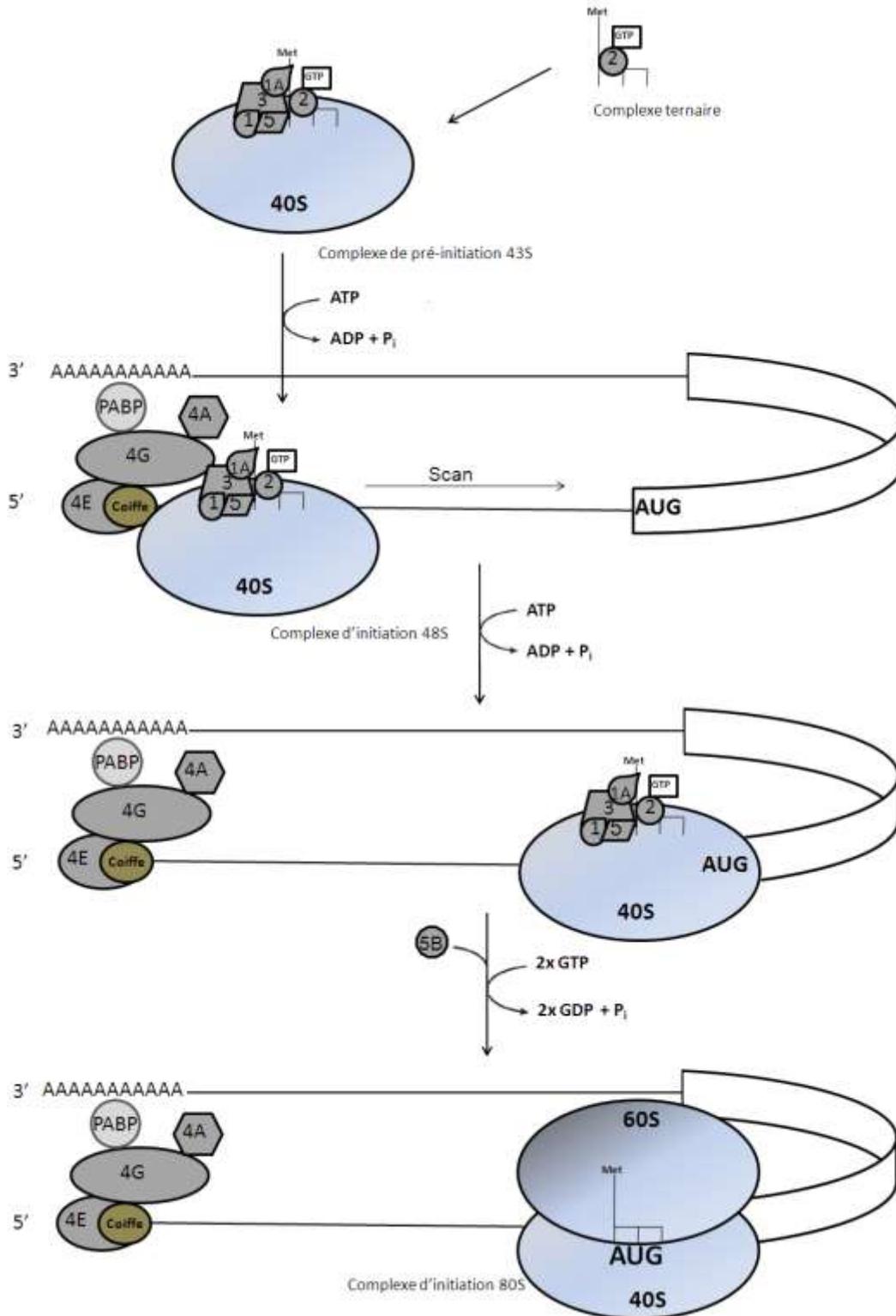


Figure 10 : Mécanisme d'initiation de la traduction coiffe-dépendant

Les sous-unités ribosomales 40S et 60S sont représentées. Les facteurs d'initiation de la traduction sont identifiés par leur lettre et leur numéro (4E = eIF4E). Les sous-unités ribosomales 40S et 60S sont également représentées. Le cadre de lecture ouvert est représenté par un rectangle avec le codon d'initiation AUG.

La traduction est régulée par la phosphorylation de eIF4E (la forme phosphorylée de eIF4E se fixe à la coiffe avec plus d'affinité), et par la séquestration de eIF4E par la protéine 4E-BP (eIF4E-binding protein), empêchant sa fixation à eIF4G. 4E-BP se fixe à eIF4E sous sa forme déphosphorylée uniquement, sa phosphorylation est régulée par la kinase FRAP/mTOR (qui peut être inhibée par la rapamycine) (Sonenberg and Gingras, 1998).

La traduction est aussi régulée par la phosphorylation de la sous-unité α de eIF2, par 4 kinases, PKR, induite par l'interféron et activée par les ARN double brin, PERK, induite lors du stress du RE, Gcn2, activée lors de la déprivation en acides aminés, et eIF2AK1, régulée par l'hème, ne concerne que les érythrocytes. La phosphorylation de eIF2 α empêche l'initiation de la traduction (la phosphorylation empêche le recyclage du GDP du complexe ternaire en GTP) (Wek et al., 2006).

1.2. Traduction IRES-dépendante

Lors de l'initiation de la traduction de façon IRES-dépendante, le ribosome se fixe sur une structure secondaire de l'extrémité 5' NC de l'ARNm, appelée IRES (Internal Ribosome Entry Site, site d'entrée interne du ribosome). Ce type particulier de traduction dépend de certaines protéines impliquées dans la traduction coiffe-dépendante et aussi de protéines cellulaires "chaperonnes" de l'IRES, les ITAFs (IRES Trans-acting Factors).

1.2.1. Les IRES viraux

Les IRES (viraux ou cellulaires) présentent une grande variété de structure, de longueur et de mode de fonctionnement. On peut définir quatre grands groupes d'IRES viraux selon leur structure et les facteurs d'initiation qui leur sont nécessaires (Balvay et al., 2009; Kieft, 2008). Le premier groupe comprend les IRES des Dicistrovirus, qui peuvent fonctionner sans aucun des facteurs d'initiation de la traduction. L'IRES du VHC est classé dans le groupe II avec les IRES des Flavivirus et des Pestivirus, qui nécessitent seulement quelques facteurs d'initiation, eIF3, eIF2 et eIF5. Les groupes 3 et 4 comprennent la plupart des IRES viraux, incluant les Lentivirus et les Picornavirus, dont l'initiation de la traduction nécessite tous les facteurs canoniques sauf eIF4E (qui se fixe sur la coiffe) et la région C-terminale de eIF4G (eIF4G est clivé lors de l'infection par ces virus).

1.2.2. IRES cellulaires

La traduction liée à l'IRES, d'abord découverte chez les virus, interviendrait aussi pour environ 3 % des gènes cellulaires (Vagner et al., 2001). Il a en effet été observé que certains ARNm cellulaires continuent à être traduits lors de l'infection par le poliovirus, situation dans laquelle la traduction coiffe-dépendante est fortement inhibée (Johannes et al., 1999).

Les gènes possédant une IRES appartiennent à des catégories fonctionnelles importantes pour la cellule (l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, l'angiogénèse), et beaucoup d'entre eux sont des oncogènes (Bcl-2, c-myc, VEGF, HIF1, Tie2, p53). Ces ARNm possèdent donc deux modes d'initiation de la traduction possible, coiffe-dépendant ou IRES-dépendant. La présence d'un IRES dans la région 5'UTR, qui présente des structures secondaires, empêche le balayage par le ribosome et la traduction coiffe-dépendante est peu efficace. Lors de stress cellulaire, certains facteurs d'initiation de la traduction, dont eIF4E sont inactivés, et la traduction coiffe-dépendante est inhibée au profit de la traduction coiffe-indépendante médiée par une IRES (Spriggs et al., 2008). Cette augmentation régulée de la traduction IRES pourrait intervenir soit par une levée de la compétition avec les ARNm coiffe-dépendant (les ribosomes et facteurs d'initiation se trouvent ainsi en excès), ou par une synthèse ou relocalisation spécifique de leurs ITAFs. La structure et les déterminants de la traduction de ces IRES cellulaires sont encore très mal connus.

Certains auteurs nient l'existence des IRES cellulaires, ces ARNm pourraient selon eux être traduits par d'autres modes de traduction, ni coiffe-dépendants, ni IRES-dépendants (Kozak, 2005). L'efficacité de ces IRES se révèle en effet très faible par rapport aux IRES viraux.

2) La traduction IRES-dépendante du VHC

2.1. Structure de l'IRES du VHC

La région 5'NC du VHC est longue de 341 nucléotides. Cette séquence présente plus de 90 % d'identité entre les différents génotypes du VHC (Bukh et al., 1992), et les structures secondaires et tertiaires de cette région sont aussi très conservées (Brown et al., 1992). Les régions 5'NC du VHC, du virus GB B (Muerhoff et al., 1995), et des pestivirus, comme le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et la peste porcine classique présentent de fortes homologies de séquence et de structure secondaire (Brown et al., 1992).

Les 40 premiers nucléotides de la région 5' non-codante constituent le domaine I, qui est impliqué dans la réplication, mais n'est pas indispensable à la traduction (Friebe et al., 2001; Luo et al., 2003). La délétion de ce domaine entraîne même l'augmentation de la traduction d'un ARN reporteur hétérologue (Rijnbrand et al., 1995). Par contre, dans le contexte d'un réplicon subgénomique, la délétion de ce domaine entraîne une réduction de la synthèse protéique (Luo et al., 2003). D'autre part, une séquence de deux nucléotides (nucléotides 34 et 35) contribue à la différence d'efficacité traductionnelle existant entre les génotypes 1a et 1b (Honda et al., 1999b). Il est donc possible que le domaine I soit impliqué dans la régulation de la traduction.

Le reste de la 5'NC est essentielle à la traduction, les domaines II à IV constituant un IRES, qui initie la traduction coiffe-indépendante de la polyprotéine virale (Honda et al., 1999a; Tsukiyama-Kohara et al., 1992).

Plusieurs études en microscopie électronique (Beales et al., 2001; Spahn et al., 2001) et de résonance magnétique nucléaire (Lukavsky et al., 2000) ont permis d'avoir des informations détaillées sur la structure secondaire des principaux domaines de l'IRES (Figure 11). Les domaines II et III comportent de multiples tiges et boucles. Les domaines IIIa à IIIc et le domaine II partent d'un petit domaine central qui inclut les tiges-boucles et les jonctions IIIe et IIIf. La boucle du petit domaine IIIe pourrait être impliquée dans la fixation du ribosome 40S. La séquence des tiges-boucles des sous-domaines IIIe et IIId sont conservés parmi les différents génotypes de HCV et jouent un rôle important dans l'initiation de la traduction.

La base du domaine III forme un pseudo-nœud (structure tertiaire) très conservé, qui est critique pour l'activité de l'IRES (Wang et al., 1995). Le pseudo-nœud fait partie du site de fixation de la sous-unité ribosomale 40S (Kolupaeva et al., 2000).

Un autre élément de structure tertiaire dans le domaine II, pourrait aussi être impliqué dans la fixation du ribosome (Lyons et al., 2001).

Le domaine IV est composé d'une petite tige-boucle, dans laquelle le codon initiateur AUG est situé dans la région de la boucle simple brin. La tige-boucle IV n'est pas indispensable pour l'entrée interne des ribosomes, et la stabilité de cette structure est corrélée à une réduction d'efficacité de l'initiation de la traduction (Honda et al., 1996). Elle pourrait être stabilisée par une protéine virale et assurer ainsi un rétrocontrôle négatif sur la traduction, nécessaire à la persistance virale.

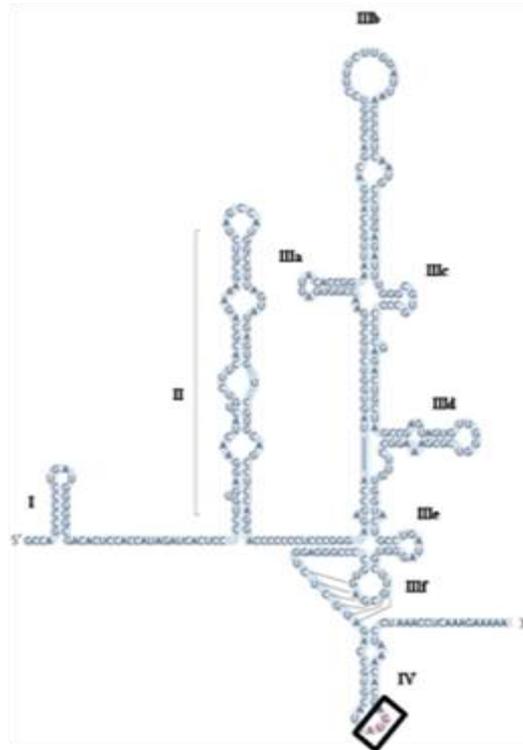


Figure 11 : Structure de l'IRES du VHC

Les structures secondaires en tige-boucles sont représentées, ainsi que les numéros des différents domaines. Le domaine IV comprend le début de la séquence codante de la capsid, le codon d'initiation AUG est encadré. Les interactions entre la boucle du domaine IIIf et une séquence simple brin du domaine III, formant une structure tertiaire en pseudo-nœud, sont représentées par des lignes.

2.2. La traduction IRES-dépendante du VHC

L'IRES du VHC permet le positionnement de la sous-unité ribosomale 40S en contact avec le codon d'initiation, en l'absence de facteurs d'initiation. La sous-unité ribosomale 40S se fixe au niveau du domaine II de l'IRES et à la partie basale du domaine III, en excluant le domaine IIIb (Kieft et al., 2001; Kolupaeva et al., 2000 ; Pestova et al., 1998).

La protéine ribosomale S5 (une des 33 protéines composant la sous-unité ribosomale 40S), en particulier, est importante pour l'initiation de la traduction (Fukushi et al., 2001b; Pestova et al., 1998). L'IRES du VHC utiliserait ainsi un mécanisme proche de celui des procaryotes pour former le complexe ARN-ribosome 40S (les ARNm procaryotes ne possèdent pas de coiffe et seuls 3 facteurs d'initiation de la traduction interviennent) (Pestova et al., 1998).

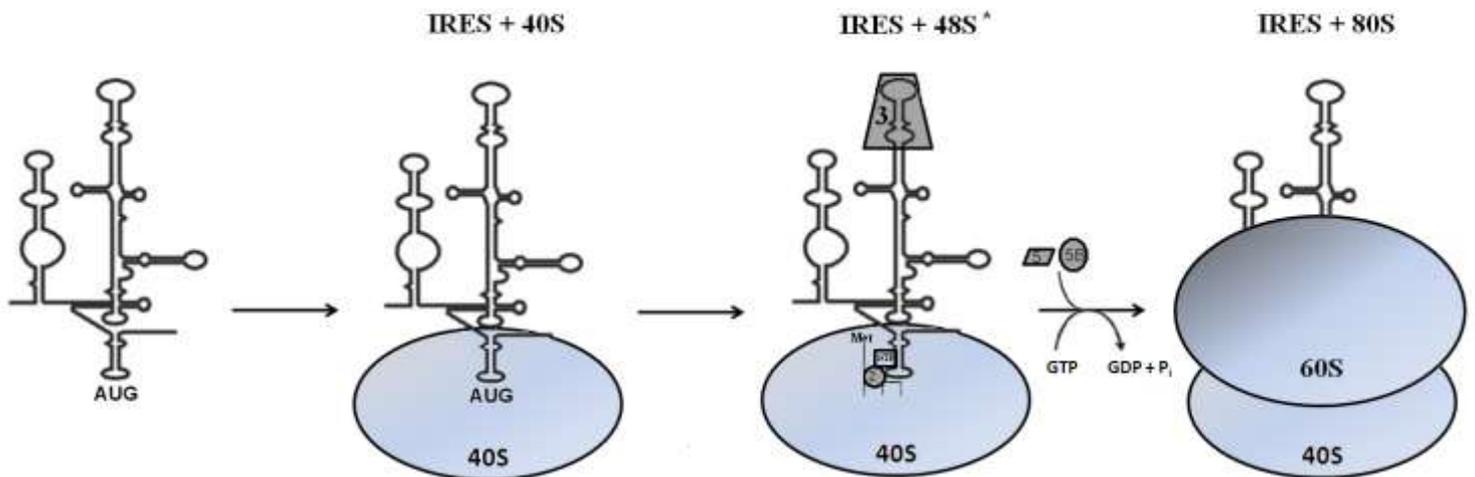


Figure 12 : Mécanisme d'initiation de la traduction par l'IRES du VHC

Plusieurs facteurs d'initiation de la traduction sont impliqués dans l'initiation de la traduction IRES-dépendante. Le facteur d'initiation eIF3 peut interagir avec le domaine IIIb, en l'absence des facteurs eIF4A, eIF4B et eIF4F, qui sont nécessaires pour l'accrochage du ribosome lors de la traduction coiffe-dépendante ou EMCV-IRES-dépendante (Kieft, Kolupaeva, Pestova, Sizova). La fixation de eIF3 n'est pas nécessaire à l'association de l'IRES avec la sous-unité ribosomale 40S, mais elle est nécessaire pour l'accrochage de la sous-unité 60S et la formation du ribosome actif 80S (Pestova et al., 1998) (Figures 12 et 13).

EIF2B γ et eIF2 γ ont également été identifiés comme des cofacteurs de la traduction IRES-dépendante du VHC par une approche de génomique fonctionnelle (Kruger et al., 2000), mais leur rôle n'a pas été identifié.

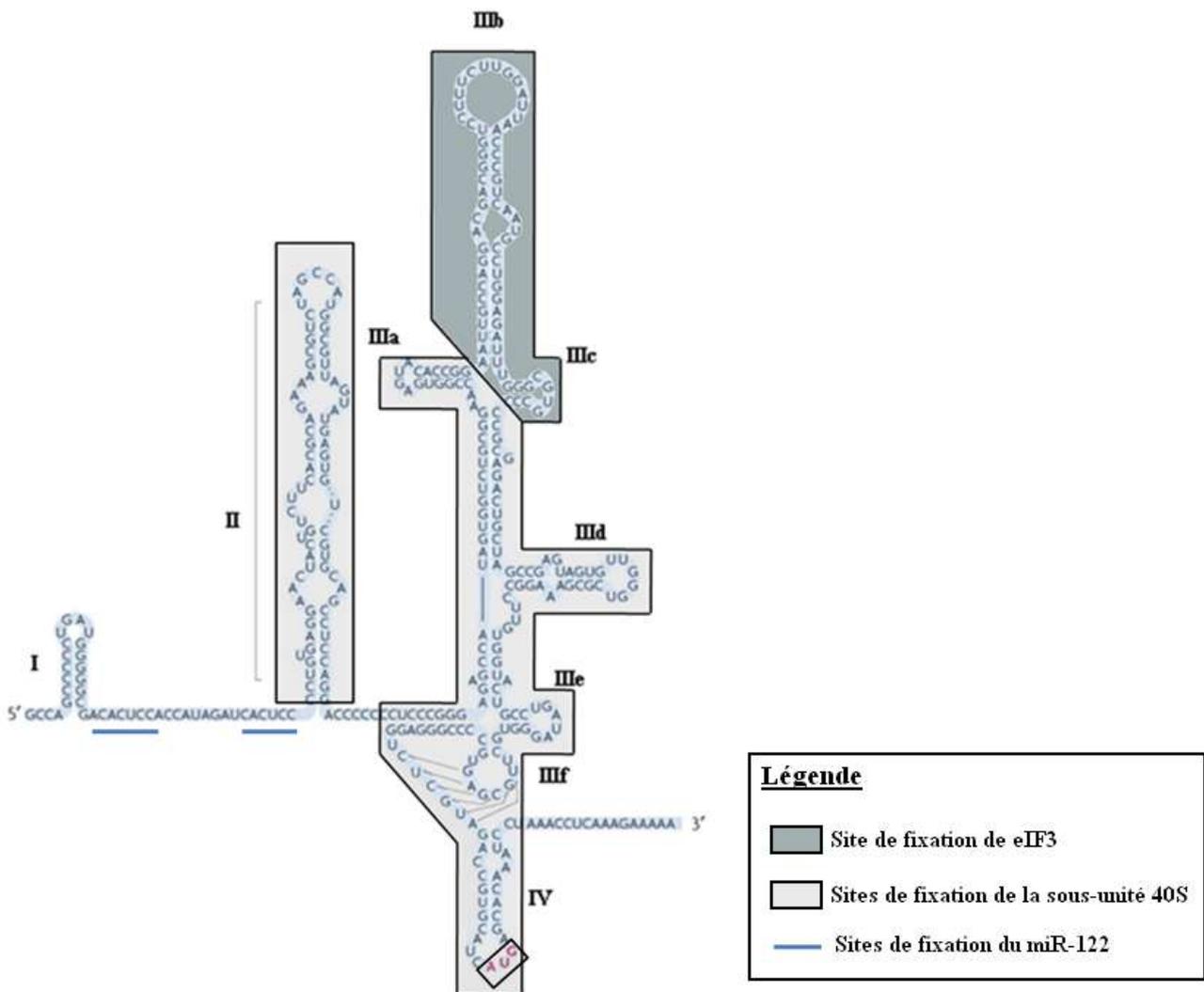


Figure 13 : Représentation de la structure de l'IRES avec les sites de fixation des éléments intervenant dans l'initiation de la traduction

3) Régulation de la traduction IRES-dépendante du VHC

3.1. Régulation de l'initiation de la traduction par des facteurs agissant en cis : les séquences virales

3.1.1. Rôle de la région 3'NC dans l'initiation de la traduction

Outre la région 5'NC, la région 3'NC, et particulièrement la région X, pourrait aussi jouer un rôle dans la traduction (Ito et al., 1998).

Lors de l'initiation de la traduction des ARNm cellulaires, ceux-ci se circularisent par interaction de la queue polyA avec le facteur d'initiation eIF4G, par l'intermédiaire de la protéine PABP. Cela permet l'augmentation de l'efficacité de l'initiation de la traduction (Craig et al., 1998). Ce mécanisme de circularisation est conservé chez certains virus, ainsi la traduction IRES-dépendante des picornavirus est médiée par l'interaction de la queue polyA avec PABP et eIF4G. De plus, il a été montré que la réplication des autres Flavivirus implique une circularisation de l'ARN. Même si l'ARN du VHC ne comporte pas de queue polyA, le modèle circulaire pourrait être conservé pour la traduction IRES du VHC par la présence de séquences d'ARN et de protéines remplaçant fonctionnellement la queue polyA et PABP (Ito and Lai, 1999).

Plusieurs équipes ont montré que l'ajout de la région 3'NC après un gène rapporteur stimule la traduction IRES-dépendante (Bradrick et al., 2006; Bung et al., 2010; Ito et al., 1998; Lourenco et al., 2008; McCaffrey et al., 2002; Morikawa et al., 2006; Song et al., 2006; Wang et al., 2005; Weinlich et al., 2009). L'étude menée par Bradrick suggère que la 3'NC pourrait agir au niveau de la terminaison de la traduction, et non de l'initiation, et pourrait favoriser le recyclage du ribosome pour une nouvelle initiation de la traduction (Bradrick et al., 2006).

Ces résultats sont contredits par des études ne mettant en évidence aucun effet de la 3'NC sur la traduction (Fang and Moyer, 2000; Imbert et al., 2003; Kong and Sarnow, 2002), ou même une diminution de la traduction IRES-dépendante suite à l'ajout de la 3'NC (Murakami et al., 2001).

Ces résultats contradictoires pourraient encore une fois être dus à l'emploi de systèmes d'études différents, il est en effet crucial d'utiliser une région 3'NC avec une fin exacte (elle doit se terminer exactement comme la 3'NC du VHC, et ne doit pas être suivie de séquence supplémentaire comme une queue polyA). De plus, il semble que l'effet positif de la 3'NC sur la traduction ne soit détectable qu'avec un système rapporteur monocistronique, et cet effet est plus important quand la forme ARN est utilisée (sans coiffe en 5') (Song et al., 2006).

L'interaction entre l'IRES et la région 3'NC se fait probablement par le biais de protéines cellulaires, les niveaux de traduction sont donc logiquement différents lors de traduction *in vitro* (RRL, lysat de réticulocyte de lapin), et selon la lignée cellulaire utilisée.

L'augmentation de la traduction IRES-dépendante du VHC par la 3'NC pourrait avoir lieu par l'intermédiaire de la protéine PTB (polypyrimidine tract-binding protein), qui se fixe à la fois à la 5'NC et à la 3'NC (Ali and Siddiqui, 1995; Ito and Lai, 1997; Tsuchihara et al., 1997). PTB pouvant interagir avec elle-même, elle pourrait ainsi permettre la circularisation du génome viral, stimulant ainsi la traduction. D'autres protéines cellulaires se fixant à la fois sur les régions 5' et 3'NC, La, IGF2BP1, PCBP2, NFAR et hnRNPL, pourraient intervenir dans la circularisation du génome (Isken et al., 2007; Tingting et al., 2006; Weinlich et al., 2009).

Il a d'autre part également été montré que les séquences codant pour les protéines d'enveloppe, et particulièrement E2, augmentent d'un facteur 10 la stimulation de la traduction IRES-dépendante médiée par la région 3'NC (Morikawa et al., 2006).

Il pourrait aussi exister des variations selon le génotype des séquences utilisées, il a en effet été rapporté qu'une augmentation de la traduction a lieu lors de l'ajout d'une séquence E2 de génotype 1b, et qu'elle est bien moindre avec une séquence E2 de génotype 1a (Morikawa et al., 2006).

3.1.2. Séquence de la capsid

Le domaine IV de l'IRES s'étend dans la séquence codante pour englober les 10 premiers nucléotides du gène de la capsid. Des études fonctionnelles ont montré que l'IRES nécessite une courte séquence de la région codante de la capsid (jusqu'à 30 nucléotides) pour fonctionner de manière optimale (Honda et al., 1996; Hwang et al., 1998). Pourtant, une séquence IRES s'arrêtant juste après le codon d'initiation (sans la séquence de la capsid) peut également initier la traduction de façon efficace (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Ces différences pourraient être dues aux différences de systèmes rapporteurs utilisés, la présence de structures secondaires après l'IRES, dans le gène rapporteur, influencerait l'activité de l'IRES.

Cette région proximale de la capsid contient une séquence riche en adénosines, qui est connue pour recruter une protéine cellulaire qui augmente l'activité de l'IRES, NSAP1 (Kim et al., 2004b). Deux structures tige-boucles situées dans cette région sont également importantes pour la traduction (Vassilaki et al., 2008).

La séquence de la capsidite située plus en aval est responsable d'une inhibition de l'activité de l'IRES (Wang et al., 2000), probablement par la fixation de PTB (cette inhibition étant levée en présence de la région 3'NC)(Ito and Lai, 1999) ou par une interaction ARN-ARN (Kim et al., 2003).

3.2. Régulation de l'initiation de la traduction par des facteurs agissant en *trans*

3.2.1. Régulation de l'initiation de la traduction par des protéines virales

La traduction par l'IRES du VHC est relativement faible par rapport à celle des autres virus (Borman et al., 1995), elle est par exemple environ 6 fois moins efficace que celle de l'IRES du VEMC. Il se pourrait que le VHC ait un mécanisme d'auto-modulation pour maintenir des niveaux de traduction et de réplication bas, qui pourraient favoriser la persistance virale.

3.2.1.1. Protéine de capsidite

La protéine de capsidite peut se fixer à plusieurs sites dans l'IRES, et cette interaction pourrait inhiber la traduction IRES-dépendante (Shimoike et al., 1999; Zhang et al., 2002)

Cette inhibition pourrait se faire par l'interaction de la capsidite avec le domaine IV de l'IRES entraînant sa stabilisation (Honda et al., 1996).

Il a également été suggéré que ce serait la séquence codant pour la capsidite, et non la protéine de capsidite elle-même, qui serait responsable de l'inhibition de la traduction IRES, comme nous l'avons vu plus haut.

D'autres études, par contre, montrent que la protéine de capsidite augmente la traduction (Boni et al., 2005; Lourenco et al., 2008).

D'autre part, la protéine de capsidite interagit à la fois avec la 5'NC et la 3'NC (Yu et al., 2009), elle pourrait donc être impliquée, avec des protéines cellulaires, dans l'interaction entre la 3'NC et la 5'NC.

3.2.1.2. Protéines non-structurales

Les protéines NS4A et NS4B inhibent la traduction IRES-dépendante, ainsi que la traduction cellulaire (Kato et al., 2002a). Une inhibition de la traduction par NS5A a

également été rapportée (Kalliampakou et al., 2005). Par contre, une autre étude démontre un effet stimulant de NS4B et NS5A sur la traduction (He et al., 2003).

Ces résultats contradictoires pourraient être dus à l'utilisation de modèles d'études, la fusion de séquences hétérologues (présentant des structures secondaires) directement après le codon d'initiation pourrait être délétère à la fonction de l'IRES (Rijnbrand et al., 2001).

3.2.1.3. Stimulation indirecte de la traduction IRES-dépendante

Les protéines virales E2 et NS5A pourraient avoir un effet indirect sur la traduction IRES-dépendante en inhibant PKR (Gale et al., 1997; He et al., 2003; Taylor et al., 1999). L'activation de PKR lors d'une infection virale entraîne la phosphorylation de eIF2 α , et la diminution de la traduction cellulaire, et possiblement aussi de la traduction virale. La perturbation de cette voie par E2 et NS5A peut donc avoir des conséquences sur la traduction IRES-dépendante.

3.2.2. Régulation de l'initiation de la traduction par des protéines cellulaires : les ITAFs

Outres les facteurs d'initiation de la traduction canoniques (la sous-unité ribosomale 40S, eIF3, eIF5 et eIF5B), l'IRES du VHC recrute également des facteurs cellulaires de traduction non-canoniques, comme les protéines La et PTB, qui pourraient réguler la traduction.

La protéine La (lupus autoantigen) est une protéine pouvant se fixer à l'ARN, appartenant à la superfamille des RRM (RNA recognition motif). Elle est impliquée dans plusieurs processus cellulaires, notamment la terminaison de la transcription par l'ARN polymérase III (Gottlieb and Steitz, 1989), et dans l'initiation de la traduction des picornavirus et des Flavivirus (et de l'ARNm cellulaire Bip, possédant un IRES). La protéine La peut se fixer à l'IRES du VHC et augmente significativement la traduction du VHC *in vitro* (Ali and Siddiqui, 1997; Costa-Mattioli et al., 2004; Pudi et al., 2004). L'inhibition de l'activité IRES par la séquestration de La est restaurée par l'addition de protéine La purifiée.

Il a été proposé que l'activité ATPase ARN-dépendante de La pourrait transformer la tige-boucle IV en structure simple brin, ce qui est favorable à la fixation du 40S et à la formation du complexe actif d'initiation de la traduction. De plus, La pourrait augmenter la

fixation de la protéine ribosomale S5 sur l'IRES, qui, à son tour, facilite la formation du complexe 40S-IRES (Pudi et al., 2004).

Une autre étude suggère que La pourrait aussi être impliquée dans la réplication du virus (Domitrovich et al., 2005).

La protéine PTB (pyrimidine tract binding protein) interagit avec 3 séquences différentes de l'IRES du VHC, riches en pyrimidines (Ali and Siddiqui, 1995). Ces interactions ont été confirmées par microscopie électronique (Beales et al., 2001). Le rôle de PTB dans la traduction IRES-dépendante du VHC est toujours controversé. Certaines études montrent une stimulation de la traduction IRES-dépendante par cette protéine (Ali and Siddiqui, 1995; Domitrovich et al., 2005; Gosert et al., 2000). Dans l'étude d'Ali, la déplétion de PTB entraîne l'inhibition de la traduction IRES-dépendante, mais celle-ci n'est pas restaurée par l'addition de PTB purifiée, suggérant que d'autres facteurs associés à PTB (déplétés en même temps) sont également nécessaires. Une autre étude démontre que la protéine PTB se fixe à l'extrémité 3' de la séquence de la capsid et régule négativement la traduction (Ito and Lai, 1999).

Comme nous l'avons évoqué plus haut, PTB pourrait être impliquée dans la circularisation du génome du VHC lors de l'initiation de la traduction. PTB interagit à la fois avec la région 5'NC et avec la région X de la région 3'NC (Ito and Lai, 1997; Tsuchihara et al., 1997), et augmente de cette façon la traduction (Ito et al., 1998). Par contre, les résultats obtenus avec le système réplicon ne montrent aucun effet de PTB sur la traduction IRES du VHC (Tischendorf et al., 2004).

Outre PTB (appelé aussi hnRNPI, heterogenous nuclear ribonucleoprotein I), d'autres protéines de la famille hnRNP interagissent avec l'IRES du VHC. Les protéines de cette famille se fixent aux ARNm immatures et sont impliquées dans la présentation de ces ARN au complexe d'épissage ou leur transport dans le cytoplasme.

HnRNP L interagit avec la partie 3' de l'IRES dans la séquence de la capsid, sa fixation est corrélée avec l'efficacité de la traduction IRES (Hahm et al., 1998), et il a été montré qu'elle est nécessaire à la traduction IRES-dépendante du VHC (Hwang et al., 2009).

La protéine hnRNP Q, aussi appelée SYNCRIP, ou NSAP1 (mouse minute virus nonstructural protein NS1-associated protein 1), stimule la traduction par interaction avec une

région riche en adénosines dans la région 5' proximale de la séquence de la capsid (Kim et al., 2004b). Cette protéine serait également impliquée dans la réplication (Liu et al., 2009a).

HnRNP D, protéine impliquée dans diverses fonctions et pouvant faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, interagit avec le domaine II de l'IRES du VHC et stimule elle aussi la traduction (Paek et al., 2008).

La protéine poly(rC)-binding (PCBP2) (ou hnRNPE2) est impliquée dans la régulation de l'expression de plusieurs ARN viraux (poliovirus) et cellulaires. Elle interagit avec l'extrémité 5' du domaine I de l'IRES du VHC, mais n'a pas d'effet sur la traduction (Fukushi et al., 2001a). Etant donné l'implication du domaine dans la réplication, PCBP-2 pourrait être impliquée dans la régulation de la réplication plutôt que dans celle de la traduction.

Enfin, grâce à une approche de génomique fonctionnelle, la sous-unité α du protéasome PSMA7 a été identifiée comme impliquée dans la traduction IRES-dépendante (Kruger et al., 2001), mais on ne sait pas si cette protéine agit directement sur l'IRES ou indirectement en régulant des protéines cellulaires.

3.3. Régulation de la traduction IRES-dépendante lors du cycle cellulaire

L'efficacité de la traduction IRES-dépendante du VHC varie au cours du cycle cellulaire. Elle est plus importante pendant la phase de mitose (G2/M) (Honda et al., 2000), alors que la traduction coiffe-dépendante diminue durant la mitose. Par contre, la traduction du VHC est moins importante durant les phases G0, G1 et S du cycle cellulaire.

C'est aussi le cas pour des gènes cellulaires possédant une IRES, traduits activement pendant la mitose alors que la traduction coiffe-dépendante est diminuée (Cornelis et al., 2000; Pyronnet et al., 2000).

3.4. Régulation de la transition entre traduction et réplication

Chez le VHC, les régions 3'NC et 5'NC sont impliquées dans la régulation à la fois de la transcription et de la traduction, et il y a un chevauchement important des séquences servant à la traduction et à la réplication. Une question clé est donc de savoir comment la structure de ces éléments est modifiée (par des interactions ARN-ARN ou protéine-ARN) pour que l'ARN puisse être utilisé pour la réplication, ou la traduction.

Chez le poliovirus, le « switch » entre réplication et traduction est médié par la protéine PCBP, qui augmente la traduction en se fixant au 3'NC, et la 3CD polymérase, qui déclenche

la synthèse d'ARN négatif en se fixant à la même structure, en modifiant probablement sa structure (Gamarnik and Andino, 2000). Il a été montré que PCBP1 et PCBP2 se fixent sur le 5'NC de HCV, PCBP2 se fixant sur la boucle I, ce qui suggère un rôle similaire de ces protéines dans la régulation de la transition entre réplication et traduction (Fukushi et al., 2001a).

La protéine FBP (FUSE binding protein) se fixe sur la région 3'NC et régule à la fois la réplication (de façon positive) et la traduction (de façon négative), c'est donc également un candidat pour la régulation de cette transition (Zhang et al., 2008).

Il a aussi été suggéré que la protéine de capsid pourrait être impliquée dans le switch, en diminuant la traduction IRES dépendante et permettant ainsi l'initiation de la réplication (Shimoike et al., 1999; Zhang et al., 2002).

Puisque la plupart des protéines se fixant sur la 3'NC et la 5'NC régulent à la fois la réplication et la traduction, il est possible que le ratio relatif de ces différentes protéines contrôle la transition entre traduction et réplication.

4) Implications de la variabilité de la séquence de l'IRES

4.1. Variabilité et compartimentation de l'IRES

4.1.1. Variabilité de l'IRES du VHC

L'IRES du VHC est la région de son génome la plus conservée, mais il existe néanmoins des variations dans sa séquence, qui ont en général une influence sur la fonction de l'IRES. Ainsi, les IRES des différents génotypes n'ont pas la même efficacité à initier la traduction : l'IRES du génotype 2b est le plus efficace, alors que celui du génotype 6a est le moins efficace. Il n'y a pourtant que 17 nucléotides différents entre ces deux IRES, entraînant une différence d'activité de plus de 2 fois (Collier et al., 1998). Cela est dû au fait que de petites variations au niveau de la structure secondaire de l'IRES ont des effets importants sur l'initiation de la traduction. Cependant, ces différences traductionnelles ne dépendent pas forcément du génotype, mais plutôt de la séquence nucléotidique de l'isolat en particulier. Une étude de 19 variants naturels de l'IRES a montré que l'efficacité traductionnelle dépend de la structure secondaire, mais aussi de la séquence nucléotidique (primaire), les mutations intervenant dans le domaine IIIId de l'IRES ayant le plus de conséquences fonctionnelles (Barria et al., 2009). La séquence nucléotide peut être importante pour des interactions

éventuelles entre cette boucle et d'autres domaines de l'IRES, ou pour la fixation de la sous-unité ribosomale 40S qui se fixe sur ce domaine III_d.

Une interaction ARN-ARN pourrait exister entre la séquence codant pour la capsidie et le domaine I de l'IRES, 2 substitutions nucléotidiques dans cette région expliquant l'activité traductionnelle réduite des IRES de génotype 1b (Honda et al., 1999b). Il a en effet été montré que le codon AG en position 34-35 a un effet inhibiteur, seulement quand la séquence de la capsidie est présente. Des séquences en dehors de l'IRES (avant et après) influencent donc la traduction IRES-dépendante.

4.1.2. Compartimentation des variants IRES

Des variants VHC spécifiques (différents de ceux retrouvés dans le plasma ou le foie) ont pu être isolés du système nerveux central de patients (SNC) (Forton et al., 2004). Par contre, les variants du SNC et des nœuds lymphatiques étaient semblables. Des clones isolés dans le SNC présentent la mutation C204A et G243A, déjà associée à des isolats lymphotropes présentant une efficacité de traduction réduite dans les hépatocytes (en association avec G107A). Cela pourrait entraîner un phénomène de latence (non détection par le système immunitaire), car la production de particules virales a lieu à très bas niveau. En effet, un variant est sélectionné par le système immunitaire seulement sur ses protéines traduites. Donc, avec un faible taux de traduction, on peut s'attendre à une augmentation de la diversité des séquences, car il y aura moins de sélection par le système immunitaire (c'est le cas dans cette étude avec plus de variabilité parmi les variants du SNC et des nœuds lymphatiques que parmi ceux du sérum et du foie). Il pourrait donc y avoir une possible réplication dans ces compartiments, à plus bas niveau que dans le foie, ce qui expliquerait les rechutes après traitement (le SNC et les cellules dendritiques sont moins accessibles aux traitements).

Nakajima rapporte l'existence d'un variant adapté aux lymphocytes : 2 lignées lymphocytaires ont été infectées par un mélange de 13 variants de la souche H77, et au bout d'un an un seul variant persistait dans ces cultures (Nakajima et al., 1996). Ce variant, déterminé au niveau de la région HRV, a été retrouvé également dans les PBMC d'un chimpanzé infecté avec le même inoculum, alors que beaucoup d'autres variants étaient présents dans le foie (Shimizu et al., 1997). La région 5'NC de ce variant, qui comprend 3 substitutions nucléotidiques (G107A, C204A et G243A), a été testée pour son efficacité de

traduction dans différentes lignées cellulaires, et présente une efficacité de traduction plus importante dans certaines lignées lymphocytaires (Lerat et al., 2000).

Laporte et son équipe ont étudié les différents IRES de la quasispèce présente dans le sérum, et montré que les différents variants ont des efficacités traductionnelles différentes selon le type cellulaire (Laporte et al., 2000).

Un variant IRES présent dans les cellules dendritiques (CD) s'avère moins efficace à initier la traduction que les variants provenant du sérum ou des PBMC, et ce dans plusieurs lignées cellulaires (même dans une lignée de CD) (Laporte et al., 2003).

4.2. Implications cliniques de la variabilité de l'IRES

4.2.1. Traduction IRES-dépendante du VHC et interféron

Le traitement actuel de l'infection par le VHC repose principalement sur l'utilisation d'interféron α . Les études de cinétique de la réplication du VHC lors d'un traitement par interféron, reposant sur des mesures régulières de la concentration d'ARN viral et la modélisation mathématique des données ont permis d'émettre des hypothèses sur ses mécanismes d'action (Zeuzem, 2001). Durant le traitement, la concentration d'ARN viral décroît selon une cinétique biphasique : la première phase, survenant au cours des 48 premières heures, correspond à l'arrêt de la réplication par un effet antiviral direct et non spécifique et la deuxième phase, plus lente, correspond à la destruction des cellules infectées par le système immunitaire.

L'interféron pourrait également avoir un effet sur la traduction du virus, il a en effet été montré que l'interféron diminue la traduction IRES dépendante du VHC, par un mécanisme indépendant de l'activation de PKR et la phosphorylation de eIF2 α (mécanisme classique par lequel l'interféron provoque une diminution de la traduction virale et cellulaire).

Plusieurs études ont montré que le VHC active la protéine PKR, sans que cela n'entraîne une baisse de sa traduction, au contraire de la traduction coiffe-dépendante ou de la traduction IRES-dépendante du VEMC (Garaigorta and Chisari, 2009; Rivas-Estilla et al., 2002; Shimoike et al., 2009). Il semble en effet que l'IRES du VHC pourrait initier la traduction même en présence de eIF2 α phosphorylé. En fait, l'IRES du VHC pourrait fonctionner quand la quantité de complexe ternaire disponible est fortement réduite (Robert et al., 2006), voire même sans aucun facteur d'initiation de la traduction (Lancaster et al., 2006).

Une autre étude rapporte au contraire un blocage de la protéine PKR par l'IRES, la différence pourrait venir de la quantité d'ARN viral utilisée (Vyas et al., 2003). Les conclusions de cette étude sont cependant les mêmes : la traduction IRES-dépendante du VHC est moins sensible à l'inhibition par PKR que la traduction coiffe-dépendante.

Lors du traitement d'une cellule avec de l'interféron, l'inhibition de la traduction IRES-dépendante du VHC est cette fois plus intense que la traduction cellulaire, indiquant qu'il doit exister un autre mécanisme d'inhibition de la traduction par l'interféron que l'activation de PKR et la phosphorylation de eIF2 α . Ce blocage de la traduction IRES-dépendante pourrait avoir lieu par la diminution de l'expression de la protéine La (Shimazaki et al., 2002), ou un blocage de eIF3 par la protéine P56 (Wang et al., 2003). D'autres mécanismes pourraient également exister (Kato et al., 2002b).

4.2.2. Variabilité de l'IRES et interféron

L'interféron (α , β ou γ) peut inhiber la traduction IRES-dépendante du VHC, quel que soit le génotype (Dash et al., 2005; Hazari et al., 2005). Il semble néanmoins que la sensibilité de l'IRES à l'interféron puisse être modulée par des variations de sa séquence (Yasmeen et al., 2006). Dans cette étude, les variants IRES (de génotype 3) provenant de patients non-répondeurs avaient une activité traductionnelle plus élevée et une sensibilité moindre à l'inhibition par l'interféron que ceux provenant de patients répondeurs. Par contre, une autre étude ne montre aucune relation entre l'efficacité traductionnelle et la réponse au traitement (Saiz et al., 1999).

Pourtant, d'autres études n'ont pas trouvé de relation entre le nombre de mutations dans l'IRES et le taux d'ARN dans le sérum, la réponse au traitement interféron ou l'avancée de la fibrose hépatique (Nakazawa et al., 1994; Thelu et al., 2004; Yamamoto et al., 1997). Par contre, il semble que certaines mutations dans la séquence de l'IRES ne soient retrouvées que chez des patients non-répondeurs ou répondeurs-rechuteurs (Magrin et al., 1996; Thelu et al., 2007).

Il faut aussi noter qu'il ne semble pas y avoir de modification de la quasiespèce de la région 5'NC avant et après traitement interféron (Soler et al., 2002).

IV. Interactions entre le VHC et la cellule hôte

Les relations existant entre un virus et la cellule hôte qu'il infecte sont complexes, et comprennent d'une part la réponse de l'hôte contre l'infection, en particulier la réponse interféron qui est la première ligne de défense antivirale, non spécifique, et d'autre part la modification des voies cellulaires par le virus. Le virus exploite la machinerie cellulaire de l'hôte pour assurer la production de ses propres protéines virales.

Le mécanisme qui permet au VHC de persister dans les hépatocytes et de provoquer une infection chronique est mal connu. Il passe, entre autres, par la perturbation de la réponse interféron de l'hôte.

De plus, l'infection chronique par le VHC et la cirrhose qu'elle provoque sont associées à l'évolution possible d'un carcinome hépatocellulaire, et il semblerait que le virus puisse avoir un rôle direct dans la transformation maligne.

1) Interactions entre le VHC et la réponse immunitaire de l'hôte

L'infection par le VHC devient le plus souvent chronique (80 % des cas), indiquant que la réponse immunitaire est souvent inefficace contre ce virus. Le fort taux de mutations du virus et une mauvaise réponse immunitaire de l'hôte pourraient être impliqués dans ce phénomène.

1.1. Perturbation de la réponse interféron

La réponse interféron est une défense non spécifique de l'hôte qui intervient en réponse à une infection virale. Elle est déclenchée par la détection dans la cellule de motifs poly-uridine et d'ARN doubles brins (ou d'ARN repliés en structures secondaires), éléments spécifiques des virus (appelés PAMP, pathogen associated molecular pattern). Deux récepteurs, le TLR-3 (Toll like récepteur 3) (Alexopoulou et al., 2001) et RIG1 (Sumpter et al., 2005) détectent ces structures virales et activent deux voies indépendantes entraînant l'activation de facteurs de transcription (IRF-3 et NF-KB), qui activent la transcription de gènes entraînant la sécrétion d'interféron α et β , puis la transcription de gènes de défense antiviraux par la voie Jak/STAT3 (Gale, 2003). Cette réponse entraîne la baisse de la réplication et de la traduction virales.

L'infection par le VHC induit l'activation de la réponse interféron, car la région polyU/UC de la 3'NC ainsi que les structures secondaires d'ARN présentes dans les régions 5'NC et 3'NC sont reconnus par les récepteurs PAMP (Saito et al., 2008). Des protéines du

VHC pourraient également entraîner l'activation de la voie interféron : la protéine NS5A induit un stress oxydatif qui entraîne l'activation de STAT3 (Gong et al., 2001) ; certains variants de la protéine de capsid (présents dans les tumeurs) activent PKR, un effecteur dont l'expression est induite par l'interféron (Delhem et al., 2001).

Le VHC possède plusieurs stratégies pour moduler et échapper à cette réponse de la cellule. Ainsi, la protéine NS3-4A bloque les voies de signalisation RIG1 et TLR3, empêchant l'activation des voies IRF-3 et NF- κ B (Foy et al., 2005). La protéine de capsid perturbe la voie de signalisation induite par l'interféron Jak/STAT (par l'expression de SOCS-3, inhibiteur de STAT1) (Figure 14).

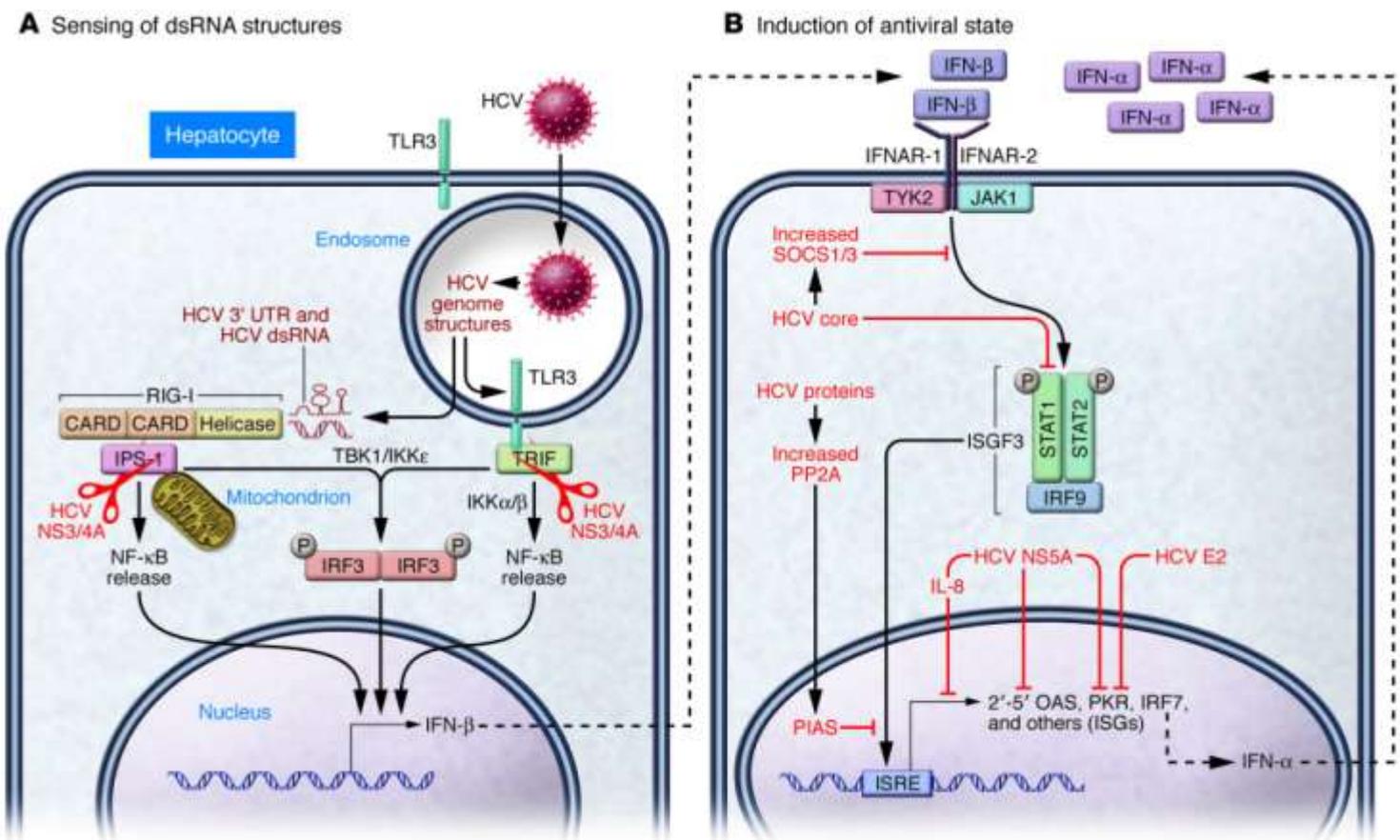


Figure 14 : Action des protéines virales sur la réponse interféron

(Rehermann, *Journal of Clinical Investigation*, 2009)

Le déclenchement de la réponse interféron en réponse à la présence d'ARN viral dans la cellule est représenté à gauche. La cascade de la réponse interféron est représentée dans la partie droite de la figure. L'action des protéines virales sur ces voies cellulaires est représentée. Les ciseaux représentent le clivage des protéines cellulaires TRIF et IPS-1 par la protéase virale NS3-4A.

La protéine kinase PKR, dont la transcription est induite par l'interféron, est activée par l'ARN double brin (mais aussi par les cytokines, les facteurs de croissance et le stress cellulaire). Une fois activée, elle entraîne la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , ce qui provoque une inhibition générale de la traduction. Les protéines virales NS5A et E2 interagissent avec la protéine PKR et inhibent son activation.

La variabilité des séquences virales de ces protéines influence leur capacité à bloquer la réponse interféron, et la diversification du virus en quasiespèce est également un mécanisme d'échappement à la réponse antivirale.

Le VHC perturbe également le complément, composant de la réponse immunitaire innée. Les protéines du complément sont une trentaine de protéines plasmatiques et membranaires, qui circulent sous forme inactive. Lors de la reconnaissance d'un antigène, elles sont activées en cascade et assurent divers rôles de la réponse immunitaire. La protéine de capsid perturbe l'activation du complément en se fixant sur le récepteur de la protéine C1q ce qui entraîne un défaut d'activation des lymphocytes T (Kittlesen et al., 2000).

1.2. Réponse immunitaire adaptative

La réponse des lymphocytes T puis B est retardée lors de l'infection par le VHC, sans qu'une explication claire n'ait été trouvée. Parmi les explications possibles on peut citer la modulation de la réponse interféron (réponse immunitaire innée) par le VHC, qui pourrait influencer la mise en place de l'immunité adaptative, par ailleurs l'apparition de nouveaux variants échappant aux CD8 (Timm et al., 2004), et au CD4 (Puig et al., 2006) a été documentée, et le virus pourrait aussi interagir directement avec certaines cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques (Sarobe et al., 2003) (Figure 15).

Il est à noter que l'altération de la réponse immunitaire est VHC-spécifique, il n'y a pas d'immunodépression associée à l'infection par le VHC.

La réponse immunitaire serait quand même partiellement efficace contre le VHC car le virus peut être éliminé dans 20% des cas, et l'infection est plus grave chez les patients immunodéprimés (en particulier dans les cas de co-infection VHC et VIH).

La comparaison de la réponse immunitaire chez les patients résolvant l'infection ou évoluant vers la chronicité a permis de formuler quelques hypothèses concernant les facteurs nécessaires à l'élimination du virus.

Des anticorps neutralisants, spécifiques de la souche infectante, sont produits, même pendant l'infection chronique. Il semblerait que la résolution de l'infection s'accompagne d'une forte réponse humorale précoce, disparaissant ensuite (et ne conférant pas de protection contre une réinfection (Farci et al., 1992)), alors que les patients évoluant vers la chronicité produisent des anticorps plus tardivement, et pendant toute la durée de l'infection (Logvinoff et al., 2004; Pestka et al., 2007). Les premiers anticorps produits sont dirigés contre NS3 et la capside, puis contre NS4 et E1/E2. En particulier, la région hypervariable (HVR) de E2 est une cible majeure pour les anticorps. Les études avec des pseudoparticules ont montré que ces anticorps neutralisent l'entrée du virus dans la cellule ((Bartosch et al., 2003). Cette production d'anticorps lors de l'infection chronique exerce une pression de sélection sur les variants viraux. Par ailleurs, ces anticorps sont responsables des cryoglobulinémies mixtes apparaissant fréquemment lors des infections chroniques par le VHC.

Les lymphocytes semblent nécessaires à l'élimination du virus (notamment par la sécrétion d' $\text{IFN}\gamma$). Plus particulièrement, une forte réponse CD4^+ et CD8^+ semble nécessaire: les patients qui élimineront le virus présentent une forte réponse cytotoxique (dirigée contre de nombreux épitopes du virus), alors que ceux qui évolueront vers la chronicité ont une réponse T plus faible (et avec un spectre d'épitopes réduits) (Lechner et al., 2000). La réponse lymphocytaire CD4^+ en particulier, est importante, car sans elle, les réponses CD8^+ et humorales sont inefficaces (Grakoui et al., 2003; Kaplan et al., 2007).

Il existe également une faible immunité mémoire, permettant une élimination plus rapide du virus lors d'une réinfection (Mehta et al., 2002).

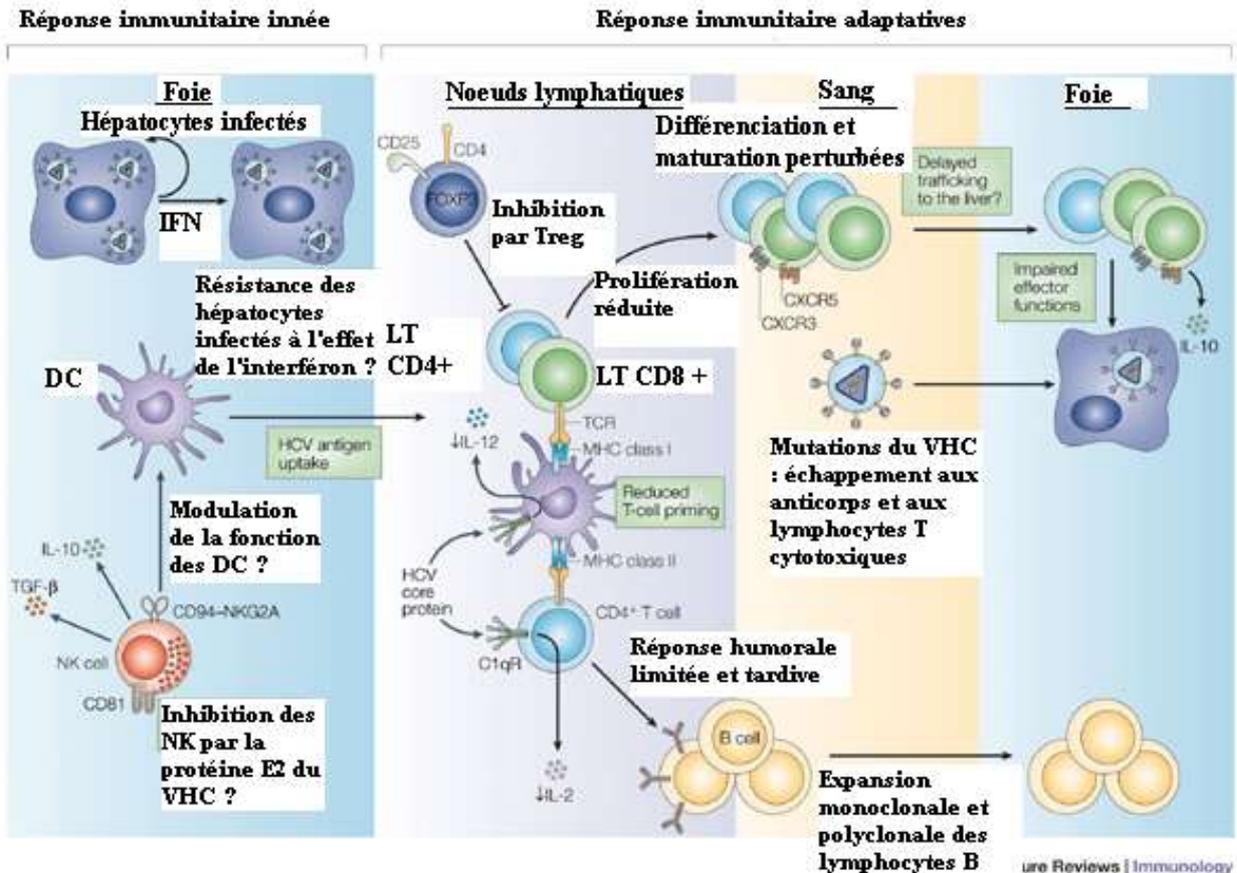


Figure 15 : Réponse immunitaire de l'hôte et sa perturbation par le VHC

(Rehermann et al, Nature Rev Immunology, 2005)

Les principaux mécanismes de la réponse immunitaire contre le VHC sont représentés, au niveau du foie, des nœuds lymphatiques et du sang. Les perturbations de la réponse immunitaire lors de l'infection par le VHC sont indiquées dans les encadrés.

1.3. Essais de vaccins

L'inefficacité de la réponse immunitaire contre le VHC dans 80% des cas pose un problème pour la mise au point d'un vaccin. De plus, le virus étant très variable, il faudrait pouvoir induire des anticorps dirigés contre une région conservée du virus, pour que le vaccin soit efficace contre tous les génotypes. Enfin, des variants d'échappement à ces anticorps risquent d'apparaître.

Des essais vaccinaux ont été réalisés contre la protéine de capsid, E1, E2 et NS3, qui contiennent des épitopes conservés parmi les différents génotypes.

Un essai contre E1 et E2 a été réalisé chez des chimpanzés, en utilisant un vecteur vaccine recombinant, qui induit une bonne réponse immunitaire. Ces essais ont conduit à une petite amélioration de la réponse immunitaire lors d'une infection avec un virus de la même souche, mais pas pour un virus HCV différent (Choo et al., 1994). Les vaccins à ADN (Forns et al., 2000), comme les vaccins à partir de peptides, induisent une élimination plus rapide du virus chez le chimpanzé, mais pas d'immunité stérilisante, les anticorps neutralisants n'étant pas suffisants pour éliminer le virus.

Une autre stratégie vaccinale est l'utilisation de particules virus-like (baculovirus recombinant exprimant les protéines structurales du VHC, E1, E2 et capsid). Dans une étude chez la souris, celles-ci induisent une meilleure immunité que celles obtenues avec les vaccinations ADN (Murata et al., 2003).

2) Interaction des protéines virales avec les voies cellulaires

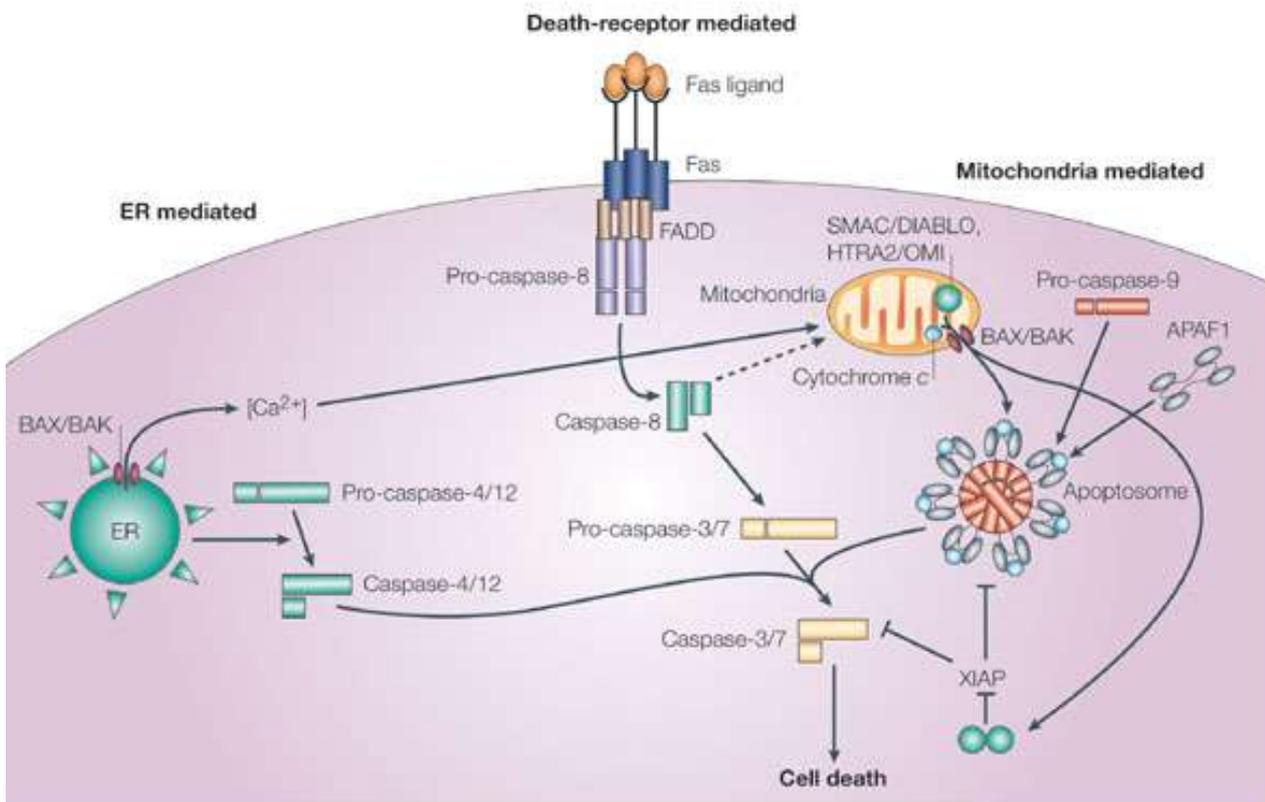
Les protéines virales interagissent avec plusieurs protéines et voies cellulaires, la capsid et NS5A étant les plus impliquées.

Les études de la modulation des voies cellulaires de l'hôte par le VHC sont souvent contradictoires, car elles se font généralement par expression d'une seule protéine dans une lignée cellulaire, parfois à une forte concentration, qui ne reflète pas son niveau de production par le VHC dans les hépatocytes infectés. De plus, l'interaction entre les protéines virales entre elles n'est pas prise en compte (ni les éventuels synergies ou antagonismes de leurs actions sur les voies cellulaires). Les études sur le système réplicon sont un peu plus complètes, mais le même reproche peut être fait aux réplicons sub-génomiques. D'autre part, il ne faut pas oublier que les réplicons (même complets) ne produisent pas de particules virales : l'action de l'entrée du virus et du bourgeonnement des particules produites n'est donc pas étudiée. De plus, ces réplicons possèdent des mutations adaptatives qui leur permettent de se répliquer dans les lignées cellulaires, les protéines virales produites présentent donc des mutations et peuvent avoir une action différente sur la cellule hôte des protéines produites par des souches naturelles. Il a en effet été montré que l'action sur l'hôte varie beaucoup selon le génotype de la protéine virale.

La souche JFH1 est le meilleur modèle d'étude cellulaire existant actuellement (Wakita et al., 2005), mais il s'agit d'une souche très particulière, ne pouvant pas infecter la cellule de façon chronique. De plus, il est étudié dans une lignée cellulaire permissive à la réplication

(Huh7.5.1), défaillante pour RIG-1, les interactions virus-cellule sont donc un peu modifiées dans ce système.

2.1. Interactions avec les voies de l'apoptose



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 16 : Résumé des principales voies de l'apoptose

(Holcik, Nature review Mol Cell Biol, 2005)

Les principales voies de l'apoptose (médiée par les récepteurs de mort, par le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie) sont résumées dans ce schéma.

L'apoptose des cellules infectées est un mécanisme de défense antiviral. L'inhibition de l'apoptose par le VHC pourrait au contraire favoriser la persistance virale et la transformation tumorale.

Lors de l'infection chronique par le VHC *in vivo*, les hépatocytes subissent une augmentation de l'apoptose et une sur-expression des ligands CD95/Fas, TRAIL et TNF α ,

qui se fixent aux récepteurs de mort cellulaire et entraînent le déclenchement de l'apoptose (Lau et al., 1998).

Les effets pro- ou anti-apoptotiques ont été décrits pour presque toutes les protéines du VHC, et principalement pour la protéine de capsid et NS5A. On ne sait donc pas actuellement si les protéines virales ont un effet sur l'apoptose *in vivo*, et si cet effet est pro- ou anti-apoptotique.

2.1.1. Modulation de l'apoptose induite par les récepteurs de mort cellulaire

La **capsid** pourrait **inhiber l'apoptose** induite par les ligands TNF- α (Ray et al., 1998) et CD95. Elle pourrait inhiber également la voie TGF β par interaction avec le domaine de fixation à l'ADN de Smad3. Cette activité est dépendante de la séquence de la capsid (Pavio et al., 2005), et n'existe donc pas pour tous les génotypes.

NS5A **bloque aussi l'apoptose induite par TNF α** , par le blocage de la caspase 3 et des voies cellulaires en aval (Ghosh et al., 2000a). NS5A s'associe avec le complexe TRADD (qui s'associe au récepteur TNF α), et perturbe ainsi son association avec le complexe FADD. Ce blocage entraîne l'absence d'activation TNF-dépendante de NF- κ B (Park et al., 2002).

A l'inverse, une autre équipe montre que la capsid pourrait sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par Fas (Ruggieri et al., 1997).

2.1.2. Modulation de l'apoptose induite par la voie mitochondriale

La capsid pourrait induire l'apoptose par la voie mitochondriale, par relargage du cytochrome C et activation indirecte de Bax.

La protéine NS2 pourrait avoir l'effet inverse en interagissant directement avec la protéine pro-apoptotique CIDE-B, et en bloquant ainsi le relargage du cytochrome c par la mitochondrie et l'apoptose (Erdtmann et al., 2003).

2.1.3. Perturbation de l'apoptose induite par la protéine P53

La protéine pro-apoptotique P53 est un facteur de transcription, activé suite à des lésions de l'ADN, des anomalies du cycle cellulaire ou des perturbations du métabolisme.

Cette protéine est ciblée par de nombreuses protéines virales, ainsi la protéine de capsid du VHC peut inhiber la transcription de p53 (Ray et al., 1997), comme la protéine

Tat du VIH, ce qui entraîne donc un effet anti-apoptotique. La capsidie interagit également avec la protéine P53, quand elle est présente en faible concentration elle augmente l'activité de facteur de transcription de P53 (Otsuka et al., 2000), mais à fort taux elle l'inhibe.

NS5A inhibe elle-aussi l'activité de P53, en s'y fixant et en la séquestrant dans le cytoplasme, et en inhibant son co-activateur hTAFII32 (Lan et al., 2002) ainsi que Bax (Chung et al., 2003).

Il a également été rapporté que NS3 inhibe aussi l'activité de P53, mais l'effet combiné de ces 3 protéines virales sur P53 n'a jamais été étudié.

2.1.4. Autres mécanismes de modulation de l'apoptose par NS5A

NS5A (seule ou dans le contexte d'un réplicon subgénomique) active la voie PI3K-AKT en interagissant avec la sous-unité p85 de PI3K. Il en résulte donc une action anti-apoptotique car Akt phosphoryle et inactive le facteur pro-apoptotique BAD (He et al., 2002). Il est à noter que d'autres virus, comme le VIH, ciblent cette voie.

D'autres équipes ont montré que NS5A entraîne l'apoptose par induction du stress oxydatif ou du réticulum endoplasmique et l'activation de NF- κ B et STAT3 (Gong et al., 2001; Waris et al., 2002). L'activation de NF- κ B par NS5A a été confirmée par une étude de puces à ADN, montrant la surexpression des gènes dont la transcription est induite par NF- κ B (Girard et al., 2004). L'induction de stress oxydatif et l'activation de NF- κ B ont aussi été retrouvées dans le système réplicon.

D'autre part, NS5A inhibe l'apoptose par inhibition de la protéine PKR et donc de l'apoptose PKR-dépendante (Gale et al., 1997).

2.2. Régulation du cycle cellulaire et de la croissance cellulaire par NS5A

La protéine virale NS5A interagit avec beaucoup de voies cellulaires. Nous avons vu dans les paragraphes précédents qu'elle joue un rôle dans la modulation de la réponse interféron et de l'apoptose, nous allons voir maintenant qu'elle intervient également dans les mécanismes de régulation du cycle et de la croissance cellulaires. NS5A interagit également avec d'autres protéines cellulaires, mais les conséquences de ces interactions ne sont pas connues.

La voie ERK/MAPK entraîne la division cellulaire en réponse à la stimulation de la cellule par des facteurs de croissance. La kinase MAPK régule aussi l'activité de certains facteurs de transcription (phosphorylation de c-myc), et diminue la traduction (par la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 kinase).

NS5A interagit avec Grb2, protéine impliquée dans la voie de signalisation de la croissance cellulaire. Cela entraîne le blocage de l'activation de la voie ERK/MAPK lors de la stimulation par EGF (Tan et al., 1999). MAPK joue également un rôle dans l'induction de la réponse interféron (par phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT3), et son inactivation par NS5A pourrait être un mécanisme supplémentaire par lequel le VHC échappe à la réponse interféron de l'hôte.

P21/WAF (dont la transcription est sous la dépendance de P53) est un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes, et bloque donc la progression du cycle cellulaire. Aussi, par cette activité, il a également un rôle pro-apoptotique.

NS5A entraîne la diminution de la transcription de p21, en interagissant avec le facteur de transcription SRCAP (Ghosh et al., 2000b). La baisse de transcription de p21 se fait également par la séquestration de p53 par NS5A (Majumder et al., 2001). Cette diminution de la transcription de P21 entraîne une augmentation de la prolifération, et la transformation tumorale.

Cependant, deux autres études montrent une réduction de la division cellulaire induite par NS5A. Dans des cellules hépatiques exprimant constitutivement NS5A (Chang liver cells), les niveaux d'ARNm et de protéine de p53 et p21 sont augmentés. De plus, NS5A interagit directement avec Cdk1, protéine kinase jouant un rôle clé dans la progression du cycle cellulaire (Arima et al., 2001).

2.3. Interaction de la protéine de capsid avec la mitochondrie

La protéine de capsid peut se localiser au niveau de membrane externe de la mitochondrie, et particulièrement à la jonction entre la membrane externe et le réticulum endoplasmique (Schwer et al., 2004). L'expression de la protéine de capsid dans un modèle cellulaire entraîne l'augmentation des espèces réactives oxygénées (ROS : reactive oxygen species), et de la peroxydation des lipides (Okuda et al., 2002). Ces phénomènes sont dus à l'inhibition des transporteurs d'électrons du complexe I, avec une diminution du glutathion

réduit dans la mitochondrie, et une modification du taux de calcium mitochondrial, montrés chez des souris transgéniques (Korenaga et al., 2005).

2.4. Rôle possible de la protéine de capsid dans la stéatose et la carcinogénèse

Les patients ayant une infection chronique par le VHC présentent souvent une stéatose hépatique. Les souris transgéniques exprimant la protéine de capsid développent elles aussi une stéatose, puis un carcinome hépatocellulaire (Moriya et al., 1998), ce qui a été confirmé chez des souris exprimant toutes les protéines du VHC (Lerat et al., 2002). Il a été montré que la protéine de capsid possède un potentiel oncogène, mais elle ne peut à elle seule induire la transformation de fibroblastes de rat (Chang et al., 1998).

La protéine de capsid pourrait entraîner la stéatose par interaction avec les protéines impliquées dans le stockage des lipides dans les hépatocytes. La protéine de capsid interagit en effet avec l'apolipoprotéine A2, et se retrouve associée aux gouttelettes lipidiques (Shi et al., 2002).

Par contre, d'autres équipes ne retrouvent ni stéatose ni carcinome hépatocellulaire chez des souris transgéniques exprimant la protéine de capsid (Kawamura et al., 1997; Pasquinelli et al., 1997). Ces différences peuvent être dues à l'utilisation de souris de fonds génétiques différents et à des taux d'expression différents de la protéine de capsid.

2.5. Régulation de la transcription de l'hôte

Dans une étude *in vitro*, il a été montré que NS2 inhibe la transcription de divers promoteurs (Dumoulin et al., 2003). Elle provoque en particulier un arrêt du cycle cellulaire en phase S, par diminution de la transcription de la cycline A (Yang et al., 2006).

La protéine NS5A, au contraire, pourrait être un activateur général de la transcription (Kato et al., 1997).

Les autres protéines virales peuvent également moduler la transcription de certains gènes. Par exemple, la protéine de capsid augmente la transcription du gène *c-myc*, et, quand elle est exprimée à plus forte dose, inhibe celle de *c-fos* (Ray et al., 1995). NS2 et NS3/4, pour leur part, inhibent la transcription de cytokines induites lors de la réponse interféron (Kaukinen et al., 2006).

Depuis quelques années, les études utilisant les puces à ADN se multiplient, ce sont des outils puissants pour découvrir les modifications induites par le VHC sur les voies de signalisations cellulaires. Notamment, des études transcriptomiques sur des biopsies hépatiques de chimpanzés infectés a permis de mettre en évidence l'induction de la réponse interféron et une perturbation du métabolisme lipidique (Bigger et al., 2004; Su et al., 2002).

Cependant, comme pour les études précédentes, la plupart des études transcriptomiques est souvent basée sur l'étude de cellules exprimant une seule ou quelques protéines virales (elles ne tiennent donc pas compte des interactions pouvant avoir lieu entre les différentes protéines), et exprimées à des taux ne reflétant pas ceux atteints dans la cellule lors d'une infection par le VHC.

En conclusion, les conséquences précises des interactions entre les protéines virales et cellulaires sont mal connues, mais on sait que le virus interagit de façon prépondérante avec la réponse interféron, l'apoptose, la mitochondrie et le cycle cellulaire.

3) MicroARN et VHC

3.1. Les microARN

L'expression des gènes cellulaires est finement régulée au niveau de la transcription et de la traduction. La traduction est principalement régulée lors de sa phase d'initiation, l'activité des facteurs d'initiation eIF4E et eIF2 est régulée par leur phosphorylation en réponse à divers stimuli (voir paragraphe III 1.1)

Les microARN sont également des acteurs importants de la régulation post-transcriptionnelle, ils peuvent dégrader ou séquestrer des ARNm cibles, mais aussi réguler leur traduction, de façon négative ou positive, mais il n'est pas clair si cette régulation intervient au niveau de l'initiation, de l'élongation ou de la terminaison de la traduction.

L'ARN interférence est un mécanisme qui a été découvert en 1998 chez les Invertébrés (*Caenorhabditis elegans*). Lors de l'introduction d'ARN double brin exogène, il y avait suppression de l'expression de l'ARN endogène de séquence correspondante (Fire et al., 1998).

L'ARN interférence et le système microARN reposent sur un mécanisme commun. Lors de l'ARN interférence, l'ARN double brin exogène est clivé par l'enzyme RNase Dicer en

fragments d'environ 22 nt, les siRNA (silencing ARN). Ceux-ci s'associent ensuite au complexe RISC et permettent la reconnaissance et la destruction des ARNm cibles. Les siRNA sont des ARN double brin qui sont toujours d'origine exogène, soit sous la forme de longs ARN double brin (viraux) qui seront clivés par Dicer, soit introduits directement sous la forme de siRNA artificiels de 22 nt de long, ou de shRNA (short hairpin RNA, qui peuvent être introduits dans la cellule par l'intermédiaire d'un vecteur d'expression ADN).

Les microARN sont des petits ARN double brin de 22 nt de long s'associant également au complexe RISC, mais à la différence des siRNA ils sont codés par la cellule et n'induisent pas toujours la destruction de l'ARNm cible.

Les microARN sont une classe d'ARN non-codants régulant l'expression d'ARNm. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II ou III sous forme de pri-miRNA d'environ 90 nt, se repliant en épingle à cheveux. Leur transcription peut être régulée par divers facteurs de transcriptions, dont MYC (O'Donnell et al., 2005) et P53 (He et al., 2007), et par la méthylation de la séquence de leur promoteur. Ce pri-miRNA subit une série de clivages endonucléolytiques (par Drosha et DGCR8), pour donner un précurseur en épingle à cheveux d'environ 70 nt, le pré-miRNA.

Certains introns d'ARNm contiennent des miARN qui sont libérés après épissage, donnant un pré-miRNA (l'épissage remplace ici le clivage par Drosha) (Ruby et al., 2007).

Ce pré-miRNA est ensuite exporté dans le cytoplasme où il est clivé par le complexe Dicer (RNase) et TRBP (RNA binding protein) pour donner la molécule effectrice d'environ 22 nt, le miARN. Celui-ci se lie à des protéines catalytiques (Argaunotes) pour former le complexe RISC : miRNA-induced silencing complexe. Ce complexe va se lier à l'ARN ciblé par la séquence du miRNA (généralement dans la région 3'NC), et entraîner soit sa dégradation, soit la répression de la traduction (Figure 17). Il est admis que si la séquence du miRNA est parfaitement complémentaire de la séquence cible de l'ARNm, cela entraîne la dégradation de l'ARNm (par « décoiffage » et déadénylation). Si la séquence du miARN est partiellement complémentaire de la cible, la traduction de l'ARNm est réprimée, par un mécanisme qui reste à élucider (il pourrait s'agir d'un blocage de l'initiation ou de l'élongation de la traduction, ou de la protéolyse de la protéine en cours de synthèse).

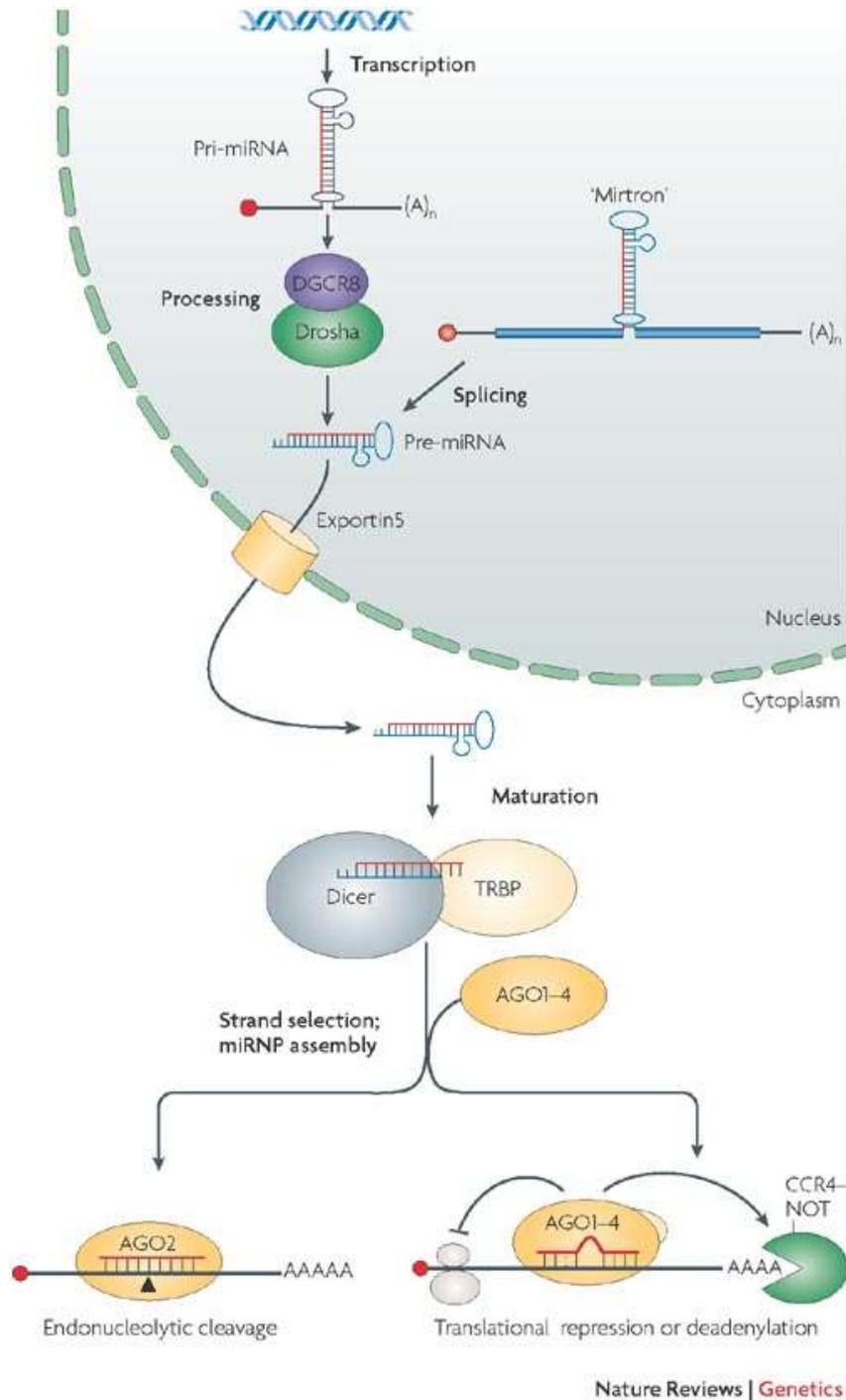


Figure 17 : Maturation et mode d'action des microARN

Le « Mirtron » est un microARN présent dans l'intron d'un ARNm immature. Les protéines cellulaires intervenant dans la maturation puis dans le mode d'action des microARN sont représentés par des formes ovales.

Plus de 500 miARN ont été identifiés chez l'homme, et chaque miARN peut potentiellement réguler plus d'une centaine d'ARNm. L'identification des miARN passe par la séparation de l'ARN total sur gel d'acrylamide, la purification, la reverse-transcription et le

clonage des ARN de 20 à 25 nucléotides. Les séquences du génome codant pour des microARN peuvent également être prédites par bio-informatique (Berezikov et al., 2006).

On estime donc qu'au moins 50% des ARNm pourraient être régulés par les microARN, ce qui fait des microARN un mécanisme central dans la régulation de l'expression des gènes. On pense d'ailleurs maintenant que des dérégulations du système microARN pourraient être associées à des cancers (Murakami et al., 2006).

Il a été récemment découvert que les microARN pourraient également entraîner la stimulation de la traduction, en se fixant dans la région 5'NC de certains ARNm, ceux possédant un motif 5'TOP sont sur-traduits par la famille de microARN 10a (Orom et al., 2008), ou lors de l'arrêt du cycle cellulaire par fixation sur un motif ARE (AU-rich element) situé en 3'NC (Vasudevan and Steitz, 2007; Vasudevan et al., 2007).

3.2. MicroARN et virus

Il existe plusieurs types d'interactions entre le système microARN et les virus. Certains virus codent pour des microARN, ciblés contre les ARN du virus lui-même ou de l'hôte. Par ailleurs, la transcription de certains microARN cellulaires peut être modifiée par certaines protéines virales, ou la cellule peut exprimer des microARN dirigés contre le virus comme mécanisme de défense (cette expression pourrait être induite lors de la réponse interféron). Et enfin, des microARN cellulaires peuvent être utilisés par le virus pour leur réplication et/ou leur traduction.

3.2.1. MicroARN codés par les virus

Plusieurs virus (EBV, KSHV, HCMV, HSV-1 entre autres) expriment des miARN, dirigés contre des ARNm cellulaires ou viraux (Cullen, 2009). Par contre, les virus à ARN comme le VHC ne codent probablement pas pour des miRNA.

3.2.2. MicroARN comme mécanisme de défense antiviral

Les plantes et les invertébrés emploient le système miRNA comme mécanisme de défense antiviral, et il semble que les mammifères pourraient également utiliser ce mécanisme : Pedersen a montré que l'interféron β induit la transcription de microARN, et que

parmi ceux-ci, 8 ont une cible sur le génome de l'hépatite C. 5 de ces microARN sont en effet capables de diminuer la réplication du VHC (JFH1). De plus, il est intéressant de noter que l'interféron induit une diminution du miR-122, qui est impliqué dans la réplication et la traduction du VHC (Pedersen et al., 2007).

3.2.3. ARN interférence lors de l'infection par le VHC

Le mécanisme d'ARN interférence peut être déclenché par la réplication d'un virus à ARN et la formation provisoire d'ARN double brin dans la cellule. L'ARN viral double brin est alors clivé par l'enzyme Dicer en fragments d'une vingtaine de nucléotides, produisant ainsi des siRNA dirigés contre le génome du virus et induisant sa destruction. Il a été montré que ce phénomène existe lors de la réplication d'un réplicon VHC dans une lignée cellulaire, ciblé contre l'intermédiaire répliatif ARN double brin du VHC, et contre la structure de l'IRES formant des ARN double brins au niveau des tiges-boucles. Cependant, la capsid pourrait interagir avec Dicer et supprimer l'induction de la réponse siRNA (Wang et al., 2006). Cela est contradictoire avec les résultats d'une autre étude ne retrouvant aucun siRNA dirigé contre le VHC après clonage des siRNA et miRNA présents dans des cellules abritant un réplicon VHC (Pfeffer et al., 2005).

3.2.4. Utilisation de microARN cellulaires par le VHC

Le miR-122, microARN spécifique du foie, stimule la réplication du VHC, en se fixant au niveau de la 5'NC (Jopling et al., 2005). Il a également été montré que le miR-122 stimule la traduction du VHC, en se fixant à deux cibles sur le 5'NC (Henke et al., 2008). Cela pourrait contribuer à l'hépatotropisme du VHC. Le miR-199a, a une séquence cible complémentaire dans l'IRES et bloque la réplication du VHC, mais le mécanisme exact n'est pas connu (Murakami et al., 2009). Le miR-196 a également un effet inhibiteur sur la réplication du VHC, mais par un mécanisme indirect (Hou et al., 2009).

Il a également été montré que le système microARN dans son ensemble est nécessaire à la réplication du VHC, en effet l'inhibition de l'enzyme Dicer entraîne une diminution de la réplication (Randall et al., 2007). Il semble donc que même si l'infection par le VHC entraînerait le déclenchement d'une réponse siRNA (voir plus haut), cet effet antiviral serait négligeable par rapport à l'effet positif des miARN cellulaires (particulièrement le miR-122) sur la réplication (ou la traduction) virale.

3.2.5. Modulation des microARN cellulaires par le VHC

Des puces à microARN ont récemment été réalisées sur des cellules Huh-7 infectées par la souche JFH1 afin de déterminer quels sont les microARN régulés lors de l'infection par le VHC (Liu et al., 2009c). Cette étude a montré la modulation de l'expression de 142 microARN cellulaires, associée à la modulation du niveau de certains de leurs ARNm cibles. D'autres études des profils miRNA dans des cellules abritant des réplicons ont été réalisées, mais les listes des microARN régulés par le VHC diffèrent d'une étude à l'autre, suivant le type cellulaire et la souche virale utilisés (Braconi et al., 2010; Randall et al., 2007). L'étude des microARN a également été réalisée à partir de biopsies de foies de patients infectés ou non par le VHC (Varnholt et al., 2008).

Les mécanismes par lesquels le VHC modifie l'expression des microARN cellulaires ne sont pas connus. Une hypothèse possible met en jeu NS5B, l'ARN polymérase du VHC. Il a en effet été montré que les ARN polymérases ARN-dépendantes (dont fait partie NS5B) peuvent se servir des siRNA comme amorce pour synthétiser des ARN double brin, amplifiant ainsi le système d'ARN interférence (Lipardi et al., 2001; Sijen et al., 2001). Le même phénomène pourrait se produire à partir des microARN cellulaires, amplifiant leur synthèse, mais la question de savoir comment le VHC amplifie ou inhibe sélectivement quelques microARN particuliers reste posée. Cette régulation pourrait avoir lieu de façon indirecte, par la modulation par le VHC de certaines protéines cellulaires impliquées dans le contrôle de la transcription des microARN, comme MYC ou P53.

Conclusion : Perspectives de nouvelles thérapies

Le traitement actuel du VHC, associant l'interféron α pégylé et la ribavirine, n'est efficace que chez environ 50 % des patients. C'est pourquoi de nouvelles pistes thérapeutiques sont recherchées activement (surtout pour le génotype 1, qui présente fréquemment une résistance à l'interféron).

Des nouvelles molécules ciblées spécifiquement contre le VHC sont actuellement en cours d'étude clinique, il s'agit d'inhibiteurs de l'ARN polymérase NS5B (analogues nucléosidiques ou inhibiteurs allostériques), ou d'inhibiteurs de la sérine protéase NS3-4A (Télaprévir et bocéprévir) (Kwong et al., 2008). Ces molécules présentent une bonne efficacité, mais celle-ci est diminuée par l'apparition et la sélection de variants résistants à ces drogues.

La grande conservation des séquences 5'NC et 3'NC en fait des cibles intéressantes pour la thérapie, leur structure secondaire étant indispensable à leur fonction, cela limite l'apparition de variants résistants qui soient encore fonctionnels. Des études visant à détruire l'ARN viral, ou à inhiber sa traduction ou sa réplication par ciblage de ces régions ont été effectuées avec plusieurs stratégies différentes.

Des études ciblant ces régions ont été réalisés avec des **oligonucléotides anti-sens**. Ces oligonucléotides de 12 à 26 bases de long ont une séquence complémentaire d'une région de l'ARN du VHC, ils se fixent donc à l'ARN et bloquent sa traduction. En particulier, des oligonucléotides antisens dirigés contre le domaine IIIId de l'IRES, très conservé, ont été mis au point (Tallet-Lopez et al., 2003), et on été testé lors d'un essai clinique de phase I, mais a permis une réduction du titre viral chez seulement 3 patients sur 28 (McHutchison et al., 2006).

Les **ribozymes**, ARN autocatalytiques, ont également été testés contre le VHC. Une séquence autocatalytique est flanquée de 2 régions permettant le ciblage d'une séquence spécifique, et le clivage de celle-ci après fixation du ribozyme (Welch et al., 1998). Un ribozyme ciblé contre la région 5'NC, Heptazyme, a montré une efficacité chez 10 % des patients lors d'un essai clinique de phase II.

Les **aptamères** sont des oligonucléotides adoptant une structure tridimensionnelle leur permettant de se fixer avec une grande spécificité et une grande affinité à leur cible. Ils sont sélectionnés à partir d'une librairie aléatoire par la méthode SELEX (évolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel). Des aptamères dirigés contre les séquences

codant pour NS5B (Bellecave et al., 2003), NS3 (Fukuda et al., 2004), ou la région 5'NC (Kikuchi et al., 2005) ont permis de bloquer le fonctionnement des enzymes virales ou de la traduction.

La **traduction IRES-dépendante** n'est pas beaucoup utilisée par les ARNm cellulaires et pourrait donc constituer une cible thérapeutique. Un ARN cellulaire possédant la capacité d'inhiber l'IRES a été découvert. Il s'agit d'un petit ARN de 60 nucléotides, appelé **IRNA**, isolé chez *S. cerevisiae* (Das et al., 1994; Venkatesan et al., 1999). Le IRNA purifié n'a pas d'action sur la traduction coiffe-dépendante, il a été montré qu'il se fixe à la protéine La (*Das et al., 1996*), ITAF intervenant dans la traduction IRES-dépendante de plusieurs virus. La fixation du IRNA à d'autres ITAFs a également été montrée. Le IRNA présente des structures secondaires qui lui sont nécessaires pour fixer les protéines se fixant aux IRES (Venkatesan et al., 1999), il pourrait donc mimer fonctionnellement l'IRES (au niveau des structures secondaires), et ainsi entrer en concurrence avec celui-ci pour la fixation des protéines cellulaires.

L'expression du IRNA dans des lignées d'hépatomes provoque le blocage de la traduction par l'IRES du VHC (Das et al., 1998), des cellules exprimant le IRNA étaient réfractaires à l'infection par un poliovirus chimérique sous le contrôle de l'IRES du VHC.

Le génome du HCV étant sous forme ARN, il peut être directement ciblé par des **siRNA**. L'IRES étant la région la plus conservée, elle est la cible la plus prometteuse. Plusieurs équipes ont ainsi montré une diminution de l'ARN viral en ciblant cette séquence avec des siRNA (Kanda et al., 2007). Le ciblage de NS3 et NS5A a également été réalisé (Takigawa et al., 2004). Cependant, il peut se produire, là encore, un échappement du virus : des mutations apparaissent dans la séquence de NS5B cible du siRNA (Wilson and Richardson, 2005). L'utilisation de 2 siRNA (avec 2 cibles différentes) en même temps permet de réduire l'apparition de mutants d'échappement. Le ciblage de la région 5'UTR est donc la meilleure piste actuellement, car elle engendre moins de résistances (sa structure est fonctionnellement importante, cette séquence est d'ailleurs la plus conservée entre les différents génotypes). Des siRNA dirigés contre le domaine IV de l'IRES (comprenant le codon start AUG) sont efficaces contre tous les génotypes (Kronke et al., 2004; Yokota et al., 2003).

Il est possible également de cibler la région X de la 3'NC (conservée aussi et indispensable à la réplication), ou certaines régions conservées des séquences codant pour la protéine de capsid et la protéine NS5B.

Une autre classe de molécules ciblant l'ARN viral est celle des **déoxyribozymes**. Ils combinent l'affinité et la stabilité (forme ADN, avec des bases azotées modifiées) des oligonucléotides antisens et les propriétés autocatalytiques des ribozymes. Une fois encore, la cible la plus prometteuse est la région 5'NC, et son clivage peut être obtenu grâce à des déoxyribozymes, bloquant ainsi la réplication du virus (Oketani et al., 1999).

Une autre piste pour des nouvelles thérapies est le **ciblage des voies cellulaires** utilisées par le VHC, moins susceptibles de muter et d'échapper au traitement.

Par exemple, il est possible de cibler les récepteurs cellulaires du VHC par des anticorps (Meuleman et al., 2008), mais tous les récepteurs n'ont pas encore été identifiés.

Le VHC modifiant le métabolisme lipidique en augmentant la synthèse des acides gras, nécessaires à son cycle viral, il pourrait être possible d'atténuer la réplication du virus en utilisant les molécules développées contre l'obésité (Ikeda et al., 2006).

Le ciblage des microARN cellulaires est aussi une piste thérapeutique intéressante. Le miR-122, stimulant la réplication et la traduction du VHC, a été antagonisé par un oligonucléotide (« antagomiR »), dans une étude récente chez le chimpanzé. Cet essai a abouti à une diminution forte (de plus de 2 fois) et durable de la virémie, sans apparition de mutations de résistance dans les 2 séquences cibles du miR-122 dans la région 5'NC. Aucun effet secondaire n'a été noté chez ces animaux, malgré la sous-expression des ARNm cellulaires cibles du miR-122 (Lanford et al., 2010). L'inconvénient majeur du ciblage des voies cellulaires est que leur modification peut entraîner des modifications létales de la cellule, mais cette expérience montre qu'il est possible d'inhiber le virus sans effets secondaires majeurs sur le fonctionnement cellulaire.

Les séquences cibles du miR-122 dans la région 5'NC du VHC sont des séquences conservées dans tous les génotypes, le miR-122 est donc une bonne cible thérapeutique.

La sur-expression des miR-196 et 199a, qui inhibent la réplication du VHC, pourrait être également une piste thérapeutique.

Les thérapies combinées sont sans doute une voie prometteuse, et il est envisageable d'associer la thérapie classique à base d'interféron avec des thérapies ciblant les voies cellulaires ou des molécules ciblées contre des régions conservées du génome viral. Attaquer le virus sur plusieurs fronts permet de limiter les possibilités d'échappement du virus à la thérapie, et de limiter les effets secondaires sur la cellule en utilisant chaque drogue à une dose plus faible.

L'IRES est une cible privilégiée pour les thérapies ciblées, il est donc indispensable de comprendre son fonctionnement et les implications de sa variabilité naturelle. On peut envisager de cibler directement cette région, de nombreux essais dans ce sens sont d'ailleurs en cours, ou de cibler les protéines (ou microARN) cellulaires qui lui sont nécessaires.

Le ciblage des voies cellulaires est une voie encore peu explorée dans la recherche de nouvelles thérapies contre le VHC. Cette stratégie présente l'avantage de contourner le problème de la variabilité du virus, mais peut se heurter à la difficulté de perturber de façon trop importante les voies cellulaires. Un essai de thérapie inhibant le microARN cellulaire miR-122 a donné de bons résultats chez des chimpanzés infectés par le VHC, montrant la faisabilité de telles approches.

La compréhension des modifications des voies cellulaires induites par le virus peut également aider à limiter la pathogénicité cellulaire du virus (notamment la transformation tumorale). De plus, si le virus modifie les voies cellulaires à son avantage (pour favoriser sa traduction et/ou sa réplication, et/ou sa persistance), il pourrait être très intéressant de contrecarrer ces modifications, en perturbant ainsi le cycle viral du VHC sans perturber les voies de signalisation cellulaires, et même au contraire en les faisant revenir à la normale.

Matériel et Méthodes

I. Etude de l'activité traductionnelle des variants IRES du VHC

1) Patients et prélèvements

Pour cette étude, 19 IRES clonées lors d'une étude précédente de l'équipe, à partir de prélèvements de sérum ou de PBMC de patients infectés par le VHC ont été utilisées. Les patients et le clonage de ces IRES sont décrits dans des publications précédentes (Di Liberto et al., 2006; Ducoulombier et al., 2004; Roque-Afonso et al., 2005).

Le tableau I résume les principales caractéristiques des patients, il s'agit d'usagers de drogues en intraveineuse, atteints d'hépatite C chronique sans cirrhose au moment de l'étude, et n'ayant pas encore été traités. Ils sont séronégatifs pour le VIH et le virus de l'hépatite B.

Patient	Age/sexe	génotype viral	Copies d'ARN viral dans le plasma/mL (log)	Copies d'ARN dans les lymphocytes B / ug (log)	Détection de brin négatif dans les lymphocytes B
G	36/M	2 et 3	6,0	3,4	Oui
M	41/M	1	6,1	2,9	Non
D	52/M	1 et 2	4,8	3,1	Non
S	48/F	1	5,7	2,7	Non
C	36/F	1	4,7	4,0	Oui
W	45/M	1	4,2	2,9	Non

Tableau I : Caractéristiques des patients de l'étude

2) Constructions plasmidiques

Toutes les constructions plasmidiques ont été réalisées à partir du vecteur PIRF, gracieusement fourni par le Dr Annie Cahour. Ce plasmide bicistronique, dérivé du pcDNA3.1Zeo(+) (Invitrogen), comprend les promoteurs CMV et T7 pour la transcription. La séquence de l'IRES du VHC (correspondant à la région 5'NC et aux 30 premiers nucléotides

de la séquence de la capside), a été amplifiée à partir de l'ADNc de longueur génomique de la souche 1b H77 (Dr Wychowski), obtenue par clonage à partir de biopsies de foies de chimpanzés infectés par le sérum d'un patient, a été insérée entre 2 gènes rapporteurs, le gène de la Firefly luciférase (Fluc), et celui de la Renilla luciférase (Rluc). Ce vecteur conduit à la transcription d'un ARN bicistronique à partir duquel la F luciférase sera traduite par un mécanisme coiffe-dépendant, et la R luciférase sera traduite sous le contrôle de l'IRES du VHC.

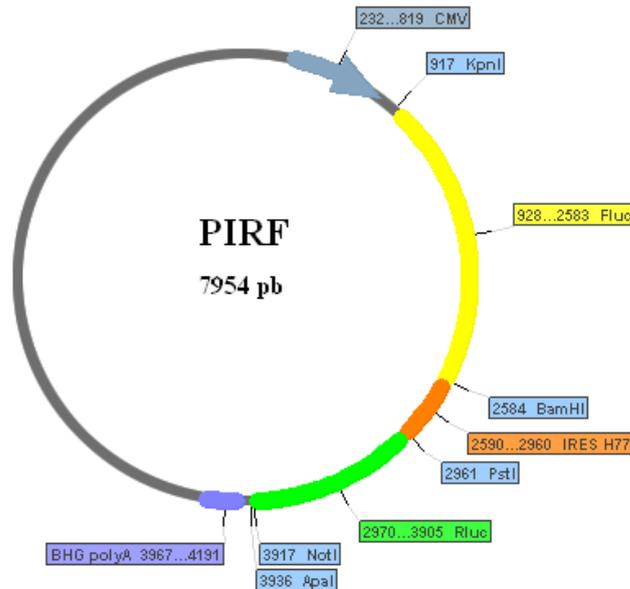


Figure 18 : Représentation du plasmide PIRF

2.1. PCR

Les sites enzymatiques utilisés pour le clonage ont été rajoutés en 5' des amorces, après 6 nucléotides aléatoires (car les enzymes de restriction ne peuvent pas digérer l'extrémité d'un produit PCR).

Les PCR pour les clonages ont été réalisées avec la Taq Platinum Haute fidélité d'Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Nous avons utilisé le mélange réactionnel suivant (pour 50 µl) :

	Volume	Concentration finale
Tampon 10X	5 µl	1X
dNTP (10mM chaque)	1 µl	0,2 mM chaque
MsSO ₄ (50mM)	2 µl	2 mM
Amorce sens (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Amorce anti-sens (10 µM)	1 µl	0,2 µM

Taq polymérase	0,5 μ l	1 unité
ADN matrice (100 ng/ μ l)	1 μ l	
H ₂ O	qsp 50 μ l	

Les cycles PCR suivants ont été utilisés :

Dénaturation initiale	94°C	2 minutes	} X 40
Dénaturation	94°C	30 secondes	
Hybridation	Tm	30 secondes	
Elongation	68°C	1 minute / kb amplifié	
Elongation finale	68°C	10 minutes	

Tableau II : liste des amorces utilisées pour le clonage

Nom	Sens ou antisens	Séquence	Matrice	Longueur produit	Tm	Description
IRES-ribo-F1	Sens	CGGTACCCGGTACCGTCGCCAGCCCCCTGAT	PIRF	403 pb	67°C	Construction du PIRF avec ribozyme devant l'IRES : 3 PCR chevauchante avec même amorce anti-sens
IRES-ribo-F2	Sens	TCCGTGAGGACGAAACGGTACCCGGTACC	PIRF	418 pb	62°C	
IRES-ribo-BamHI-F3	Sens	CATTAT <u>GGATCC</u> GGGCTGGCCTGATGAGTCCGTGAGGAC GAA	PIRF	445 pb	66°C	
IRES-PstI-R	Anti-sens	<u>CCGGTCCA</u> <u>CTGCAG</u> TTTTCTTTGAGGTTTAGGATTCGT	PIRF		62°C	
3'NC-NotI-F	Sens	ATAAGAATTAG <u>CGGCCGC</u> ACGGGGAGCTAAACACTCC	pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-3UTR H77 ou pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-5BSL-3UTR Con1		64°C	Construction du PIRF-3'H77 avec ribozyme après la 3'NC : 3 PCR chevauchante avec même amorce sens
3'NC-ribo-R1	Anti-sens	ACGGATCTAGATCCGTCACATGATCTGCAGAGGAGC	pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-3UTR H77		62°C	
3'NC-ribo-R2	Anti-sens	CCTCACGGACTCATCAGGACGGATCTAGA	pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-3UTR H77		60°C	
3'NC-ribo-ApaI-R3	Anti-sens	GCTAG <u>GGGCC</u> GATCATGTTCGTCCTCACG	pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-3UTR H77		62°C	
3'NC-H77-ApaI-R	Anti-sens	CGATTAA <u>GGGCC</u> ACATGATCTGCAGAGAGGCC	pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-3UTR H77	253 pb	63°C	Construction du PIRF avec 3'NC H77 ou con1 avec amorce sens 3'NC-NotI-F
3'NC-con1-ApaI-R	Anti-sens	GCTAG <u>GGGCC</u> ACTTGATCTGCAGAGAGGCCAG	pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-5BSL-3UTR Con1	259 pb	64°C	

Légende : Région non-hybridée

Site enzymatique

Toutes les amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées par Eurogentec (Seraing, Belgique).

2.2. Purification des produits PCR

Une purification des produits PCR a été réalisée afin d'éliminer la matrice ADN et les éventuels produits PCR non-spécifiques.

La totalité des produits PCR a été déposée sur gel d'agarose 0,8 % contenant du bromure d'éthidium (BET), et après une migration pendant 2 heures à 80 volts, la bande correspondant au produit PCR désiré a été excisée sous UV, puis l'ADN a été purifié grâce au kit Qiaquick PCR (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le protocole du fabricant : l'agarose récupéré a été dilué dans 3 volume de tampon PB et chauffé à 50°C pendant 10 minutes pour qu'il fonde. L'agarose fondu a été ensuite déposé sur une colonne de silice, centrifugée à 13 000 g pendant 1 minute. Les traces d'agarose résiduel ont été éliminées par un lavage de la colonne avec 500 µl de tampon PB. Un autre lavage a ensuite été effectué avec 750 µl de tampon PE, puis la colonne a encore été centrifugée 1 minute à vide pour éliminer toute trace d'éthanol. L'ADN a été élué dans 50 µl de tampon EB.

2.3. Digestions Enzymatiques

Toutes les digestions enzymatiques ont été réalisées avec les enzymes de restriction de New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), en utilisant le protocole suivant :

ADN	1 µg de plasmide ou 25 µl de produit PCR purifié
Tampon de l'enzyme	5 µl
± BSA, suivant l'enzyme	5 µl
Enzyme	10 unités
H ₂ O	qsp 50 µl

A chaque fois, le mélange a été incubé 2 heures à 37°C

Pour les plasmides, le produit de la digestion a ensuite été purifié sur gel d'agarose (même protocole que pour la purification des produits PCR), pour éliminer les plasmides non digérés.

2.4. Clonage des séquences 3'NC

La séquence 3'NC stricte de H77 et con1 a été obtenue par PCR à partir du plasmide pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-3UTR H77 ou pGEM-5UTR-Hygro2AEGFP-5BSL-3UTR Con1, gracieusement fournis par le Dr Michel Ventura, à l'aide des amorces 3'NC-NotI-F et 3'NC-H77-ApaI-R ou 3'NC-con1-ApaI-R.

L'ajout de la séquence ribozyme juste à la fin de la séquence 3'NC H77 a été réalisée en effectuant 3 PCR chevauchantes avec les amorces anti-sens 3'NC-ribo-R1, puis 3'NC-ribo-R2, puis 3'NC-ribo-ApaI-R3, à chaque fois avec l'amorce sens 3'NC-NotI-F.

Toutes les séquences 3'NC ont été clonées après la R luciférase dans le PIRF, à l'aide des enzymes NotI et ApaI.

2.5. Obtention des plasmides monocistroniques

Le plasmide monocistronique F luciférase a été obtenu en digérant le PIRF par BamHI et ApaI pour éliminer la séquence IRES et R luciférase. Après migration sur gel, la bande la plus haute, correspondant au PIRF sans IRES et Rluc, a été purifiée, puis les extrémités ont été comblées par action de la Klenow polymérase (New England Biolabs), selon le protocole suivant :

ADN	25 µl de plasmide digéré et purifié
Tampon 2 10x	5 µl
Enzyme Klenow	5 unités
H ₂ O	qsp 50 µl

Ce mélange a été incubé 30 minutes à 25°C (excision des extrémités 3' sortantes), puis à nouveau 30 minutes après ajout de 33 µM de dNTP et de 5 unités de klenow polymérase (remplissage des extrémités 5' rentrantes).

Les plasmides monocistroniques IRES-Rluc ± 3'NC ont été obtenu de la même façon, par digestion du plasmide bicistronique correspondant par KpnI et BamHI pour éliminer la séquence de la F luciférase.

2.6. Ligations

Les ligations du vecteur et de l'insert ont été réalisées avec la T4 DNA ligase (New England Biolabs) dans un volume réactionnel de 20 µl, avec 50 à 100 ng de vecteur et un ratio insert:vecteur de 3:1 (en termes d'extrémités), 2 µl de tampon de la ligase, et 1 µl de ligase. Le volume était complété à 20 µl avec de l'eau (pour l'obtention des monocistroniques, 100 ng de vecteur seul a été ajouté à la réaction pour qu'il se ligue sur lui-même). Les réactions de ligation se sont effectuées à 16°C pendant 16 heures.

2.7. Transformations

Pour les transformations bactériennes, 5 µl du produit de ligation ont été mélangés dans 100 µl de bactéries chimio-compétentes DH5α (Invitrogen), le mélange a été incubé 30 minutes sur glace, puis soumis à un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes. Après 2 minutes sur glace, les bactéries transformées ont été mises à 37°C sous agitation dans du milieu SOC (Invitrogen) pendant 1 heure, puis 100 à 500 µl ont été étalés sur une boîte LB-Agar avec 100 µg/mL d'ampicilline. Ces boîtes ont été incubées toute la nuit à 37°C puis 10 colonies bactériennes ont été inoculées chacune dans 3 mL de milieu LB, et mises à pousser à 37°C sur la nuit, sous agitation.

Les minipréparations de plasmides ont été effectuées avec le kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen, à partir de 2 mL de culture bactérienne. L'élution de l'ADN a été réalisée avec 50 µl de tampon d'élution.

Les plasmides étaient ensuite vérifiés par digestions enzymatiques puis migration sur gel, en choisissant des enzymes de restriction permettant de différencier le profil de digestion du plasmide attendu de celui du vecteur vide ou de plasmides aberrants.

Les plasmides considérés comme corrects ont ensuite été séquencés par la plateforme de séquençage de l'IFR 26 (IRT-UN, Nantes).

Des maxipréparations de plasmides ont été réalisées pour les plasmides dont la séquence avait été validée. Les maxipréparations ont été effectuées avec le kit Hispeed maxiprep de Qiagen, à partir de 150 mL de culture bactérienne (obtenue par inoculation de 50 µl de préculture dans 150 mL de LB et incubation sur la nuit à 37°C, sous agitation). Les éluions ont été effectuées dans 1 mL d'H₂O.

Les plasmides obtenus par maxipréparation ont été vérifiés encore une fois par digestion enzymatique et migration sur gel, et dosés au Nanodrop.

Tableau III : Liste des constructions plasmidiques dérivées du PIRF réalisées

Nom du plasmide	Composition	Commentaires	Schéma de la construction
PIRF-3'NC H77	CMV-Fluc-IRES-Rluc-3'NC H77	3'NC H77	
PIRF-3'NC con1	CMV-Fluc-IRES-Rluc-3'NC con1	3'NC con1	
PIRF-3'ribo	CMV-Fluc-IRES-Rluc-3'NCribo	ribozyme après le 3'NC	
PIRF-IRESribo	CMV-Fluc-riboIRES-Rluc	ribozyme devant l'IRES	
mFluc	CMV-Fluc	monocistronique Fluc	
mIRES-Rluc	CMV-IRES-Rluc	monocistronique IRES-Rluc H77	
m3'NC H77	CMV-IRES-Rluc-3'NC	monocistronique IRES-Rluc-3'NC H77	
m3'NC con1	CMV-IRES-Rluc-3'NC	monocistronique IRES-Rluc-3'NC con1	
mIRES-ribo	CMV-riboIRES-Rluc	monocistronique avec ribozyme devant l'IRES	
m3'NCribo	CMV-IRES-Rluc-3'ribo	monocistronique avec ribozyme après le 3'NC	

3) Transcription d'ARN *in vitro*

Les transcriptions *in vitro* d'ARN ont été réalisées avec le kit MegaScript (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX, USA) à partir de produits PCR. Les produits PCR ont été réalisés avec l'amorce sens T7 (en amont de la cassette d'expression, comprenant le promoteur T7) et l'amorce anti-sens BGH (située à la fin de la cassette d'expression) ou BGH tail, comprenant 35 nucléotides T permettant l'ajout d'une queue poly A de 35 nucléotides après la luciférase.

Pour les constructions comportant la 3'NC, l'amorce anti-sens utilisée était 3'NC-Stop-R, pour avoir un produit PCR s'arrêtant exactement à la fin de la 3'NC.

Le protocole utilisé pour la transcription d'ARN est le suivant :

	Volume	Concentration finale
Produit PCR purifié	5 µl	
ATP solution	2 µl	7,5 mM
CTP solution	2 µl	7,5 mM
GTP solution	2 µl	7,5 mM
UTP solution	2 µl	7,5 mM
Tampon de transcription 10x	2 µl	1 x
Enzymes	2 µl	
H ₂ O qsp 20 µl	3 µl	

Pour l'obtention d'ARN coiffés, un analogue nucléotidique de la coiffe (guanine méthylée, M⁷G(5')ppp(5')G, Ambion) a été ajouté à la réaction dans une proportion de 4 pour 1 par rapport au nucléotide guanine. Ce ratio est le meilleur compromis entre taux de coiffe des ARN et taux de transcription, on obtient environ 80 % de transcrits coiffés selon les données du fabricant). Pour obtenir ce ratio, l'analogue nucléotidique a été ajouté à la concentration de 6 mM final, et la solution de GTP a été diluée au 1/5^{ème} (1,5 mM final).

Les transcriptions ont été effectuées à 37°C, pendant 6 heures.

Après la transcription, 1 µl (2 unités) de TurboDnase a été ajouté à la réaction, qui a été incubée 15 minutes à 37°C pour permettre l'élimination de la matrice ADN.

Les ARN transcrits ont ensuite été purifiés grâce au kit MegaClear (Ambion) suivant les recommandations du fabricant. L'éluion de l'ARN a été faite dans 30 µl de tampon d'éluion.

Les ARN ont ensuite été dosés au spectrophotomètre Nanodrop.

Tableau IV : Liste des amorces utilisées pour amplifier les matrices des transcriptions *in vitro*

Nom	Sens ou anti-sens	Séquence	Matrice	Longueur produit	Température d'hybridation
T7	Sens	TAATACGACTCACTATAGG	Constructions dérivées du PIRF	3116 pb pour le PIRF	52°C
BGH	Anti-sens	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Constructions dérivées du PIRF		56°C
BGH tail	Anti-sens	T ₍₃₅₎ TAGAAGGCACAGTCGAGG	Constructions dérivées du PIRF		56°C

4) Transfections des constructions dans les cellules

4.1. Cultures cellulaires

Les cellules Huh7 (lignée de carcinome hépatocellulaire d'origine humaine) ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, Gibco), contenant 10% final de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), de la pénicilline (5U/mL final) et de la streptomycine (5 µg/mL final).

Les cellules RAJI (lignée lymphocytaire B dérivée de lymphome de Burkitt) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 1mM de L glutamine ajustée à 1,5 g/L de bicarbonate de sodium, 4,5 g/L de glucose 10mM Hepes, 1 mM de pyruvate de sodium, 10 % de SVF (Gibco, Invitrogen), 1% de pénicilline et streptomycine et 0,1 % de gentamycine.

Les hépatocytes primaires proviennent de la société Bioprédic (Rennes), ils ont étéensemencés à raison de 380 000 cellules par puits en plaque 24 puits dans du milieu William's, supplémenté de 10 % de SVF, 1 % de pénicilline et streptomycine, 1 % de L-glutamine, 5 µg/mL d'insuline et 50 mM d'hydrocortisone hémisuccinate.

4.2. Transfections

Les cellules Huh7 ont été mises en plaques 24 puits la veille de la transfection, à raison de 200 000 cellules par puits dans 800 µl de DMEM pur, sans SVF ni antibiotiques.

Pour les transfections de plasmides, 1 µg d'ADN, et 3 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen) ont été incubés séparément dans 100 µl de DMEM pur pendant 5 minutes à température ambiante. Ces 2 tubes ont ensuite été mélangés, le mélange a été incubé 25 minutes à température ambiante puis déposé dans le puits contenant les cellules.

Pour les ARN, 1 µg d'ARN et 6 µl de DMRIEC (Invitrogen) ont été incubés 30 minutes à température ambiante dans 200 µl de DMEM pur, puis ajoutés aux cellules. Chaque expérience a été réalisée en triplicata.

Après 4 heures, le milieu était changé pour du DMEM complet.

Les cellules RAJI ont été transfectées par électroporation suivant le protocole suivant :

3 millions de cellules dans 300 µl de RPMI ont été déposées dans une cuve à électroporation (Biorad, Hercules, CA, USA), avec 3 µg de plasmide à transférer. Les électroporations ont été réalisées avec l'électroporateur Genepulser II (Biorad), à 260 Volts et 960 µF. 10 minutes après l'électroporation, les cellules ont été mises en culture dans 10 ml de milieu RPMI.

4.2.1. Transfection de siRNA

Le siRNA anti-F luciférase utilisé est le siRNA pGL2 luciferase control Firefly (Eurogentec). Le siRNA anti-La est le ON-TARGET plus SMARTpool (Dharmacon, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) comprenant 4 siRNA ciblés à différents endroits de l'ARN codant pour la protéine La. Le siRNA contrôle est le siCONTROL Non-Targeting siRNA 4 (Dharmacon).

Les siRNA ont été co-transfectés avec le plasmide à tester en utilisant la lipofactamine 2000, selon le protocole suivant :

3 µl de siRNA (20 µM) et 3 µl de lipofectamine ont été dilués séparément dans 50 µl de milieu. Après 5 minutes, les deux tubes ont été mélangés et 1 µg de plasmide a été ajouté. Après 25 minutes d'incubation, le mélange a été ajouté aux cellules.

4.2.2. Lecture luciférase

Les lectures des Firefly et Renilla luciférases ont été effectuées avec le kit Dual Luciférase (Promega, Madison, USA), selon les recommandations du fabricant :

Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été rincées au PBS, trypsinées et centrifugées. Le culot cellulaire a été repris dans 100 µl de Passive Lysis Buffer, et la lyse s'est effectuée pendant 15 minutes sous agitation. 20 µl du lysat ont été ajoutés à 100 µl de *LARII* et la luminescence de la Firefly luciférase a été lue grâce à un luminomètre (20/20n luminometer, Promega). 100 µl de réactif *Stop and Glo* ont été ajoutés pour permettre l'extinction de la luminescence de la Renilla luciférase et apporter le substrat pour la Renilla luciférase. La luminescence de la Renilla luciférase a alors été lue de la même façon que pour la Firefly. Les mesures effectuées par le luminomètre sont exprimées en unités arbitraires de luminescence, et, dans notre étude, l'activité de la R luciférase est normalisée par celle de la F luciférase.

Les tests statistiques pour la comparaison des activités traductionnelles (ratio R/F) ont été effectués à l'aide du test non-paramétrique de Mann-Whitney, sur le site internet : <http://www.u707.jussieu.fr/biostatgv/>.

5) Analyses des ARN transfectés

5.1. Extractions d'ARN des cellules transfectées

Les ARN ont été extraits à partir de 500 000 cellules avec le kit RNeasy de Qiagen, en suivant le protocole du fabricant. Les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 300 x g, puis le culot a été repris dans 350 µl de tampon de lyse RLT, supplémenté de 1:10^{ème} de β-mercaptoéthanol. Après ajout de 350 µl d'éthanol 70%, le mélange a été déposé sur une colonne de silice (permettant la fixation des molécules d'ARN) et centrifugé une minute à 12 000 g. La colonne a ensuite été lavée avec 700 µl de tampon RW1 (centrifugation) puis 500 µl de tampon RPE (centrifugation). Les colonnes ont encore été centrifugées 1 minute à 12 000 g pour permettre l'élimination de toute trace d'éthanol de la colonne. L'élution a été faite dans 30 µl d'H₂O.

5.2. Quantification des ARN totaux ou clivés par les ribozymes

5.2.1. Rétrotranscription

Les rétro-transcriptions des ARN en ADNc (ADN complémentaire) ont été réalisées avec le kit Superscript III de Invitrogen, en utilisant des hexamères (mélange d'hexanucléotides de séquences aléatoires) pour obtenir un ADNc complet.

L'ARN a d'abord été traité par de la DNase I (Invitrogen), pour éliminer l'ADN contaminant résiduel éventuel (les colonnes Rneasy permettent cependant, en théorie, la récupération de l'ARN sans contamination ADN). Les 30 µl d'ARN ont été additionnés de 4 µl de tampon de réaction 10X de la DNase, de 4 µl de DNase (4 unités, suffisant pour 4 µg d'ARN), et 2 µl d'H₂O, et incubés 15 minutes à température ambiante. La Dnase a ensuite été inactivée par chauffage de la réaction à 65°C pendant 10 minutes, après ajout de 4 µl d'EDTA pour chélater et protéger l'ARN.

Pour la rétro-transcription, 500 ng d'ARN ont été mélangés avec 1 µl de dNTP 10mM et 1 µl d'hexamères (50 ng), complétés à 10 µl avec de l'eau. Ce mélange a été incubé 5 minutes à 65°C puis refroidi sur glace. Le mélange réactionnel suivant a ensuite été ajouté à chaque réaction : 2 µl de tampon réactionnel 10X, 4 µl de MgCl₂ 25mM, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RnaseOUT (40 unités) et 1 µl de Rétro-transcriptase Superscript III (200 unités). Le mélange a été incubé 10 minutes à 25°C, puis 50 minutes à 50°C puis 5 minutes à 85°C.

1 µl de RnaseH a été ajouté à chaque réaction, et le mélange incubé 15 minutes à 37°C.

Les ADNc ont ensuite été conservés à -20°C.

5.2.2. PCR quantitatives

Les PCR quantitatives ont été réalisées avec le kit Advantage de Clontech (Mountain View, CA, USA) avec le mélange suivant, pour un puits (20 µl) :

Premix SYBR	10 µl
Amorce sens	0,4 µl
Amorce anti-sens	0,4 µl
Rox LSR (référence passive)	0,4 µl
H ₂ O	6,8 µl
ADNc	2 µl

Le gène GAPDH a été pris comme gène de référence et chaque échantillon a été dosé en duplicata.

Les PCR ont été réalisées sur un appareil ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), avec le cycle suivant :

Dénaturation initiale	95°C	10 minutes	
Dénaturation	95°C	15 secondes	} X 40
Hybridation + élongation	60°C	1 minute	

Puis une phase de dénaturation-renaturation des produits PCR synthétisés a été réalisée (95°C 15 secondes, 60°C 15 secondes, 95°C 15 secondes), permettant la construction d'une courbe de dissociation pour vérifier la présence d'un produit PCR unique.

L'intensité de la fluorescence est tracée en fonction du nombre de cycles de la PCR. On définit le CT (cycle threshold, cycle seuil), qui est le numéro du cycle à partir duquel l'intensité de fluorescence dépasse une valeur seuil. Ce seuil se trouve dans la région exponentielle d'amplification, la quantité de produit PCR à cet instant donnée est donc proportionnelle à la quantité d'ADN de départ.

Pour chaque gène quantifié, le CT a été normalisé par le CT du gène GAPDH ($\Delta CT = CT_{\text{gène}} - CT_{\text{GAPDH}}$), puis par un échantillon de référence (qui aura une quantité fixée arbitrairement à 1). On a donc obtenu $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{échantillon}} - \Delta CT_{\text{référence}}$. La quantité (relative) d'ADNc initiale a été retrouvée par la relation : $\text{quantité} = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tableau V : Liste des amorces utilisées pour les PCR quantitatives

Nom	Sens ou anti-sens	Séquence	Matrice	Longueur produit	Température d'hybridation	Description
Rluc-Q-F	Sens	AACGCGGCCTCTTC TTATTT	PIRF, PIRF3'NC, PIRF-IRESribo et PIRF-3'ribo	199 pb	58°C	Quantification de l'ARN total transcrit à partir du plasmide
Rluc-Q-R	Anti-sens	GGCCGACAAAAATG ATCTTC	PIRF et PIRF-IRESribo		58°C	
IRESribo-Q-F	Sens	GGAAAACTCGACGC AAGAAA	PIRF et PIRF-IRESribo	239 pb	58°C	Quantification des ARN IRES-ribo non-clivés
IRESribo-Q-R	Anti-sens	GAGGCTGCACGACA CTCATA	PIRF et PIRF-IRESribo		62°C	
3'NCribo-Q-F	Sens	GCACGGGGAGCTAA ACACT	PIRF-3'NC et PIRF-3'ribo	244 pb	60°C	Quantification des ARN 3'-ribo non-clivés
3'NC-ribo-Q-R	Anti-sens	AGGACGGATCTAGA TCCGT	PIRF-3'NC et PIRF-3'ribo		58°C	
GAPDH-Q-F	Sens	GTCAGTGGTGGACC TGACCT	ADNc cellulaire	251 pb	60°C	Quantification de la GAPDH, gène de référence
GAPDH-Q-R	Anti-sens	CCCTGTTGCTGTAG CCAAAT	ADNc cellulaire		60°C	

II. Etude des interactions ITAFs-IRES par couplage covalent aux UV

1) Extraction et dialyse de protéines

Les protéines cytoplasmiques et nucléaires de cellules Huh7, HepG2, RAJI et hépatocytes primaires ont été extraites avec le kit NE-PER (Pierce Biotechnology).

Les protéines extraites ont été dialysées, pour éliminer les sels présents qui pourraient altérer les liaisons protéine-ARN lors du cross-link, avec les cassettes de dialyse Slide-A-Lyser (Pierce Biotechnology). L'extrait protéique a été déposé dans la cassette qui a été immergée dans du tampon de dialyse (Hepes pH 7,9 20mM, Glycérol 20 %, KCl 100 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 3 mM, PMSF 0,2 mM), pendant 6 heures, sous agitation, à 4°C.

Les protéines d'une biopsie de tissu hépatique ont également été extraites. Il s'agit d'une biopsie de foie, histologiquement normale, d'un patient de l'hôpital Paul Brousse présentant des métastases hépatiques d'un cancer colique. Après broyage du tissu dans des tubes à billes de céramique (*Lysing matrix D*, MP Biomedical, Illkirch, France), les protéines totales ont été extraites avec 1 mL de tampon de lyse RIPA (50mM TrisHCl pH7 ; 150mM NaCl ; 0,5 % de déoxycholate de sodium ; 0,1 % de SDS ; 1 % Triton X100 ; 2mM d'orthovanate de sodium ; 20mM pyrophosphate de sodium ; 20mM fluorure de sodium ; 1/10 d'inhibiteurs de protéases (*Protease inhibitor*, Sigma) ; 1mM de PMSF). La lyse s'est effectuée sur glace pendant 30 minutes, puis le surnageant a été récupéré après centrifugation 10 minutes à 12 000 g à 4°C.

Les protéines ont ensuite été dosées avec le kit BCA.

2) Transcription d'ARN marqués au P³²

Les ARN marqués au P³² ont été transcrits grâce au kit MaxiScript d'Ambion, à partir du produit PCR des différentes IRES. Les IRES ont été amplifiées à partir du plasmide bicistronique dans lequel elles ont clonées, avec la Taq Platinum Haute fidélité, en utilisant les amorces sens T7-S9-F (GGATCCTAATACGACTCACTATAG CTGATGGGGGCGACACTCC) et anti-sens 54-R (CTGATGGGGGCGACACTCC).

Le mélange réactionnel utilisé était le suivant (20 μ l) :

ATP	500 μ M
CTP	500 μ M
GTP	500 μ M
UTP	10 μ M
UTP marqué au P ³²	50 μ Curie
Tampon 2x	1x
Enzymes T7	2 μ l
H ₂ O	qsp 20 μ l

Ce mélange a été incubé 2 heures à 4°C, puis les ARN transcrits ont été traités avec 1 μ l de TurboDnase (2 unités) et incubés 15 minutes à 37°C pour éliminer les produits PCR utilisés comme matrices.

Les ARN ont été purifiés, pour éliminer les protéines présentes, par ajout 40 μ l de phénol/chloroforme, centrifugation 10 minutes à 13 000 g, et récupération de la phase aqueuse. Ils ont ensuite été purifiés par passage sur des colonnes NucAway (Ambion) pour éliminer les ribonucléotides non incorporés.

Les ARN marqués transcrits ont été quantifiés par un compteur à scintillation β (*TopCount NXT*, PerkinElmer).

La qualité des ARN a également été vérifiée par migration sur gel d'urée 6 % (TBE-Urée Novex, Invitrogen) avec tampon de migration TBE dans une cuve *Xcell surelock Mini-Cell*.

3) Couplage covalent (UV cross-link)

Les protéines à tester extraites de lignée cellulaire (10 μ g), sont mélangées avec 1 μ l de tampon (Hepes pH 7,5 50 mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, Glycérol 38 %, DTT 0,2 mM) et incubées à température ambiante pendant 15 minutes. 500 000 cpm d'ARN IRES marqué radio-activement sont alors ajoutés et le couplage covalent de l'ARN avec protéines s'y fixant a été obtenu par irradiation du mélange aux UV (254 nm), dans un Stratalinker (Biorad), à 0,4 J/cm².

Les ARN ont ensuite été digérés par ajout de 10 unités de RnaseONE et 0,5 μ l de Rnase A (10 μ g) par réaction.

Les complexes ARN/protéines ont été déposés sur un gel d'acrylamide *Nupage* 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen), et la migration s'est effectuée dans une cuve *Xcell surelock Mini-Cell*, dans du tampon de migration MES, pendant 45 minutes à 200 V. Le gel a ensuite été séché 2 heures à 80°C.

Révélation : les gels ont été mis en contact avec écran phosphore pendant 16 à 72 heures. La fluorescence émise par les écrans a ensuite été lue avec le scanner Typhoon 9410 (GE Healthcare).

III. Etude du transcriptome et du traductome des cellules infectées par la souche JFH1

1) Préparation des échantillons

1.1. Infection des cellules

Les cellules, infectées, non-infectées, ou infectées puis traitées proviennent de l'équipe de Arielle Rosenberg de l'Institut Cochin à Paris. Les cultures cellulaires et les infections ont été réalisées par Céline Hernandez.

Les cellules Huh7.5.1 ont été cultivées dans du milieu DMEM complet. Les cellules ont été infectées par des virions JFH1 à une MOI de 1. Le milieu a été changé au bout de 6 heures, et après 2 rinçages au PBS, du milieu DMEM complet a été ajouté. Pour les cellules infectées puis traitées, le milieu DMEM ajouté a été supplémenté de Vx-950 (télaprévir, un anti-protéase) à 1000 nM final.

Des cellules contrôles, non infectées, ont été cultivées en même temps.

Des quadruplicata de chaque condition ont été réalisés.

72h après infection, les surnageants des cellules ont été récupérés et leur titre infectieux a été déterminé : des cellules Huh7.5.1 naïves ont été infectées avec différentes dilutions du surnageant, et leur taux d'infection a ensuite été déterminé par immunofluorescence avec des anticorps anti-NS5B. Cela a permis de vérifier la bonne infection des cellules, l'élimination du virus des cellules traitées et la non-infection des cellules contrôles.

1.2. Principe du fractionnement polysomique

Un ARN messager est traduit par plusieurs ribosomes en même temps, à des stades différents de la traduction. On admet que le nombre de ribosomes fixés sur un ARN représente son taux de traduction : plus un ARN fixe de ribosomes, plus il est traduit.

Les cellules en culture ont été traitées avec de la cycloheximide, antibiotique bloquant la traduction, au niveau de l'initiation et de l'élongation de la traduction. Les ribosomes sont donc bloqués sur l'ARNm qu'ils étaient en train de traduire (cette structure ARN + polysomes est appelée polysome), permettant d'obtenir une « photographie » de la traduction cellulaire à cet instant donné. Les cellules sont lysées et le cytoplasme est récupéré. Le cytoplasme a ensuite été fractionné sur gradient de sucrose par ultracentrifugation (Figure 19).

Les fractions lourdes, situées au fond du tube, correspondent aux ARN liant plusieurs ribosomes, on les appelle polysomes. Ce sont les ARN les plus activement traduits.

En haut du tube se trouvent les ARN libres (non traduits), et les sous unités ribosomales libres. Entre les deux se situe un gradient d'ARN avec un nombre intermédiaire de ribosomes.

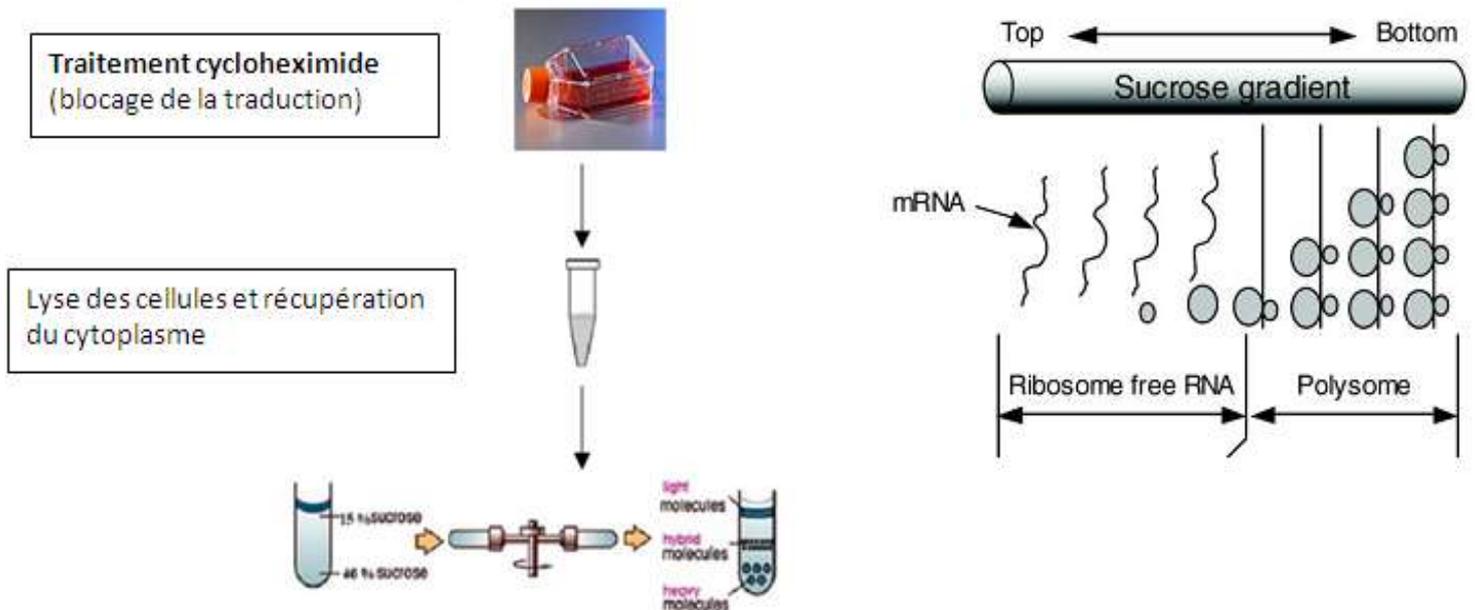


Figure 19 : Principe du fractionnement polysomique de cellules traitées par la cycloheximide. Les cellules en cultures sont traitées par de la cycloheximide, ce qui entraîne le blocage des ribosomes sur l'ARNm en cours de traduction. Les cellules sont lysées et le lysat est fractionné par ultra-centrifugation sur gradient de sucrose. Les différentes fractions sont collectées. Les fractions lourdes correspondent aux ARN traduits, accrochés aux ribosomes, et les fractions légères correspondent aux sous-unités ribosomales et aux ARN libres.

1.3. Traitement des cellules à la cycloheximide et lyse

72 heures après l'infection, les cellules ont été rincées avec du PBS contenant 100 µg/mL de cycloheximide, puis incubées 15 minutes à 37°C dans du PBS + cycloheximide. La cycloheximide provoque le blocage des ribosomes sur l'ARNm qu'ils étaient en train de traduire. Les cellules ont ensuite été détachées avec un grattoir dans du PBS + cycloheximide, centrifugées à 500 g pendant 5 minutes, puis le culot cellulaire de 10 millions de cellules a été homogénéisé dans 400 µl de tampon de lyse (20mM de Tris-HCl pH7,5, 10 mM de NaCl, 3mM de MgCl₂). 400 µl de tampon de lyse additionné de triton (0,2 %) et de sucrose (0,25 M) ont été rajoutés, et la lyse a été effectuée en mélangeant vigoureusement la suspension dans des tubes contenant des billes de céramiques.

Le lysat a été centrifugé 5 minutes à 12 000 g et seul le surnageant a été récupéré, afin d'éliminer le noyau et les organites cellulaires.

Puis la concentration du lysat en NaCl a été ajustée à 150 mM et en MgCl₂ à 10 mM.

1.4. Fractionnements polysomiques

Les gradients de sucrose ont été formés grâce à un formeur de gradient à partir de 5 ml de sucrose 15 % et 5 ml de sucrose 50% (sucrose dilué dans de l'eau traitée DEPC). Le lysat cellulaire (800 µl) a été déposé sur le gradient de sucrose et ultra-centrifugé à 38 000 rpm, pendant 2 heures, à 4°C (ultra-centrifugeuse Beckman (Brea, CA,USA), avec rotor SW41Ti)

Le tube de centrifugation a ensuite été percé par le bas et 16 fractions de 600 µl ont été collectées grâce à un fractionneur de gradient (ISCO, Lincoln, NE, USA). La mesure de la DO à 254 nm des fractions cellulaires a été réalisée en temps réel (dosage des ARN), et un graphe a été tracé pour chaque échantillon. Ces expériences ont été réalisées avec la collaboration de Stephan Vagner (Inserm U563, Toulouse).

1.5. Extraction au Trizol LS des ARN des fractions collectées

Les fractions correspondant aux ARN libres d'une part, et aux ARN liés aux ribosomes d'autre part ont été distinguées grâce au graphe de la DO 254 nm et mélangées ensemble : la fraction « traduite » correspond au mélange des fractions 1 à 7 et la fraction « non-traduite » au mélange des fractions 8 à 16.

Pour chacune des 3 conditions expérimentales, les fractions traduite, non-traduite et totale (correspondant à 100 µl du lysat non fractionné) ont été extraites avec du Trizol LS (Invitrogen), selon le protocole suivant :

Trois volumes de Trizol ont été ajoutés, et après homogénéisation, le tube a été incubé 5 minutes à température ambiante.

Ont ensuite été ajoutés 0,8 volumes de chloroforme, les tubes ont été vigoureusement agités à la main et incubés 15 minutes, toujours à température ambiante. Les tubes ont alors été centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes, à 4°C, puis la phase aqueuse a été récupérée.

10 µg/ml (concentration finale) d'acrylamide linéaire (Invitrogen) ont été ajoutés, pour entrainer les ARN au fond du tube et faciliter la visualisation du culot.

2 volumes (par rapport au volume initial des fractions à extraire) d'isopropanol ont été ajoutés, les tubes ont été mélangés à la main et incubés 10 minutes pour permettre la précipitation des ARN.

Après centrifugation à 12 000 g pendant 30 minutes à 4°C, l'isopropanol a été retiré, et le culot d'ARN a été rincé avec 1 ml d'éthanol 70 %. Après une nouvelle centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, à 4°C, l'éthanol a été éliminé et le tube est resté ouvert à température ambiante jusqu'à séchage du culot d'ARN. Le culot a ensuite été repris dans 40 µl d'H₂O.

Les ARN extraits ont été dosés au spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific)

1.6. Vérification et pool des ARN extraits

Les ARN obtenus ont été dosés grâce au Nanodrop (Thermo Scientific), et leur qualité vérifiée sur puces Agilent RNA 6000 Nano série II, avec le Bioanalyseur 2100 (Agilent).

Le principe de cette puce est de séparer les molécules d'ARN sur gel d'électrophorèse, adapté à un format puce. La puce comporte 12 puits avec des micro-réseaux capillaires dans lesquels ont été déposés un gel marqué avec un composé fluorescent intercalant de l'ARN. Les échantillons d'ARN (100 ng) sont déposés dans les puits dans un tampon. Lors de la lecture sur le Bioanalyseur, des électrodes sont en contact avec chaque puits. Ces électrodes, soumises à un haut voltage, permettent le passage de l'ARN dans le gel des micro-réseaux, et la séparation très rapide des fragments d'ARN selon leur taille. Lors de leur passage dans le gel, les molécules d'ARN sont marquées spécifiquement par l'intercalant, et à la fin de la colonne, les ARN sont détectés par fluorescence. Le résultat est obtenu sous forme d'un électrophorégramme, sur lequel sont visibles les pics correspondant aux ARN ribosomiaux 18S et 28S. Le logiciel calcule un indice de qualité appelé RNA Integrity Number (RIN), allant de 1 à 10. Les ARN peuvent être utilisés pour les puces à ARN s'ils ont un RIN au moins égal à 8.

La visualisation des bandes 28S et 18S de chaque fraction nous permet de vérifier la qualité des ARN et nous a également permis, pour un échantillon test, d'identifier les fractions appartenant aux pics 40S, 60S et 80S, et ainsi de confirmer l'interprétation du profil obtenu en DO 254 lors de la collecte des fractions.

2) Hybridation des puces Agilent

Les ARN répartis en 2 fractions (ARN traduits et ARN non-traduits) ont été hybridés sur des puces d'expression Agilent 4X44k.

Les puces que nous avons utilisées sont constituées de 44 000 sondes ADN de 60 nucléotides fixées sur une lame de verre (4 puces de 44 000 sondes sur une lame) Ces sondes sont complémentaires de la région 3'NC (la région des ARNm la moins dégradée) de 41 000 transcrits humains.

Les ARN à étudier sont marqués avec un fluorophore et hybridé sur la puce. Les ARN se fixent sur les sondes qui leur correspondent, et la lecture de la fluorescence sur les différentes sondes révèle quels sont les ARNm présents dans l'échantillon, et en quelle quantité (selon l'intensité de la fluorescence)

Les ARN peuvent être marqués avec deux fluorophores différents, la cyanine 3 (émet une fluorescence verte), ou la cyanine 5 (émet une fluorescence rouge), cela permet d'hybrider 2 échantillons d'ARN différents, avec deux marquages différents, sur la même puce (nous hybridons donc 8 échantillons par lame de verre).

Les puces contiennent également des sondes complémentaires d'ARN « spike » ou contrôles. Ce sont des ARN non-humains (bactériens), introduits dans la réaction de marquage des ARN. Le mélange d'ARN contrôles contient des ARN non marqués, pour vérifier que la réaction de marquage s'est bien déroulée, et des ARN déjà marqués en Cy3 ou Cy5 (selon le marquage réalisé sur l'ARN à contrôler), pour vérifier que l'hybridation sur la puce s'est bien déroulée.

Tous les réactifs utilisés pour la préparation des ARN sont fournis dans le kit Agilent Oligo Microarray. Les ARN messagers sont amplifiés par une réaction de rétro-transcription avec des amorces polyT (amplifient spécifiquement les ARN messagers en se fixant sur leur queue polyA), puis des ARN marqués sont obtenus par une réaction de transcription à partir de cet ADNc en incorporant les fluorophores.

2.1. Marquage des ARN

2.1.1. Rétrotranscription des ARN en ADNc

Le mélange suivant a été incubé à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer les ARN et les amorces :

ARN dilué (500 ng)	8,3 µl
ADNc contrôles (spikes) A ou B	2 µl
Amorce avec promoteur T7	1,2 µl

Le mélange a ensuite été refroidi sur glace pendant 5 minutes.

Puis le mélange de rétro-transcription a été ajouté :

Tampon 5x	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
dNTP 10 mM chaque	1 µl
Rétro-transcriptase MMLV	1 µl
Rnase OUT	0,5 µl

La reverse-transcription s'est déroulée à 40°C pendant 2 heures.

2.1.2. Transcription

Cet ADNc a ensuite servi de matrice à une transcription *in vitro* incorporant des CTP (cytosine triphosphate) marqués avec le fluorophore Cyanine3 ou Cyanine5.

Sur chaque puce ont été hybridés deux échantillons, un marqué au Cy3 (émet une fluorescence verte) et l'autre marqué au Cy5 (émet une fluorescence rouge). La Cy5 est moins bien incorporée que la Cy3, donc pour éviter un biais dans le marquage des ARN, pour chaque duplicate un échantillon a été marqué en Cy3 et l'autre en Cy5. De plus, on a alterné les fluorophores également entre les différentes catégories échantillons (traduits-non-traduits, infectés-non infectés).

La transcription a été effectuée en rajoutant le mélange suivant à chaque réaction (60 μ l) :

H ₂ O	15,3 μ l
Tampon de transcription 4x	20 μ l
DTT 0,1M	6 μ l
NTP	8 μ l
PEG 50%	6,4 μ l
Rnase OUT	0,5 μ l
Phosphatase inorganique	0,6 μ l
ARN polymérase T7	0,8 μ l
Cyanine 3-CTP ou cyanine 5-CTP	2,4 μ l

La réaction a été incubée 2 heures à 40 °C.

Les ARNc marqués obtenus ont été purifiés avec le kit RNeasy (Qiagen), puis contrôlés sur Nanodrop, pour la quantité d'ARN obtenue et l'intensité du marquage Cy3 ou Cy5. On a calculé l'activité spécifique de chaque ARN, qui correspond au nombre de pmol de Cy3 ou Cy5 par μ g d'ARN. Cette valeur doit être supérieure à 8 si le marquage des ARN s'est bien déroulé. Tous les ARN avaient une activité spécifique supérieure à 8 et on donc pu être hybridés.

2.2. Hybridation

Les ARN (1 marqué au Cy3 et 1 Cy5 mélangés) ont été clivés en fragments de 100 à 500 pb par action d'un tampon de fragmentation à 60°C pendant 30 minutes.

ARN marqué Cy3	825 ng
ARN marqué Cy5	825 ng
Agent bloquant 10x	11 μ l
H ₂ O	qsp 52,8 μ l
Tampon de fragmentation 25x	2,2 μ l

La fragmentation a été stoppée par addition du tampon d'hybridation (55 μ l)

Les 110 μ l de la réaction ont été déposés sur les spots de la lame et l'hybridation s'est faite dans un four à hybridation, à 65°C pendant 17h, en rotation (10 rpm).

La lame a ensuite été rincée 2 fois pendant une minute avec les tampons de lavage, séchée avec de l'acétonitrile et la solution de stabilisation puis scannée (DNA microarray scanner, Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA). Le scanner mesure l'intensité de la fluorescence rouge ou verte émise à chaque spot (le spot apparaît en jaune si les deux couleurs sont présentes), et construit une image. Les données de la photo ont été extraites avec le logiciel « Agilent Feature Extraction Software », qui attribue l'intensité de fluorescence de chaque spot avec le nom de la sonde et du gène.

3) Analyse des données des puces

Pour s'affranchir des variations dues aux différences de fluorescence et d'incorporation des 2 fluorophores, ainsi que celles dues au scan des puces, les 36 puces ont été normalisées par la méthode globale de Lowess, en utilisant le logiciel R. Cette méthode suppose que la plupart des gènes de la puce sont invariants entre les trois conditions testées. Un profil médian (avec la médiane de chaque gène) est calculé et chaque puce est normalisée par rapport à lui. La méthode de Lowess est une série de régressions linéaires entre le profil de l'échantillon et le profil médian. Les régressions ne sont pas globales mais par petites fenêtres, ce qui permet également de corriger les distorsions de la distribution (dues au bruit de fond et à la saturation du signal pour les fortes intensités).

Après normalisation, nous avons éliminé les gènes dont les valeurs étaient faibles (inférieures à 300) pour les 3 conditions testées, les valeurs faibles étant susceptibles de varier beaucoup et n'étant donc pas fiables.

Un test de Student a ensuite été réalisé pour chaque gène, en comparant les conditions deux par deux. Ce test statistique a été choisi car il est très robuste (peu sensible aux valeurs extrêmes), et il a été réalisé en utilisant la correction de Welch pour les variances inégales entre les groupes.

Les gènes pour lesquels la p-value était inférieure à 0,01 (taux de faux-positifs de 1 %) ont été retenus comme différentiellement exprimés. La différence d'expression (Fold change) a également été calculée comme le rapport des moyennes des valeurs d'expression des 2 conditions. Cette différence d'expression permet de connaître l'amplitude de la variation

observée, et est donc importante pour la signification biologique des variations mises en évidence. Tous ces calculs ont été réalisés avec le logiciel Excel (Microsoft Office).

Le « clustering » (analyse de groupement) des échantillons a été réalisé avec le logiciel Cluster 3.0 (Stanford University) puis visualisé avec JavaTreeView (Alok Saldanha). Ce groupement consiste à définir des groupes d'échantillons ayant un profil d'expression des gènes similaire et, de la même façon, les groupes de gènes ayant un comportement similaire dans les différents échantillons. Un arbre est ainsi construit (un pour les échantillons et un pour les gènes), avec des longueurs de branches correspondant à la distance entre les profils. Le mode de calcul choisi est le calcul centroïde, où la distance considérée entre deux groupes est la distance entre les centres des 2 groupes.

L'analyse de groupement des échantillons a servi à valider la manipulation, depuis l'infection des cellules jusqu'à la lecture des puces : nous avons pu vérifier que les échantillons d'un même groupe étaient regroupés ensemble et avaient un profil différent des échantillons des autres groupes.

L'analyse de groupement des gènes sert à identifier visuellement les groupes de gènes différentiellement exprimés, en complément des méthodes statistiques. De plus, il a été montré qu'un cluster de gènes correspond à une fonction biologique commune.

Les fonctions biologiques surreprésentées dans les différentes listes de gènes différentiellement exprimés ont été déterminées grâce au logiciel en ligne Gominer (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/>), qui se sert des termes « Gene Ontology » attribués à chaque gène, et calcule l'enrichissement de chaque fonction dans la liste de gènes sélectionnés par rapport à la liste totale de gènes de départ. Cela est déterminé par la comparaison des fréquences de chaque terme GO dans le cluster et dans la puce en utilisant le test exact de Fisher. Les fonctions statistiquement surreprésentées ($p < 0,01$, test exact de Fisher) ont été prises en compte pour l'interprétation des résultats.

Les tailles des régions 5' et 3'NC, de la région codante et des ARNm complets des gènes présents sur les puces ont été calculées à partir du fichier de UCSG Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>). Pour éviter les redondances, quand un transcrit était présent plusieurs fois (ce fichier compile les données obtenues de différentes sources), la longueur d'ARNm la plus longue a été gardée. Des données de taille ont été obtenues pour 17 132 transcrits de la puce.

4) Western blot

4.1. Extraction des protéines totales

Les protéines des cellules Huh7, non-infectées, infectées ou infectées puis traitées ont été extraites à partir de 500 000 cellules reprises dans 150 µl de tampon de lyse RIPA. La lyse s'est effectuée sur glace pendant 30 minutes, puis le surnageant a été récupéré après centrifugation 10 minutes à 12 000 g à 4°C.

4.2. Dosage des protéines extraites

Les protéines extraites ont été dosées avec le kit BCA de Pierce (Waltham, MA, USA). Il s'agit d'un dérivé de la méthode de Lowry, les protéines sont dosées par réaction colorimétrique. Le cuivre (Cu^{2+}) contenu dans le mélange réactionnel est réduit par les protéines (en Cu^+) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique (BCA) réagit ensuite avec le cuivre réduit et produit un composé de couleur violette (1 molécule d'acide bicinchoninique chélate 2 molécules de cuivre Cu^+) qui présente une forte absorption à 562 nm, proportionnelle à la concentration en protéines.

Les dosages ont été réalisés grâce à une gamme étalon de la protéine BSA (bovine serum albumine, albumine de sérum bovin), entre 0 et 1 µg/µl. Pour le dosage, 2,5 µl de protéines ont été diluées dans 25 µl d' H_2O finale (afin que la concentration de l'échantillon se trouve dans la gamme étalon), puis 200 µl de réactif BCA ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la lecture a été faite sur un lecteur de plaque ELISA, à 570 nm.

10 µg de protéines de chaque échantillon ont été dénaturées dans du tampon de charge avec 10% de β-mercaptoéthanol à 95°C pendant 5 minutes, puis déposées dans un gel d'acrylamide 4-12% Bis-tris (Invitrogen), la migration s'est faite dans les cuves *XCell SureLock™ Mini-Cell* (Invitrogen), avec du tampon MES (Invitrogen), à 200V pendant 45 minutes. Un marqueur de taille protéique a également été déposé (*Novex sharp pre-stained ladder*, Invitrogen).

Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose (*Hybond ECL*, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), par transfert semi-liquide, dans du tampon de transfert (20% d'éthanol, 48 mM de Tris, 39 mM de glycine, 3,75 mM de SDS). Les sites de fixation aspécifiques des anticorps ont été bloqués par incubation de la membrane dans du TBS Tween (TBST, composé de 50 mM de Tris, 137 mM de NaCl, 0,05 % de Tween 20) avec 5% de lait pendant une heure. Les anticorps ont été dilués dans du TBST + lait 5%. La

membrane a été incubée avec l'anticorps primaire toute la nuit, sous agitation, à +4°C. L'excès d'anticorps primaire a été éliminé par 3 rinçages avec du TBST. La membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire (couplé à la HRP) pendant 1 heure sous agitation, à température ambiante. L'excès d'anticorps secondaire a été éliminé par 3 lavages de 15 minutes de TBST.

La révélation a été réalisée par incubation pendant 5 minutes de la membrane dans de l'ECLplus (GE Healthcare), contenant du luminol qui est catalysé par la HRP pour produire de la luminescence.

Les images ont été obtenues en scannant la membrane avec le scanner Typhoon 9410.

Pour le marquage anticorps des phosphoprotéines, l'incubation de la membrane et la dilution des anticorps a été faite dans du TBST + 5% de BSA (au lieu de 5 % de lait, en effet, le lait est riche en caséine, phosphoprotéine sur laquelle se fixent de façon non-spécifique les anticorps dirigés contre des phosphoprotéines, causant un bruit de fond important).

Tableau VI : Liste des anticorps primaires utilisés pour les Western blots

Protéine détectée	Poids moléculaire de la protéine	Référence de l'anticorps	Fabriquant	Dilution anticorps primaire	Espèce dont provient l'anticorps
eIF4E	25 kDa	610269	BD Biosciences	1/5000	souris
Phospho-eIF4E	25 kDa	9741	Cell-signaling	1/2000	lapin
eIF2α	36 kDa	2103	Cell-signaling	1/10000	souris
Phospho-eIF2α	36 kDa	9721	Cell-signaling	1/5000	lapin
GAPDH	36 kDa	Sc-20357	Santa-cruz	1/2000	chèvre
Actine	47 kDa	Sc-1615	Santa-cruz	1/2000 ??	chèvre
La (SSB)	46 kDa	Sc-21393	Santa-cruz	1/2000	souris
c-Jun	36 kDa	Sc-1694	Santa-cruz		lapin

Tableau VII : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les Western blots (conjugués HRP)

IgG ciblées	Référence de l'anticorps	Fabriquant	Dilution anticorps secondaire
Anti-souris	Sc-2005	Santa-Cruz	1/1000
Anti-lapin	Sc-2004	Santa-Cruz	1/1000
Anti-chèvre	Sc-2020	Santa-Cruz	1/1000

Figure 46 : Détection par Western Blots des protéines La, JUN, GAPDH et β -actine, à partir de protéines totales extraites de cellules Huh7 infectées par JFH1 (INF), non-infectées (NI) et infectées puis traitées (AV). Les tailles sont indiquées en kDaltons.

Résultats

I. Etude de la régulation traductionnelle de l’IRES du VHC

1) Travaux antérieurs de l’équipe : compartimentation traductionnelle du VHC

Les travaux antérieurs de l’équipe de Cyrille Féray ont montré une compartimentation cellulaire fonctionnelle de différents IRES isolés à partir de patients.

Les séquences IRES de variants VHC présents dans le plasma ou spécifiques des lymphocytes B ont été clonées et testées fonctionnellement dans des lignées cellulaires hépatocytaires et lymphocytaires. Les IRES des souches plasmatiques avaient une activité optimale dans des hépatocytes alors que leurs efficacités étaient deux à trois fois plus faibles dans des lignées lymphocytaires B. Dans les hépatocytes, les IRES des souches spécifiquement lymphotropes étaient deux à trois fois moins efficaces que les IRES des souches plasmatiques (Figure 20). Quand plusieurs variants IRES provenant d’un même compartiment ont pu être étudiés, ceux-ci avaient la même activité traductionnelle, quel que soit le type cellulaire testé. Pour les 19 variants IRES testés (provenant de 6 patients) la présence du variant dans un compartiment était corrélée à son efficacité traductionnelle dans le type cellulaire concerné. Cela suggère fortement que la compétition entre souches ayant des IRES distincts est régulée par l’efficacité traductionnelle et ce différemment suivant le site de réplication virale.

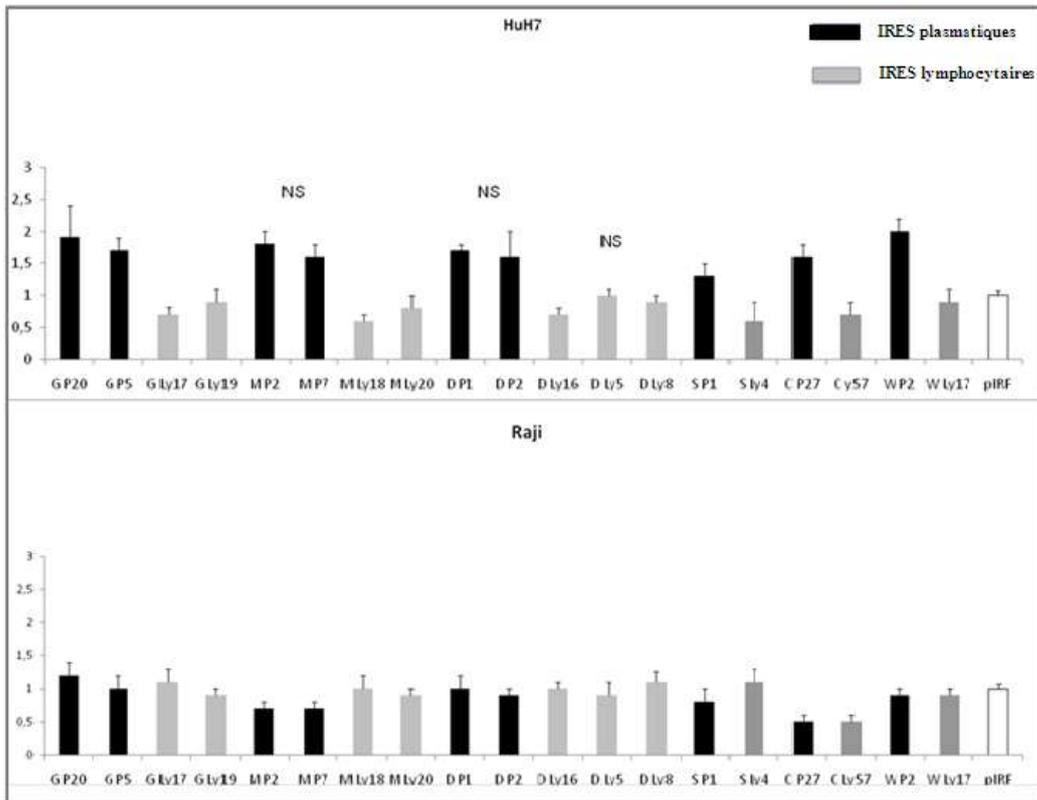


Figure 20 : Efficacités traductionnelles de 19 IRES dans les cellules Huh7 et RAJI

Les efficacités traductionnelles sont déterminées par le ratio Firefly luciférase / Renilla luciférase. Les efficacités des IRES plasmiques sont représentées en noir et celles des IRES lymphocytaires en gris. Dans la lignée cellulaire Huh7, les IRES lymphocytaires sont systématiquement moins actives que les IRES plasmiques. Dans la lignée RAJI, les IRES ont des efficacités traductionnelles équivalentes quelle que soit leur origine.

2) Contrôles de l’existence d’un promoteur interne dans l’IRES du VHC

2.1. Modèle d’étude utilisé : plasmide bicistronique

La construction plasmidique utilisée dans cette étude pour comparer les efficacités traductionnelles des différents variants IRES est dérivée du plasmide PIRF, déjà décrit par ailleurs (Laporte et al., 2000). Le principe de cette construction est d’insérer l’IRES à étudier entre deux gènes rapporteurs, sous la dépendance d’un seul promoteur transcriptionnel. Après transfection dans des cellules, ce plasmide permet la transcription d’un ARN bicistronique contenant les deux gènes rapporteurs. Le premier, la *Firefly* luciférase (F luciférase) sera traduit de façon classique, coiffe-dépendante, alors que le deuxième, la *Renilla* luciférase (R luciférase) est traduit grâce à l’IRES (Figure 21). Les activités de ces deux luciférases sont ensuite mesurées par luminométrie, après ajout de substrats spécifiques à chacune de ces deux enzymes. On normalise ensuite l’activité R luciférase, reflet de l’activité traductionnelle de l’IRES, par celle de la F luciférase (ratio R/F). Cette normalisation est optimale puisque les

deux enzymes sont traduites à partir du même ARN messager. Ce système d’étude bicistronique est la méthode de référence pour étudier l’efficacité des IRES à initier la traduction.

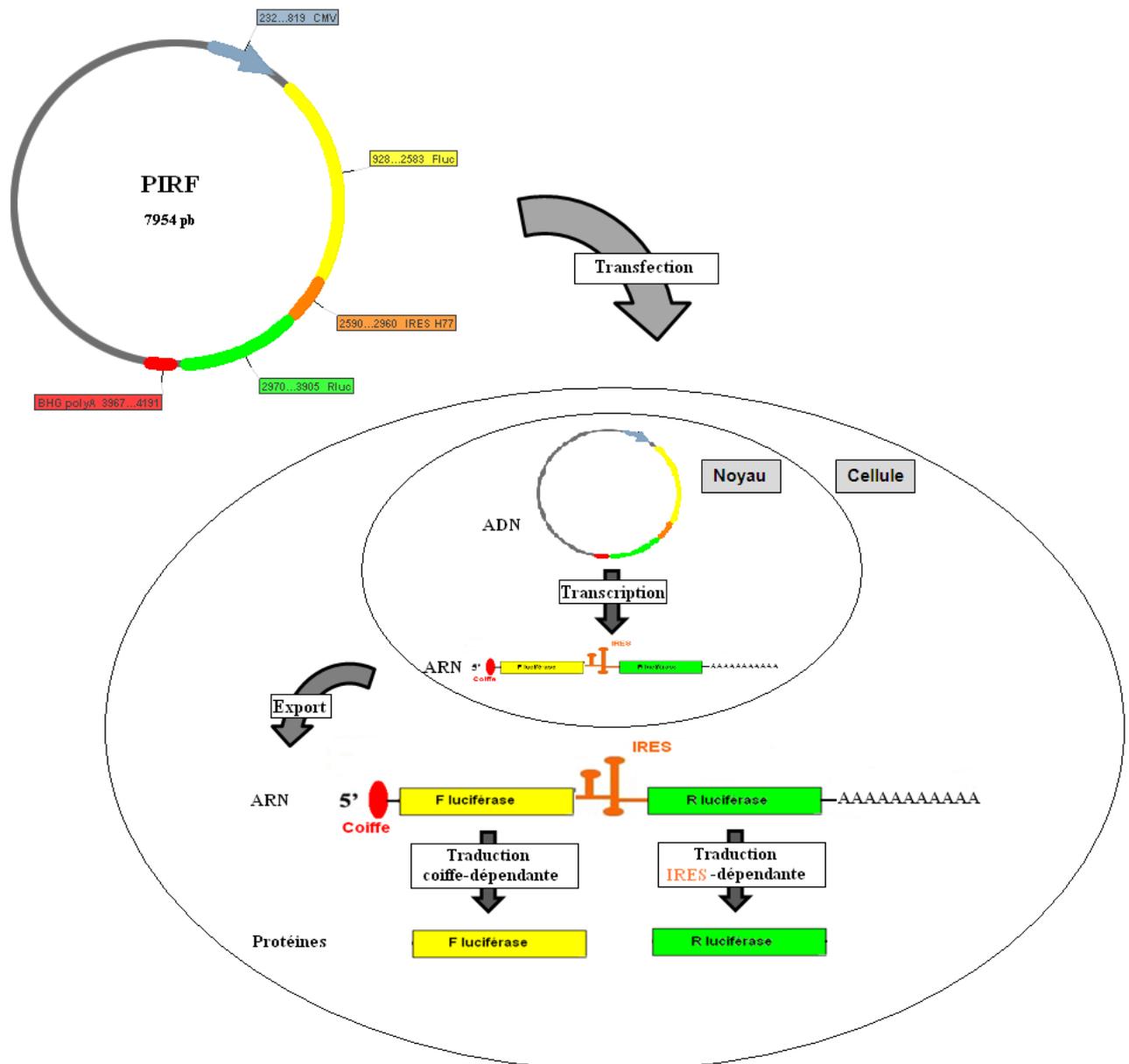


Figure 21 : Principe du modèle d’étude plasmidique bicistronique PIRF

Le plasmide PIRF, comprenant l’IRES inséré entre 2 gènes rapporteurs, est transfecté dans une cellule. Dans le noyau, il sera transcrit en un ARNm bicistronique. Cet ARN sera traduit dans le cytoplasme, le premier gène rapporteur, la Firefly luciférase, sera traduit de façon coiffe-dépendante, alors que la traduction de la Renilla luciférase sera sous la dépendance de l’IRES étudié.

2.2. Existence d’un promoteur interne dans l’IRES du VHC

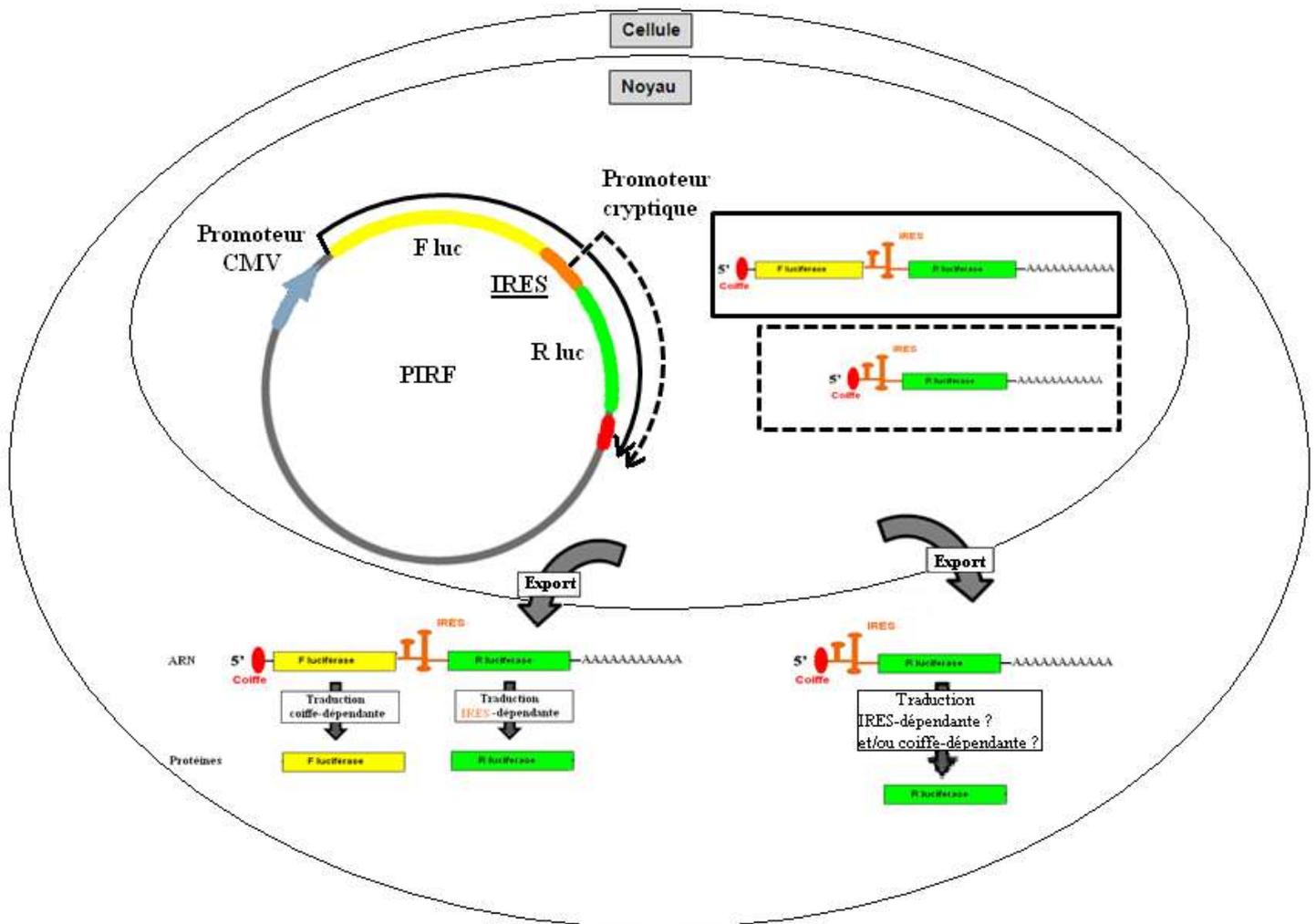


Figure 22 : Conséquences de l’existence d’un promoteur interne dans la séquence de l’IRES sur la mesure du ratio R/F

Le plasmide PIRF est transcrit dans le noyau en un ARN bicistronique grâce au promoteur CMV. La présence d’un promoteur interne dans l’IRES dirige la transcription d’un ARN monocistronique, ne comportant pas le gène de la Firefly luciférase. Cet ARN monocistronique pourra être traduit de façon coiffe et/ou IRES-dépendante.

Il a été montré que l’IRES du VHC possède un promoteur cryptique dans sa séquence sous forme ADN (Dumas et al., 2003). Ce promoteur dirige la transcription d’un ARN monocistronique, composé de l’IRES et de la R luciférase, et coiffé en 5’. Ce promoteur interne se situe au début de la séquence IRES, mais il n’a pas été localisé exactement. Il n’est

pas clair si la séquence IRES, incomplète, comprise dans cet ARN monocistronique est capable d’initier la traduction de la R luciférase, ou si celle-ci se fait exclusivement de façon coiffe-dépendante. Dans tous les cas, la production R luciférase à partir de cet ARN monocistronique fausse le rapport R luciférase sur F luciférase et entraîne une surestimation de l’activité de l’IRES (figure 22).

La contribution du promoteur interne de l’IRES aux résultats de cette étude a donc été recherchée. On pourrait imaginer que l’activité, ou même la présence, de ce promoteur dépend de la séquence de l’IRES, et qu’elle pourrait également varier suivant le type cellulaire. Les différences d’activités IRES observées dans cette étude pourraient ainsi résulter uniquement de différences de l’activité promotrice de l’IRES et non de différences de l’activité traductionnelle de l’IRES.

Il faut noter qu’il pourrait également exister des sites d’épissage alternatif cryptiques, entraînant la formation d’un transcrit monocistronique par épissage, comme cela a été décrit pour d’autres IRES (Baranick et al., 2008). La production de ce deuxième transcrit fausse les résultats de la même façon que lorsqu’une transcription a lieu à partir d’un promoteur cryptique situé dans l’IRES. Même si un tel phénomène n’a jamais été montré pour l’IRES du VHC, on ne peut exclure que de tels sites puissent être présents dans certaines séquences IRES utilisées.

Deux expériences de contrôle ont donc été réalisées, la première pour vérifier l’absence de transcrit monocistronique indésirable et la deuxième pour confirmer nos résultats en l’absence de ces biais potentiels.

2.3. Contrôle n°1 : siRNA anti F-luciférase

Le premier contrôle a été la co-transfection du plasmide bicistronique avec un siRNA dirigé contre la F luciférase. Ce siRNA détruit donc les ARN bicistroniques, comportant la F luciférase, mais laisse intacts les éventuels plasmides monocistroniques R luciférase transcrits à partir du promoteur interne.

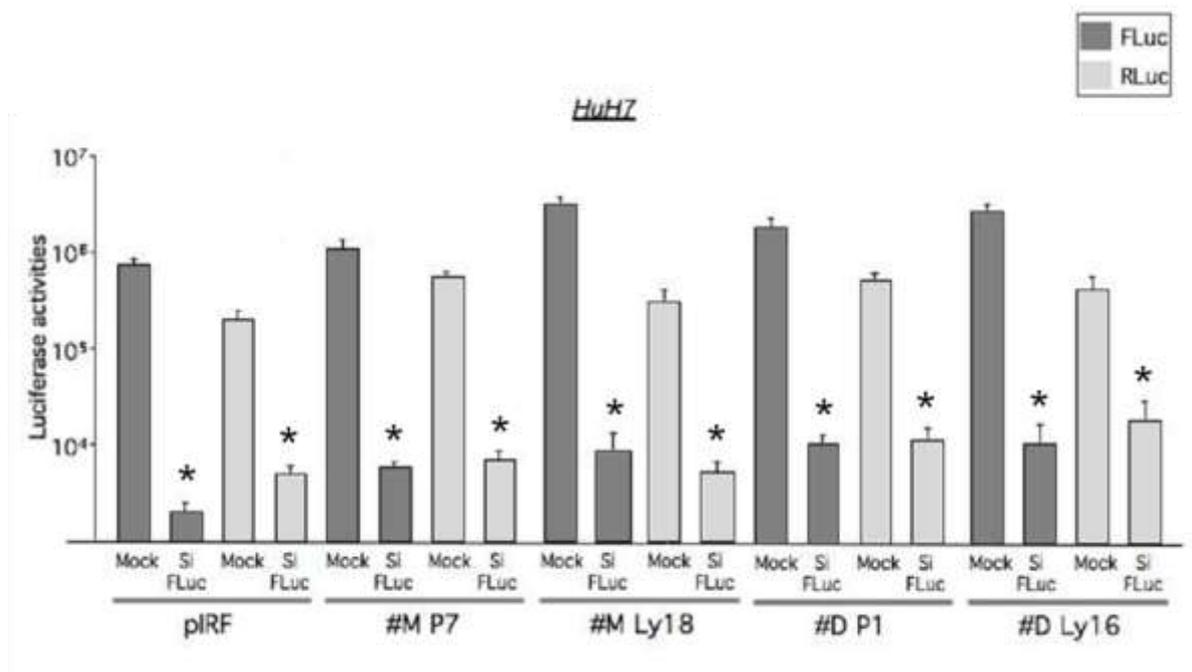


Figure 23 : Effet du silencing de la F luciférase sur les activités F et R luciférases de différents IRES

Les activités de la F luciférase (en gris foncé) et de la R luciférase (en gris clair), en unités arbitraires de luminescence, sont représentées pour chaque variant lors de la transfection d’un siRNA contrôle (Mock) ou du siRNA anti- Firefly luciférase (Si FLuc). Les noms des variants correspondent à l’identifiant du patient (#M), sa provenance (P : plasmatique, Ly : lymphocyte)

Ces expériences ont montré une inhibition de plus de 2 logs de l’activité de la F luciférase en présence du siRNA anti-F luciférase. L’expression de la R luciférase est inhibée d’un facteur 50 en moyenne (figure 23). Il existe donc bien un transcrit aberrant monocistronique comportant uniquement le gène de la R luciférase, mais en quantité très faible (environ 1% de la quantité des transcrits bicistroniques). La contribution de la transcription due au promoteur interne dans l’activité R luciférase mesurée est donc très faible et peut être négligée dans notre étude. Ce taux de transcription est très inférieur à ce qui avait été rapporté précédemment (Dumas et al., 2003), indiquant que la force du promoteur interne pourrait être équivalente à celle du promoteur viral CMV (cytomégalovirus), souvent utilisé dans les constructions plasmidiques.

2.4. Contrôle n°2 : Transfection d’ARN transcrit *in vitro*

La transfection directe d’un ARN bicistronique transcrit *in vitro* permet d’éviter le biais induit par la présence du promoteur interne (ou de sites d’épissages alternatifs) dans la séquence ADN (artificielle) de l’IRES du VHC.

La transfection d’ARN comportant les séquences IRES plasmatiques et lymphocytaires de deux patients a été réalisée dans des cellules Huh7 et RAJI, et les différences d’activité IRES (différences des ratios R/F) étaient comparables à ce qui avait été observé avec la transfection de la forme ADN (figure 24). Les IRES des variants plasmatiques sont plus efficaces que les variants lymphocytaires dans les cellules Huh7, alors qu’ils ont des efficacités comparables dans les cellules RAJI (pour un patient, le variant lymphocytaire était même plus efficace que le variant plasmatique dans ces cellules).

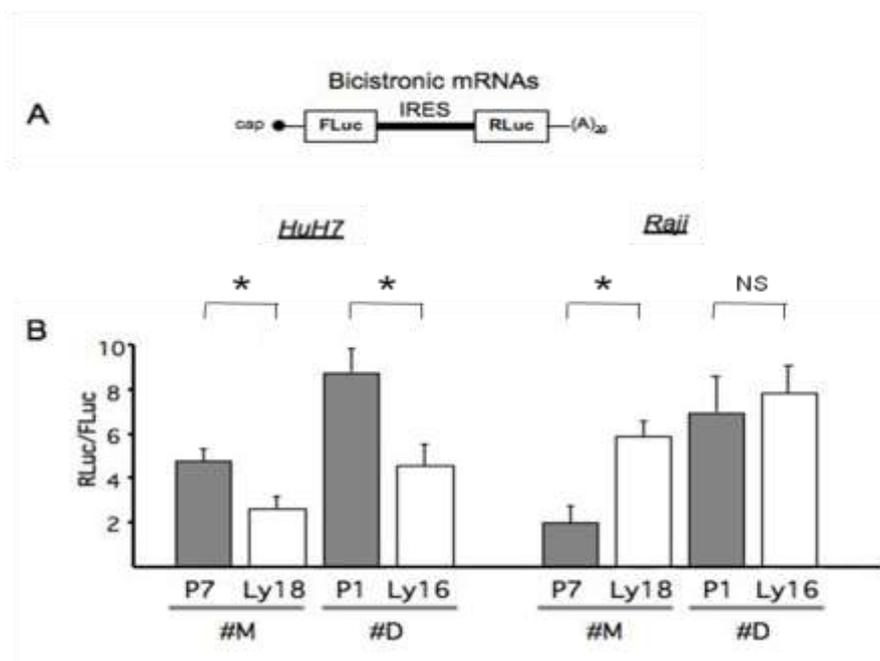


Figure 24 : Transfection d’ARN bicistroniques transcrits *in vitro* dans les cellules Huh7 et RAJI

A : Représentation des ARN bicistroniques coiffés et polyadénylés transcrits *in vitro*.

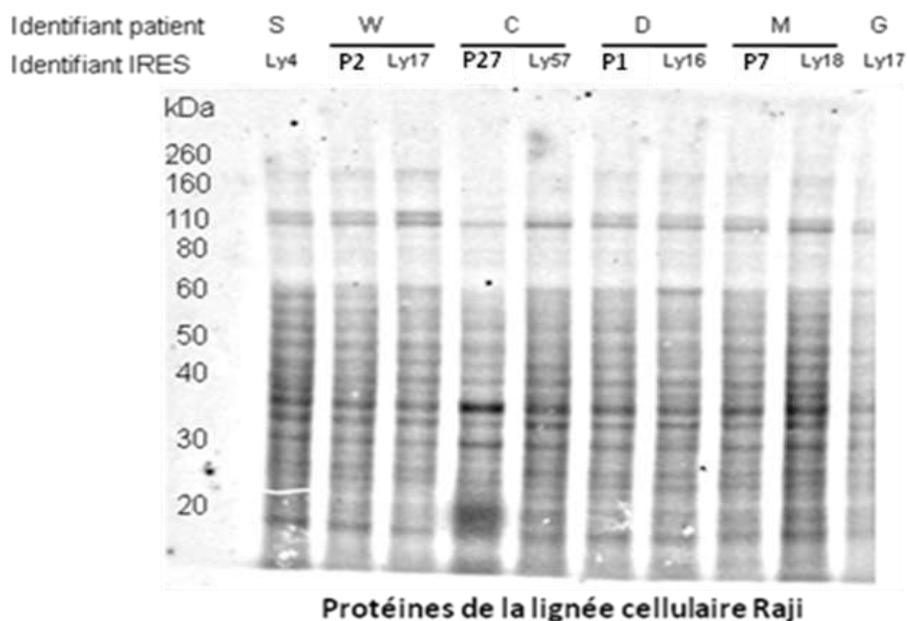
B : Ratio R luciférase / F luciférase (activité traductionnelle) de quelques variants IRES dans des cellules Huh-7 ou RAJI. Les variants plasmatiques sont en gris foncé, les variants lymphocytaires en blanc. Dans les cellules Huh7, les variants plasmatiques sont les plus efficaces (* = p-value < 0,05 par le test de Mann-Whitney). Dans les cellules RAJI, les variants ont la même efficacité (NS = différence non significative), et pour un patient (# M), l’IRES plasmatique est la plus efficace.

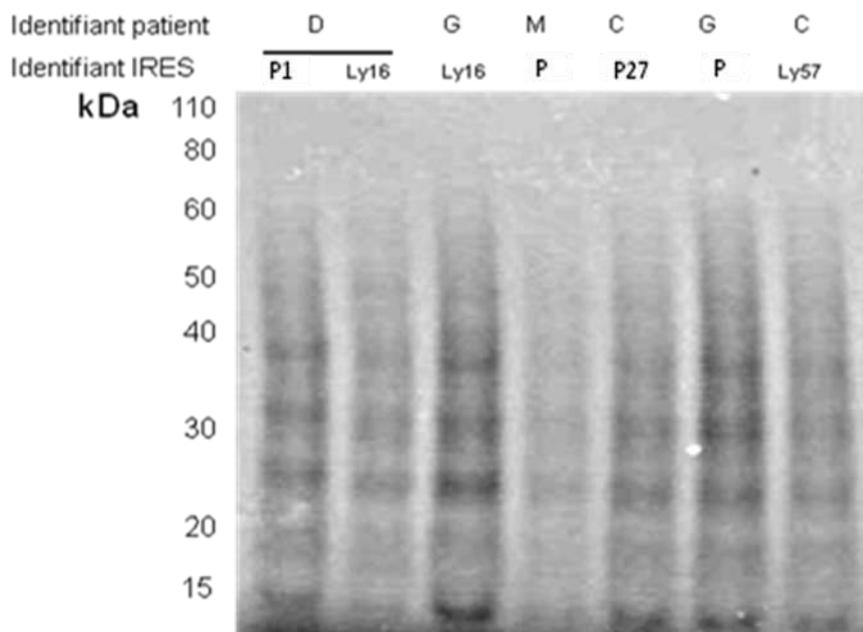
Ces deux contrôles ont permis de valider les résultats et cette étude vient d’être acceptée pour publication dans le journal Gut (Annexe I : Durand T, Di Liberto G, Colman H, Cammas A, Boni S, Marcellin P, Cahour A, Vagner S, Feray C. 2010. Occult infection of peripheral B-

cells by hepatitis C variants which have low translational efficiency in cultured hepatocytes. Gut. In press).

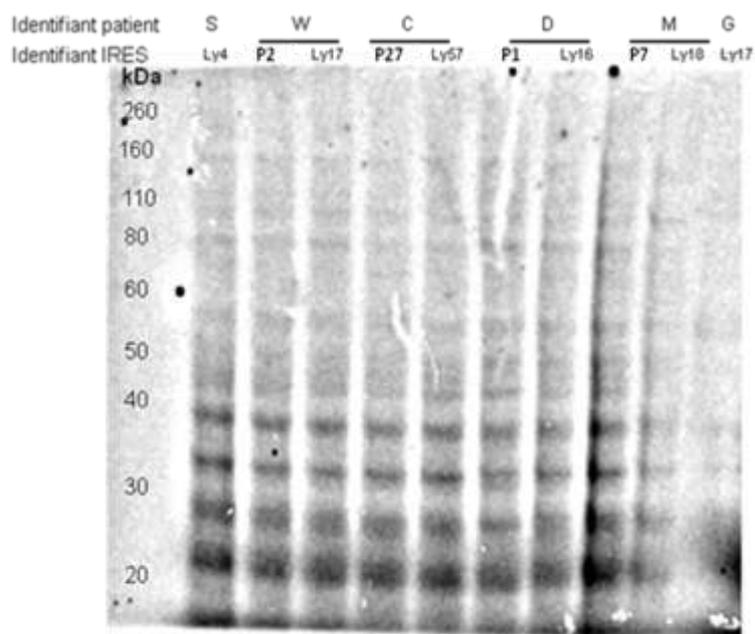
3) Recherche des protéines cellulaires (ITAFs) conditionnant le tropisme cellulaire de l’IRES

L’explication la plus évidente aux variations d’activité des IRES suivant le type cellulaire est qu’ils interagissent avec certaines protéines cellulaires (des ITAFs, IRES Trans-acting factors) présentes en quantités différentes selon le type cellulaire. De plus, cette activité cellule-spécifique varie selon la séquence IRES, on peut donc penser que certaines séquences recrutent plus efficacement certains ITAFs cellule-spécifiques. Dans le but d’expliquer la spécificité cellulaire des variants IRES, les ITAFs qui pourraient se lier différenciellement aux IRES provenant de différents compartiments, et présents en quantités différentes dans les lignées cellulaires hépatocytaires ou lymphocytaires, ont été recherchés. Pour cela, la technique de l’UV cross-link a été utilisée. Elle consiste à lier, grâce à une irradiation UV, des ARN marqués radioactivement (les IRES) aux protéines qui interagissent avec ceux-ci de manière spécifique (les ITAFs). Les protéines marquées radioactivement sont séparées par électrophorèse en deux dimensions. Ainsi, cette technique a permis de déterminer les profils d’ITAFs présents dans les extraits protéiques des lignées cellulaires HUH7 et RAJI, ainsi que dans les protéines extraites d’une biopsie hépatique.





Protéines de la lignée cellulaire Huh7



Protéines extraites d'une biopsie de foie

Figure 25 : Expériences de cross-link de différents IRES avec des extraits protéiques de lignées Huh7, RAJI, ou de biopsie hépatique (autoradiographie)

Autoradiographie de la migration en SDS-page des protéines liées à l’ARN radioactif. L’échelle de poids moléculaire, en kDa, est indiquée sur la gauche. Les patients sont identifié par une lettre, les variants IRES sont identifiés suivant leur provenance (Ly : lymphocyte, P : plasma) puis suivant leur numéro de clone.

On peut déjà remarquer que les profils d’ITAFs se fixant aux IRES sont différents entre les cellules lymphocytaires et hépatocytaires, et sont même différents entre la lignée hépatocytaire Huh7 et un extrait de tissu hépatique humain (figure 25). On peut voir que l’IRES du VHC interagit avec de nombreuses protéines cellulaires, et les profils d’ITAFs diffèrent de façon qualitative et quantitative suivant le type cellulaire. Il semble donc acquis que les ITAFs modulent l’activité de l’IRES de façon cellule-spécifique.

Le deuxième intérêt de cette étude est la comparaison des profils ITAFs de plusieurs variants IRES, ce qui n’a jamais été réalisé. En comparant les profils obtenus dans la lignée RAJI (figure 26), on remarque la présence de deux bandes, à environ 60 et 110 kDa, présentes de façon beaucoup plus intense pour les IRES d’origine lymphocytaire. Le recrutement plus efficace de ces ITAFs spécifiques des lymphocytes par ces variants IRES permettrait d’expliquer leur meilleure activité (et leur présence) dans les lignée lymphocytaires.

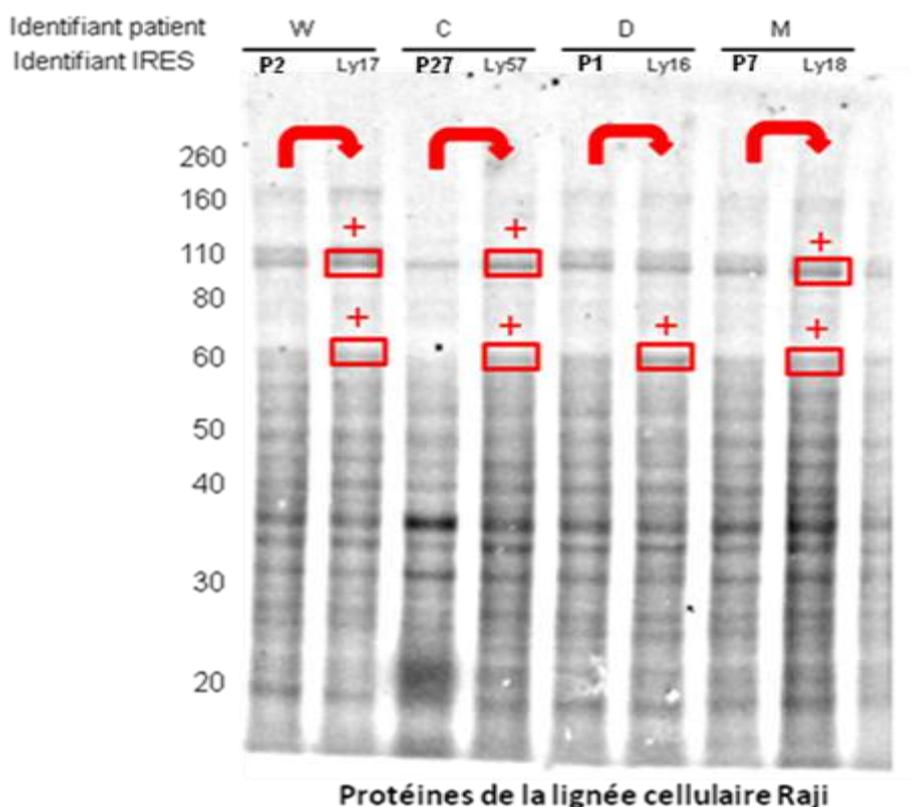


Figure 26 : Comparaison des profils cross-link des variants IRES plasmatiques et lymphocytaires avec des protéines de la lignée lymphocytaire RAJI

Les bandes différant en intensité entre les variants plasmatiques (P) et lymphocytaires (Ly) sont encadrées. Les bandes correspondant à des protéines de poids moléculaire de 60 et 110 kDa sont plus intenses pour les IRES lymphocytaires que pour les IRES plasmatiques.

Par contre, sur les expériences effectuées avec des protéines de cellules Huh7, on ne voit pas de différences de profil pouvant expliquer la plus forte activité des IRES plasmatiques dans ces cellules. Il pourrait exister un ITAF activateur, présent seulement dans ces cellules (ou présent en quantité plus importante que dans les cellules lymphocytaires), ou un ITAF inhibiteur se fixant de façon préférentielle aux IRES d’origine plasmatique. Il se pourrait qu’il existe des petites variations d’affinité trop faibles pour être détectées par cette technique, on peut imaginer qu’une petite différence de fixation d’ITAF puisse entraîner une grande modification d’activité traductionnelle de l’IRES.

De plus, il faut noter que dans ces expériences les protéines sont en excès par rapport aux IRES, alors que dans un type cellulaire donné il peut y avoir une compétition entre différents variants IRES, ou avec des ARN cellulaires, pour le recrutement d’ITAFs en quantité limitante. Dans ce cadre, on comprend qu’une faible augmentation de l’affinité pour un ITAF puisse devenir un avantage sélectif important.

Il est prévu de réaliser ces expériences en faisant migrer les protéines en deux dimensions, pour permettre l’identification plus fine de facteurs se fixant de façon différente aux différents variants IRES. En effet, quand la migration est effectuée en une seule dimension, plusieurs ITAFs migrent à la même hauteur, et un ITAF présentant de petites différences de profil peut être masqué par la présence d’un autre ITAF présent en quantité plus importante migrant au même endroit.

Les ITAFs différenciellement exprimés restent également à identifier par immuno-précipitation de protéines candidates.

4) Recherche d’un modèle pour l’étude du rôle de la 3’NC dans la traduction IRES-dépendante du VHC

Le modèle d’étude qui a été utilisé, le plasmide bicistronique comportant la séquence IRES à étudier insérée entre deux gènes rapporteurs, est le « gold standard » pour l’étude des activités IRES mais il souffre de plusieurs biais. Nous avons déjà évoqué l’existence d’un promoteur transcriptionnel dans l’IRES (sous forme ADN) pouvant lourdement biaiser les résultats. Deux autres points ont retenu notre attention, il s’agit de l’intervention de la région 3’NC qui coopère avec l’IRES pour l’initiation de la traduction qui n’a pas été prise en

compte, et l’utilisation d’un plasmide bicistronique ne permettant pas une étude de la fonction de l’IRES dans son contexte optimal.

4.1. Comparaison des modèles plasmidiques bi- et mono-cistroniques

Le rôle de la région 3’NC dans l’initiation de la traduction IRES-dépendante est aujourd’hui bien établi, et malgré certains résultats contradictoires, il semble que la 3’NC stimule la traduction IRES-dépendante. Cette action passe sans doute par l’interaction indirecte des régions 5’NC et 3’NC, grâce à la fixation de protéines cellulaires et/ou virales.

La région 3’NC du VHC a été insérée après le gène rapporteur R luciférase dans le contexte du plasmide bicistronique, ainsi que dans un plasmide monocistronique comportant uniquement l’IRES dirigeant la traduction de la R luciférase. Dans le cas du plasmide monocistronique, celui-ci est co-transfecté avec un plasmide monocistronique F luciférase, pour pouvoir effectuer la normalisation de l’activité R luciférase.

Pour ces tests, les séquences de l’IRES et de la 3’NC utilisées sont celles de la souche H77 (génotype 1a).

Toutes les transfections ont été réalisées dans la lignée hépatocytaire Huh7.

Ces expériences n’ont mis en évidence aucun effet significatif de la région 3’NC sur la traduction IRES-dépendante, que ce soit dans le contexte d’un plasmide bicistronique ou monocistronique (Figure 27).

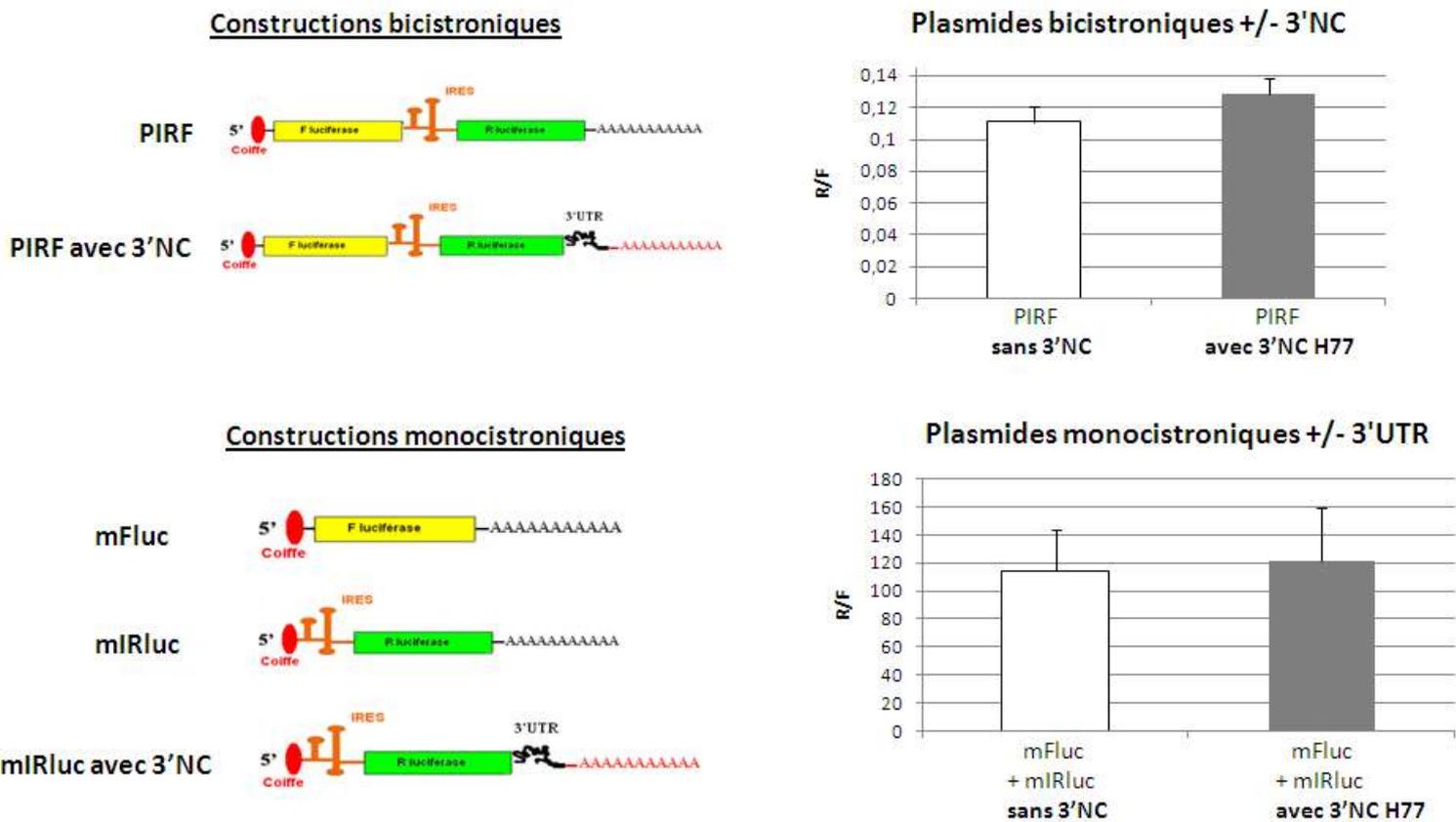


Figure 27 : Transfections de plasmides bicistroniques ou monocistroniques avec ou sans région 3’non-codante H77 dans la lignée Huh7

Les ARNm, bicistroniques ou monocistroniques, transcrits à partir des plasmides transfectés sont représentés schématiquement sur la gauche. Pour les plasmides monocistroniques, un plasmide monocistronique F luciférase est co-transfecté avec le plasmide IRES-R luciférase +/- 3’NC pour la normalisation. Il n’y a aucune différence significative de l’activité IRES (ratio R luciférase / F luciférase) en présence ou non de la région 3’NC, ni sous forme bicistronique, ni sous forme monocistronique.

On peut remarquer que l’IRES initie la traduction de la R luciférase de façon beaucoup plus efficace dans le cadre d’une construction monocistronique : le ratio R/F est égal à $0,11 \pm 0,009$ pour le PIRF et à $0,13 \pm 0,009$ pour le PIRF avec 3’NC (bicistroniques), alors que ce ratio est de 115 ± 29 pour la construction monocistronique IRES-Rluc et de 122 ± 38 pour la construction IRES-Rluc-3’NC. Cela était attendu, car dans le génome du VHC, l’IRES est situé directement en 5’, et la présence de la F luciférase en amont peut gêner le recrutement des ribosomes et des ITAFs par l’IRES. Une étude a montré que la présence de certaines séquences, et en particulier celle de la F luciférase, en amont des IRES du poliovirus et du VEMC, inhibe leur activité (Hennecke et al., 2001). Il faut noter également, que dans le cas

du plasmide monocistronique, l’ARN transcrit présente une coiffe devant l’IRES, et il est donc possible que la traduction coiffe-dépendante participe également à l’expression de la R luciférase. La contribution de cette traduction coiffe-dépendante n’est pas connue. En effet, les séquences ARN IRES, présentant de nombreuses structures secondaires, empêchent le balayage correct de la région 5’NC par les complexes d’initiation de la traduction recrutés par la coiffe.

On peut constater également que les écart-types du ratio R/F sont plus grands quand on utilise des plasmides monocistroniques (l’écart-type représente 25 à 30 % de la mesure, alors que pour les plasmides bicistroniques l’écart-type représente 8 % de la mesure). En effet la normalisation de l’activité R luciférase par la F luciférase issue d’un autre plasmide est moins bonne que lorsque les deux luciférases sont présentes sur le même ARN bicistronique.

On remarque aussi que dans le cas de ce plasmide, la 3’NC est suivie d’une queue polyA, le signal de poly-adénylation présent dans notre plasmide sert en effet à la terminaison de la transcription par l’ARN polymérase II. Il a déjà été rapporté qu’il est crucial d’utiliser une 3’NC avec une fin exacte, l’ajout de nucléotides en aval inhibant l’action de la 3’NC sur la traduction (Song et al., 2006). Cela pourrait donc être une explication à l’absence d’effet observé dans notre modèle. Pour remédier à cela, il a été décidé d’insérer une séquence autocatalytique juste à la fin de la 3’NC pour obtenir une séquence exacte (Figure 28).

4.2. Utilisation de ribozymes

Les ribozymes (terme dérivé de acide ribonucléique et enzyme) sont de petits ARN catalytiques. On classe dans cette famille l’ARN ribosomique de la grande sous-unité du ribosome qui est responsable de son activité amino-transférase, et des ribozymes sont codés par des virus de plantes pour catalyser la maturation de leurs ARNm (Doherty and Doudna, 2000). Le ribozyme utilisé est en « tête de marteau », il se replie sur lui-même et catalyse le clivage de l’ARN juste après la séquence de la 3’NC. Les séquences des ribozymes choisies ont déjà été utilisées dans une étude VHC, servant à obtenir un génome ARN complet avec des extrémités 5’ et 3’NC exactes (Heller et al., 2005).



Figure 28 : Principe de l'insertion d'une séquence ribozyme après la région 3' non-codante H77. Le site de clivage du ribozyme est représenté par une flèche.

4.2.1. Détermination du taux de clivage du ribozyme

Le taux de clivage des ribozymes en tête de marteau est assez variable, et dépend de leur séquence et de l'environnement cellulaire. Heller a rapporté un clivage de 90% du ribozyme qu'il a utilisé, dans des cellules Huh7. Il a tout d'abord été vérifié que nous obtenions un taux de clivage équivalent avec notre construction. Pour cela, les constructions bicistroniques comportant ou non un ribozyme juste après la 3'NC a été transfecté dans des cellules Huh7, le lendemain, l'ARN a été extrait et des qPCR ont été réalisées après rétro-transcription. Deux couples d'amorces ont été choisis de façon à quantifier d'une part l'ARN bicistronique total (clivé ou non), et d'autre part l'ARN qui n'a pas été clivé, afin de pouvoir en déduire la proportion d'ARN qui a bien été clivé. Un couple d'amorce est donc situé sur la R luciférase et l'autre est situé de part et d'autre de la séquence ribozyme autocatalytique (Figure 29). L'ARN de la construction bicistronique avec la 3'NC sans ribozyme a été utilisé en contrôle (pour cet ARN, la quantité d'ARN total est égale à la quantité d'ARN non-clivé).

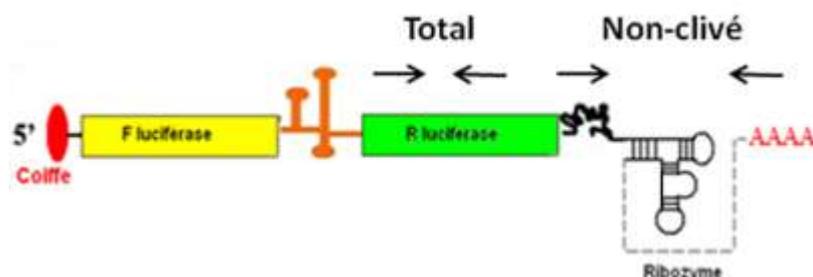


Figure 29 : Position des amorces utilisées pour la quantification des ARN luciférase totaux et clivés au niveau du ribozyme.

Le couple d'amorce permettant l'amplification de l'ARN bicistronique total est positionné sur la séquence codant pour la R luciférase. Les amorces permettant l'amplification des ARN non-clivés uniquement sont positionnées de part et d'autre de la séquence du ribozyme.

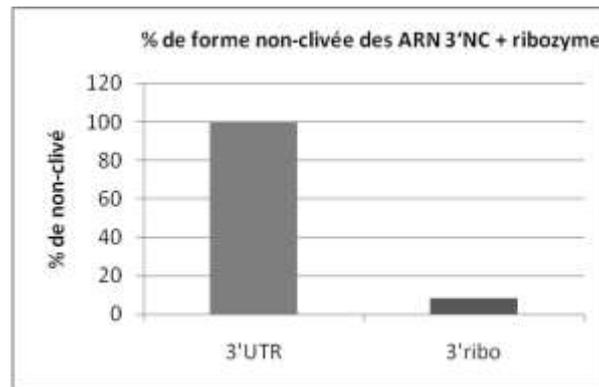


Figure 30 : Calcul du pourcentage de formes ARN non clivées au niveau du ribozyme

Le pourcentage de formes non-clivées est calculé en faisant le ratio de la quantité d’ARN bicistronique non-clivé sur la quantité d’ARN bicistronique total. Le contrôle est le plasmide bicistronique comportant une séquence 3’NC sans ribozyme (100% de forme non-clivée). L’ARN de la construction comportant la 3’NC suivie d’un ribozyme est clivé pour 91 % des ARN (9 % de formes non clivées).

Les quantités relatives d’ARN ont été calculées par la méthode des $\Delta\Delta Ct$. Le $\Delta\Delta Ct$ d’un échantillon correspond à la quantité d’ARN non-clivé (normalisée par l’ARN GAPDH : $\Delta Ct1$) sur la quantité d’ARN total (du transcrit), également normalisée par GAPDH ($\Delta Ct2$).

Le $\Delta\Delta Ct$ de l’ARN de la construction 3’NC-ribozyme était égal à 0,07, et le $\Delta\Delta Ct$ de l’ARN de la construction contrôle (PIRF avec 3’NC) était égal 0,84. Ces valeurs ont été ramenées en pourcentages, en attribuant une valeur de 100 % de non-clivage à la construction contrôle. Le taux de clivage de l’ARN 3’NC-ribozyme était donc de 8,3 %.

Cela qui correspond à au taux de clivage de la construction avec ribozyme de plus de 91%, et est cohérent avec l’étude de Heller (Figure 30). Cela valide l’utilisation de ce ribozyme pour cette étude.

4.2.2. Etude du rôle de la 3’NC dans des constructions avec un ribozyme

L’activité traductionnelle de l’IRES avec la présence de cette 3’NC exacte, a ensuite été mesurée, dans un contexte bi- ou monocistronique.

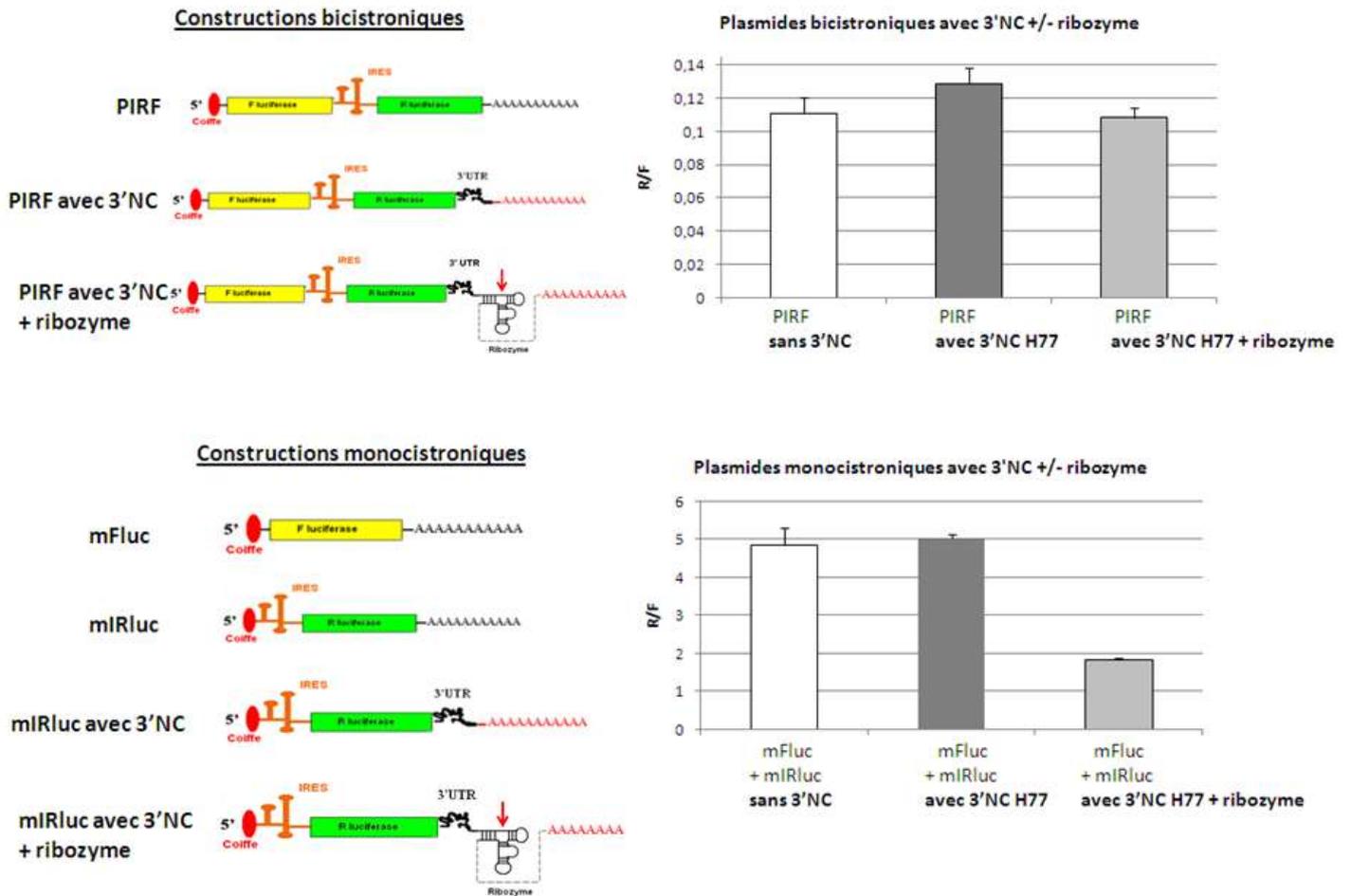


Figure 31 : Transfection de plasmides bicistroniques ou monocistroniques avec 3’non-codante H77 suivie d’un ribozyme dans des cellules Huh7

Les ARN transcrits à partir des plasmides bi ou monocistroniques sont représentés à gauche de la figure. Pour les plasmides monocistroniques, un plasmide monocistronique F luciférase est co-transfecté avec le plasmide IRES-R luciférase +/- 3’NC +/- ribozyme pour la normalisation. Il n’y a aucune différence significative de l’activité IRES (ratio R luciférase / F luciférase) en présence ou non du ribozyme après la 3’NC avec un système d’étude bicistronique. Sous forme bicistronique, la présence de la région 3’NC suivie d’un ribozyme entraîne une diminution de l’activité traductionnelle de l’IRES, par rapport au plasmide sans 3’NC ou avec une 3’NC suivie d’une queue polyA.

Avec un plasmide bicistronique aucun effet de la 3’NC n’est mis en évidence, même avec une 3’NC se terminant de façon exacte : les ratios R/F sont de 0,11 ± 0,009 pour le PIRF, 0,13 ± 0,009 pour le PIRF avec 3’NC et queue polyA, et 0,10 ± 0,006 pour le PIRF

avec la séquence 3'NC suivie d'un ribozyme. Dans la forme monocistronique, on observe un effet négatif de la séquence 3'NC + ribozyme sur la traduction (Figure 31) : le ratio R/F de la construction IRES-Rluc est de $4,8 \pm 0,4$, pour IRES-Rluc-3'NC il est de $5 \pm 0,09$, et pour la construction IRES-Rluc-3'NC-ribozyme, ce ratio est de $1,8 \pm 0,05$. La présence du ribozyme après la séquence de la région 3'NC entraîne donc une diminution de l'activité traductionnelle de l'IRES d'un facteur 2, mais qui n'est pas statistiquement significative ($p = 0,1$ test de Mann-Whitney). Les raisons possibles de ce phénomène seront évoquées dans la partie discussion.

4.2.3. Introduction d'un ribozyme avant l'IRES

Une séquence ribozyme a également été insérée juste avant l'IRES, afin de pouvoir étudier l'IRES dans un plasmide monocistronique sans coiffe en 5', pour recréer des conditions identiques à celles de l'ARN viral. De plus, l'introduction de ce ribozyme dans un plasmide bicistronique permettrait d'obtenir deux ARN monocistroniques à partir du même ARN bicistronique, ce qui nous replacerait dans des conditions optimales pour la normalisation.

Le taux de clivage de ce ribozyme a tout d'abord été défini, de la même façon que pour le ribozyme placé après la 3'NC. Les résultats de la qPCR montrent que le ribozyme ne se clive pas du tout dans cette construction (Figure 32). Le $\Delta\Delta Ct$ de l'ARN du PIRF était égal à 1,01, et le $\Delta\Delta Ct$ de l'ARN de la construction avec le ribozyme devant l'IRES était égal à 1,05. Ramenés en pourcentages, cela correspond à un taux de clivage de 100 % pour le contrôle et de 104 % pour la construction ribozyme. La construction ribozyme n'est donc pas du tout clivée, le pourcentage supérieur à 100 % est dû aux incertitudes de mesure.

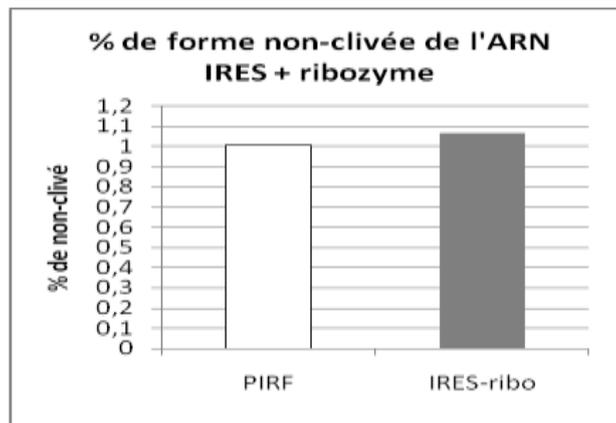


Figure 32 : Calcul du pourcentage de formes ARN non clivées au niveau du ribozyme situé avant l’IRES. Le pourcentage de formes non-clivées est calculé en faisant le ratio de la quantité d’ARN bicistronique non-clivé sur la quantité d’ARN bicistronique total. Le contrôle est le plasmide bicistronique *PIRF* sans séquence ribozyme (100% de forme non-clivée). Il n’y a pas de clivage de la construction ARN comportant un ribozyme devant l’IRES.

La transfection de cette construction sous forme mono- ou bi-cistronique montre une inhibition drastique de la traduction IRES-dépendante (sous forme bicistronique, le ratio R/F passe de $0,11 \pm 0,009$ à $0,009 \pm 0,0001$ quand le ribozyme est présent devant l’IRES. Pour la forme monocistronique, ce ratio est égal à 115 ± 29 pour la construction IRES-Rluc et à $0,097 \pm 0,07$ pour la construction avec un ribozyme. Ces différences sont significatives, $p < 0,05$ pour les deux conditions avec le test de Mann-Whitney). Cela pourrait s’expliquer par une déstabilisation de la structure secondaire de l’IRES par cette séquence, et réciproquement, l’IRES pourrait déstabiliser la structure secondaire du ribozyme, empêchant son clivage. Il est surprenant de voir que l’inhibition de la traduction de la R luciférase se produit également pour la construction monocistronique, ce qui veut dire que la traduction coiffe-dépendante est elle-aussi inhibée. La structure secondaire formée par le ribozyme en association avec celle de l’IRES pourrait inhiber totalement le balayage par le ribosome (Figure 33).

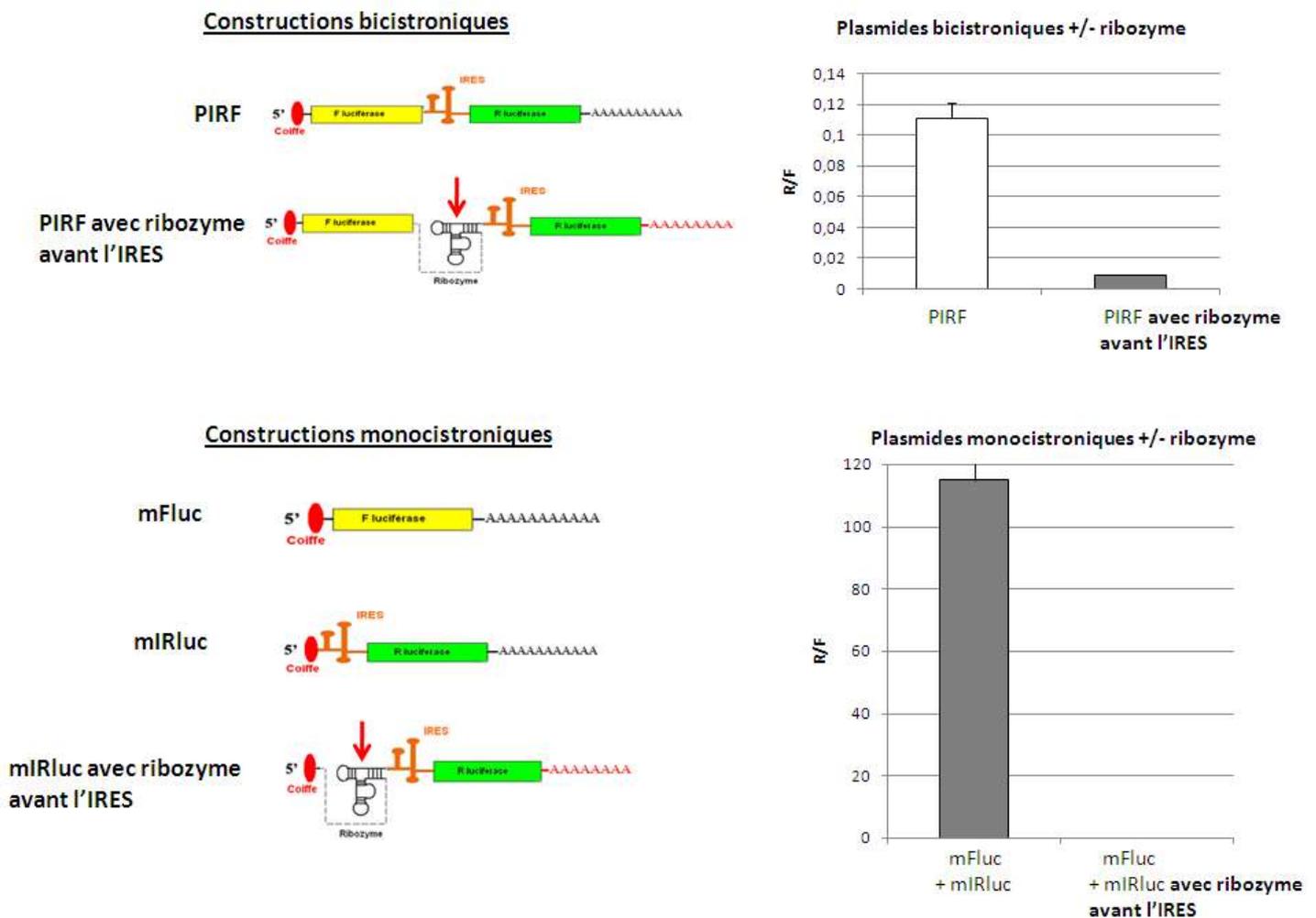


Figure 33 : Transfection de plasmides bicistroniques ou monocistroniques comportant une séquence ribozyme avant l’IRES dans des cellules Huh7

Les ARN transcrits à partir des plasmides bi ou monocistroniques sont représentés à gauche de la figure. Pour les plasmides monocistroniques, un plasmide monocistronique F luciférase est co-transfecté avec le plasmide IRES-R luciférase +/- ribozyme pour la normalisation.

La présence d’une séquence ribozyme devant l’IRES (non clivée) entraîne une inhibition presque totale de l’activité traductionnelle de l’IRES (ratio R luciférase / F luciférase), dans une construction bicistronique, et de façon encore plus marquée dans une construction monocistronique.

Par contre, cette séquence ribozyme étant la même, et située dans le même contexte que celle utilisée avec succès par Heller, les raisons de ces différences ne sont pas claires.

En conclusion, l’utilisation des ribozymes, dont nous ne comprenons pas bien les effets, a été abandonnée et il a été décidé d’étudier les constructions par transfection directe de la forme ARN, qui reste donc à ce jour le meilleur modèle d’étude de l’IRES du VHC.

4.3. Etude du rôle de la région 3’NC dans la traduction avec un modèle ARN

La transcription d’un ARN *in vitro* est la seule façon d’obtenir un ARN non-coiffé en 5’ et avec une région 3’NC exacte. Des ARN ont donc été transcrits à partir d’un produit PCR s’arrêtant au dernier nucléotide de la 3’NC, et grâce au promoteur T7 présent dans le PIRF avant la F luciférase (ou avant l’IRES dans le cas d’un plasmide monocistronique). Le plasmide F luciférase servant à la normalisation a été coiffé grâce à l’ajout d’un analogue nucléosidique de la coiffe dans la réaction de transcription, et une queue poly A de 35 nucléotides a été rajoutée sur l’amorce anti-sens. Par contre, les constructions monocistroniques IRES-R luc +/- 3’NC n’ont pas été coiffées ni polyadénylées.

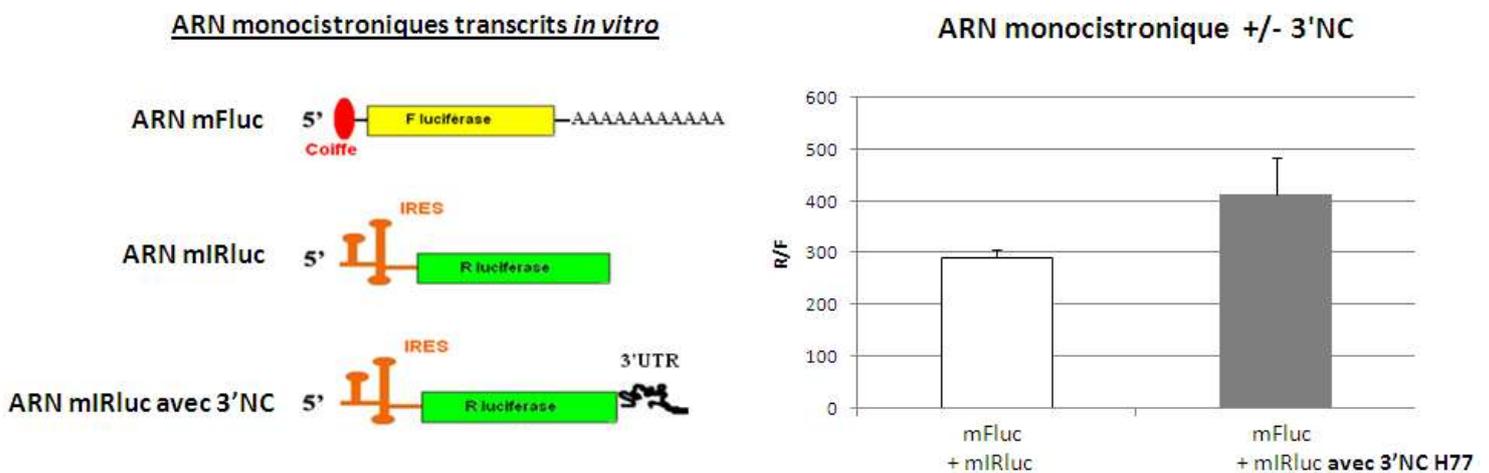


Figure 34 : Transfection d’ARN monocistroniques avec ou sans région 3’non-codante H77, dans des cellules Huh7

Les ARN monocistroniques transcrits *in vitro* sont représentés à gauche de la figure. Un ARN monocistronique F luciférase, coiffé et polyadénylé, est co-transfecté avec l’ARN IRES-R luc +/- 3’NC (non coiffé et non polyadénylé). L’activité traductionnelle de l’IRES (ratio R luciférase / F luciférase) est légèrement augmentée en présence de la région 3’NC.

Sous forme monocistronique ARN, on détecte une légère stimulation de la traduction IRES-dépendante par la région 3’NC, mais qui n’est pas significative (ratio R/F de la construction sans 3’NC : 292 ± 15 , avec 3’NC : 413 ± 70) (Figure 34). Il semble donc que l’utilisation d’une forme monocistronique soit indispensable pour mettre en évidence une action de la 3’NC, les interactions entre la 3’NC et l’IRES sont sans doute perturbées par la présence d’un premier transcrit devant l’IRES. L’utilisation d’un ARN transcrit *in vitro* est également indispensable, car dans la forme ADN, la présence de la coiffe devant l’IRES pourrait aussi gêner cette interaction, en plus du fait que la 3’NC ne soit pas exacte.

On remarque le ratio R/F est très élevé sous forme ARN, cela est dû au fait que seuls environ 80% des transcrits sont coiffés lors de la transcription *in vitro*, la traduction coiffe-dépendante de la F luciférase est donc sous-estimée.

5) Etude de la variabilité de la région 3'NC

L'originalité de notre travail sur la régulation traductionnelle de l'IRES du VHC est d'étudier sa variabilité naturelle. Nous savons que des différences de la séquence de l'IRES entraînent des modifications de fixation des ITAFs et des modifications d'activité traductionnelle.

Il est donc possible que des variations de la séquence de la région 3'NC influencent également l'efficacité traductionnelle du VHC. Nous avons voulu savoir plus particulièrement s'il existe une co-évolution de ces 2 régions, et si un IRES de séquence donnée fonctionne mieux en association avec la 3'NC qui lui correspond.

Sous forme de plasmide bicistronique, on ne voit aucun effet de la 3'NC sur la traduction, et il n'existe pas non plus de différence selon la séquence de la 3'NC utilisée (les ratios R/F sont de 0,11 pour la construction sans 3'NC, 0,12 pour la construction avec la 3'NC H77 et 0,10 avec la 3'NC con1). Par contre, pour les constructions sous forme monocistronique (transfectées sous forme ARN ou ADN), on remarque une diminution de la traduction d'environ deux fois quand la séquence 3'NC de con1 est utilisée (Figure 35) : sous forme ADN monocistronique, le ratio R/F de la construction sans 3'NC est de $4,8 \pm 0,4$, celui de la construction avec la 3'NC H77 de $5 \pm 0,09$, et celui de la construction avec la 3'NC con1 de $2,8 \pm 0,04$. Sous forme d'ARN monocistronique, les valeurs des ratios luciférase sont les suivantes : 292 ± 14 sans la 3'NC, 413 ± 70 avec la 3'NC H77 et 155 ± 4 avec la 3'NC con1. Ces différences ne sont pas significatives à cause du fort écart-type des mesures quand des systèmes monocitroniques. Cette diminution de l'activité de l'IRES est cependant importante et devrait devenir statistiquement significative si l'on augmente de nombre de replicates.

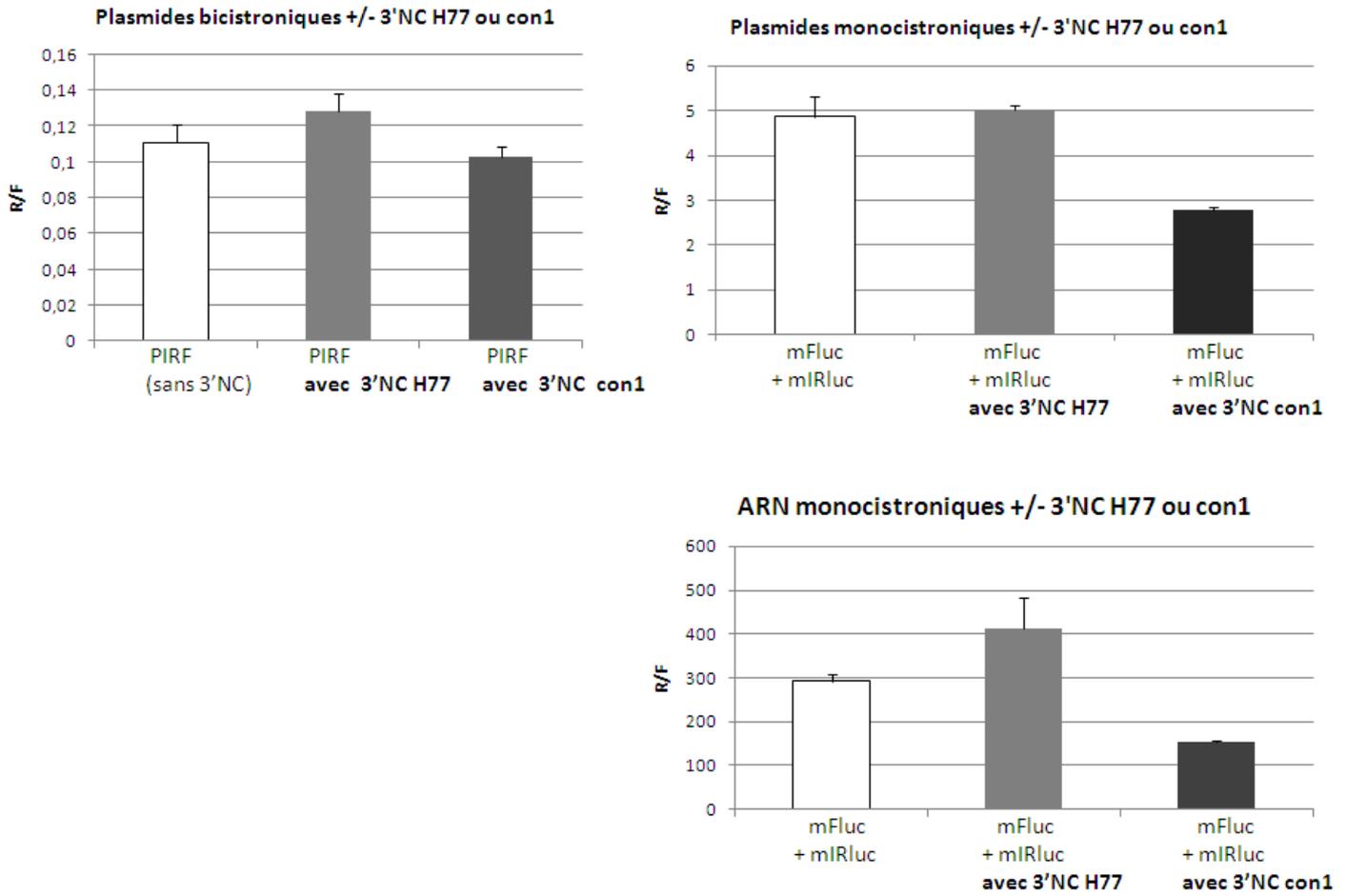


Figure 35 : Transfections de plasmides bicistroniques ou monocistroniques et d’ARN monocistroniques, comportant la région 3’non-codante H77 ou con1 (en association avec la séquence IRES H77).

Avec l’utilisation d’un plasmide bicistronique, il n’y a pas de différence de l’activité IRES en présence d’une région 3’NC, qu’elle provienne de la souche H77 ou de la souche con1. Sous forme monocistronique, ADN ou ARN, la présence de la région 3’NC de con1 associée à l’IRES H77 entraîne une diminution de l’activité traductionnelle de l’IRES, par rapport à la construction sans 3’NC ou avec la région 3’NC de H77.

II. Etude de la régulation traductionnelle des gènes cellulaires lors de l’infection par la souche JFH-1

La traduction du VHC est régulée par des protéines virales, cellulaires, et par « l’état traductionnel » de la cellule, c'est-à-dire la quantité de ribosomes et de facteurs de traduction disponibles, dépendant de la compétition avec la traduction des ARNm cellulaires. Il a été montré que les protéines du VHC interagissent avec de nombreuses protéines cellulaires, et il se pourrait que le virus puisse ainsi favoriser sa traduction et/ou sa réplication en modulant la traduction des protéines cellulaires qui lui sont nécessaires, et modifier l’état traductionnel de la cellule à son avantage. Beaucoup de virus possédant un IRES induisent une extinction de la traduction de l’hôte en clivant les facteurs d’initiation nécessaires à la traduction coiffe-dépendante. Par exemple, la protéase virale 2A des picornavirus clive le facteur d’initiation eIF4G, empêchant ainsi la liaison du complexe ternaire au complexe attaché à la coiffe (Krausslich et al., 1987). Les entérovirus clivent de plus PABP (Kuyumcu-Martinez et al., 2004). Cependant, une extinction de la traduction globale est incompatible avec une survie prolongée de la cellule, et ces virus induisent des infections lytiques.

L’impact de l’infection par le VHC sur la traduction cellulaire n’est pas clair, ce virus possède un IRES et est donc indépendant des facteurs d’initiation coiffe-dépendant, mais sa persistance dans la cellule implique que la traduction cellulaire soit maintenue.

Des études transcriptomiques ont été réalisées pour comprendre les modifications induites par le VHC sur la cellule hôte, mais celles-ci sont incomplètes car elles ne permettent pas de prédire quelle sera la quantité de protéines produites. On s’intéresse de plus en plus aux régulations traductionnelles dans les phénomènes cellulaires, celles-ci se sont révélées être au moins aussi importantes que les régulations intervenant au niveau de la transcription. Des perturbations de la traduction peuvent même avoir un rôle dans la pathogénie de certaines maladies, en particulier le cancer (De Benedetti and Graff, 2004).

Nous avons réalisé une étude de la traduction des gènes cellulaires lors de l’infection par le VHC, ce qui n’a encore jamais été fait. Pour cela, des cellules Huh-7 infectées par la souche JFH1 ont été utilisées, car il s’agit du meilleur modèle d’étude cellulaire existant actuellement. Cette étude a été menée pour comprendre comment le virus régule sa propre traduction lors de l’infection, en modifiant les acteurs cellulaires de la traduction. En effet, le virus dépend entièrement de la machinerie traductionnelle de la cellule pour sa traduction, et il

doit détourner à son avantage les régulations traductionnelles existant dans la cellule pour assurer la traduction de ses protéines.

Cette étude est également importante pour comprendre la pathogénie du virus, celle-ci pouvant être en partie déterminée par des perturbations traductionnelles qui sont encore inconnues.

1) Description de l’étude

1.1. JFH-1

La souche JFH1 (Wakita et al., 2005) est actuellement le variant VHC qui se réplique le mieux dans les cellules en cultures. Cette souche de génotype 2a provient d’un patient atteint d’hépatite fulminante. C’est donc une souche un peu spéciale, notamment au niveau de la persistance (l’infection fulminante est très rare, la plupart des souches VHC entraînent une infection chronique). Les autres systèmes d’étude disponibles sont des constructions artificielles, les réplicons. Après l’acquisition de mutations adaptatives, ils peuvent se répliquer dans les cellules en culture, mais leur cycle viral est incomplet et ne permet pas la production de particules virales.

Pour cette expérience, des cellules Huh7.5.1 ont été étudiées, 72h après leur infection par la souche JFH1 à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 1. On a également étudié des cellules Huh7.5.1 non infectées, cultivées dans les mêmes conditions, et des cellules infectées puis traitées par un antiviral antiprotéase comme contrôles négatifs.

Lors de la récupération des cellules, les surnageants ont été titrés, et les résultats sont les suivants : cellules infectées : entre 1 et 2.10^8 ffu/ml. (ffu : Fluorescent focus assay, unité formant un foyer). Cellules infectées puis traitées par antiviral : 500 à 1500 ffu/mL suivant les flasques (soit une réduction du virus de plus de 5 log, ce qui valide le traitement). La titration était négative pour les cellules non-infectées.

Il est important de noter que lors de l’observation microscopique, il a été remarqué que les cellules infectées n’étaient pas tout à fait à confluence, à l’inverse de leurs homologues non-infectées ou infectées-traitées, et qu’elles commençaient à entrer en apoptose.

1.2. Profils polysomes obtenus

Les cellules en culture ont été traitées avec de la cycloheximide, antibiotique bloquant la traduction, au niveau de l'initiation et de l'élongation de la traduction. Cela permet le blocage des ribosomes sur l'ARNm qu'ils étaient en train de traduire. Les cellules ont été lysées et le cytoplasme récupéré. Le cytoplasme a ensuite été fractionné sur gradient de sucrose par ultracentrifugation.

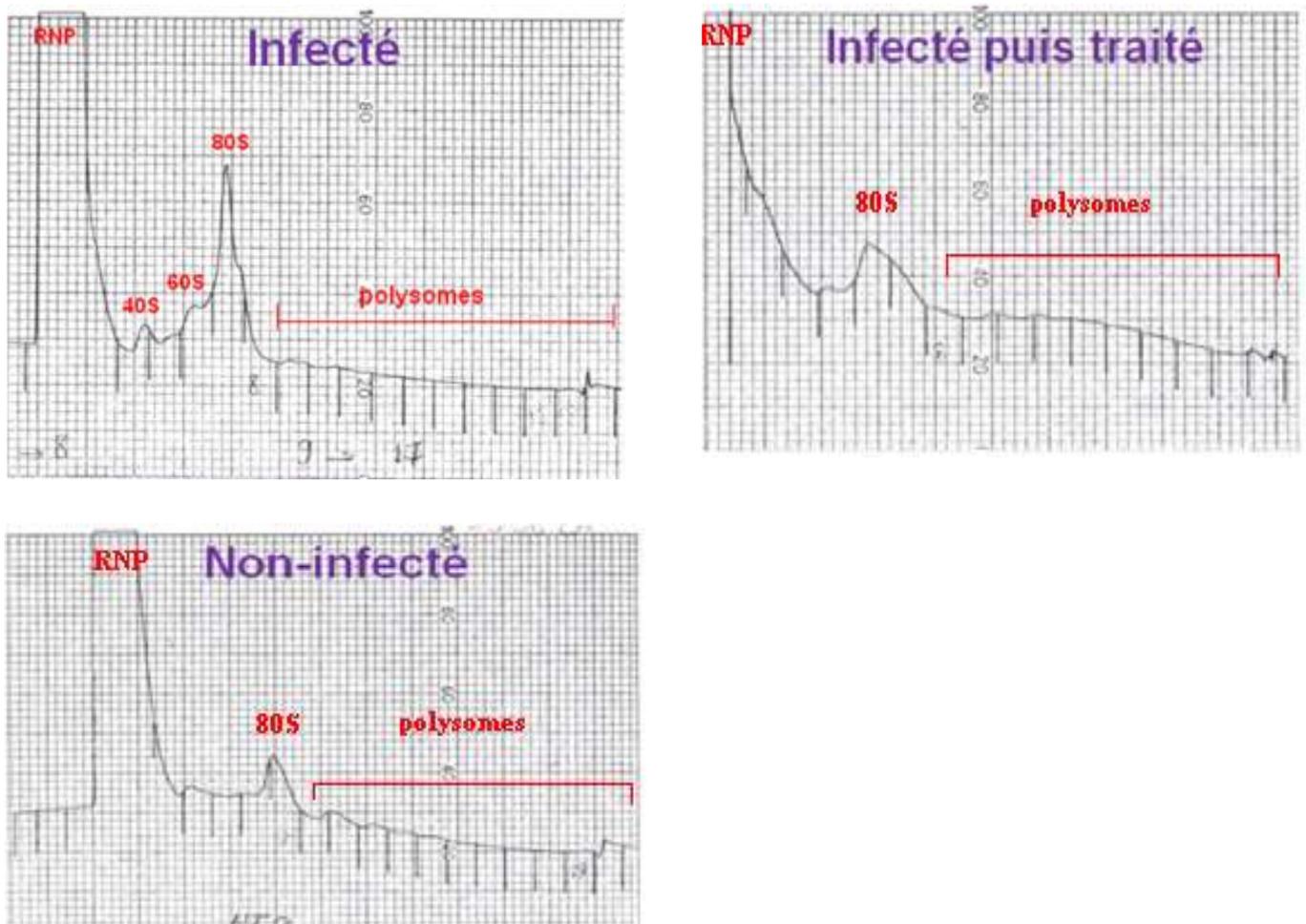


Figure 36 : Tracés de la DO 254 nm obtenus lors de la récupération des différentes fractions polysomiques.

Les pics correspondant aux ribo-nucléoprotéines, aux sous unités ribosomales 40S, 60S, et 80S et aux polysomes (ARN + ribosomes) sont indiqués. Un profil représentatif de chaque catégorie (infecté, non-infecté ou infecté-traité) est présenté. On constate que le profil des cellules infectées est différent de celui des cellules non-infectées ou infectées puis traitées.

Les différentes fractions ont ensuite été collectées (17 fractions dans cette expérience), et la DO (densité optique) à 254 nm, permettant de doser les ARN, a été mesurée en temps réel et un profil a été tracé. On repère sur le profil, au niveau des fractions légères, des pics

correspondant aux ribonucléoprotéines (RNP), puis aux sous-unités ribosomales libres 40S et 60S et au ribosome 80S. Des petits pics dans les fractions lourdes correspondent aux polysomes, avec l’association d’un nombre croissant de ribosomes aux ARNm.

Les profils obtenus sont différents pour les cellules infectées et les cellules non infectées ou infectées traitées (Figure 36), ce qui montre qu’il existe une modification traductionnelle générale dans les cellules infectées.

Le profil des pics correspondant aux différentes sous-unités ribosomales est le profil classique attendu lors d’un fractionnement polysomique. L’attribution des pics a été vérifiée en analysant les différentes fractions d’un échantillon au Bioanalyseur (électrophorèse capillaire), permettant la visualisation des bandes correspondant aux ARN ribosomaux 18S et 28S. Les fractions correspondant au pic 40S ne contiennent que l’ARN ribosomal 18S, les fractions correspondant au pic 60S contiennent majoritairement l’ARN ribosomal 28S, et les fractions du pic 80S comportent les deux bandes.

Les cellules infectées présentent un pic 80S beaucoup plus important que les cellules non-infectées, cela pourrait provenir d’une inhibition de la traduction, provoquant une accumulation des sous-unités ribosomales libres, ou d’un blocage de l’élongation de la traduction, provoquant une accumulation des complexes 80S. On pourrait également penser à une augmentation de l’initiation de la traduction (formation du complexe 80S), sans qu’il y ait une augmentation de l’élongation.

Par contre, le niveau des polysomes ne semble pas plus bas, il n’y a donc *a priori* pas d’inhibition importante de la traduction générale. Une augmentation de la synthèse des ARN ribosomaux dans les cellules infectées a déjà été rapportée (Raychaudhuri et al., 2009), et pourrait expliquer cette modification du profil polysomique, sans que la traduction générale ne soit modifiée.

2) Analyse générale des puces à ADNc

Les fractions correspondant aux ARN libres d’une part et celles correspondant aux ARN ribosomaux d’autre part ont été poolées et l’ARN a été extrait. Une partie du lysat cellulaire non fractionné a également été extraite pour obtenir de l’ARN total.

Les puces ont été réalisées sur 3 échantillons infectés, 3 échantillons infectés-traités et 2 échantillons non-infectés. Pour chaque échantillon, on a étudié les ARN totaux (tot,

correspondant au transcriptome normal), les ARN traduits, liés aux ribosomes, (T) et les ARN non-traduits (NT).

2.1. Normalisation des puces

Il est indispensable de normaliser les puces pour corriger les biais dus à des différences de quantités d’ARN au départ, à la différence d’incorporation des 2 fluorophores, aux différences de scan des lames, etc.

Plusieurs types de normalisation existent, la plus utilisée étant la normalisation de Lowess (Yang et al., 2002). Elle repose sur le principe de la régression linéaire pour ajuster un nuage de point sur la droite de pente 1. Cette méthode effectue en fait une régression linéaire par petites fenêtres glissantes, ce qui permet de redresser les nuages « tordus » (influence du bruit de fond dans les valeurs faibles et saturation dans les valeurs élevées). Cette méthode suppose donc que la plupart des gènes est invariante, ce qui est généralement le cas dans les études transcriptomiques. Dans notre cas, on ne pourra donc pas détecter une variation globale de la traduction, une variation globale n’est pas distinguable d’une variation de quantité d’ARN, d’efficacité de marquage ou de fluorescence. On s’intéressera donc aux gènes régulés de façon spécifique, au-delà d’une variation globale éventuelle. Cette méthode permet une normalisation intra-puce. Dans notre étude, cette normalisation a été effectuée pour chaque échantillon par rapport à un profil médian (correspondant à la médiane des expressions de tous les échantillons, pour chaque gène). Cela permet donc d’avoir également une normalisation inter-puces.

Avec la représentation des données de chaque échantillon sous forme de « box-plot » ou « boîte à moustaches » (les moustaches représentent la valeur la plus basse et la plus haute, la boîte les valeurs du premier et du dernier quartile, et la médiane apparaît sous forme d’une barre), la réduction de la dispersion des données après la normalisation Lowess a été vérifiée (Figure 37).

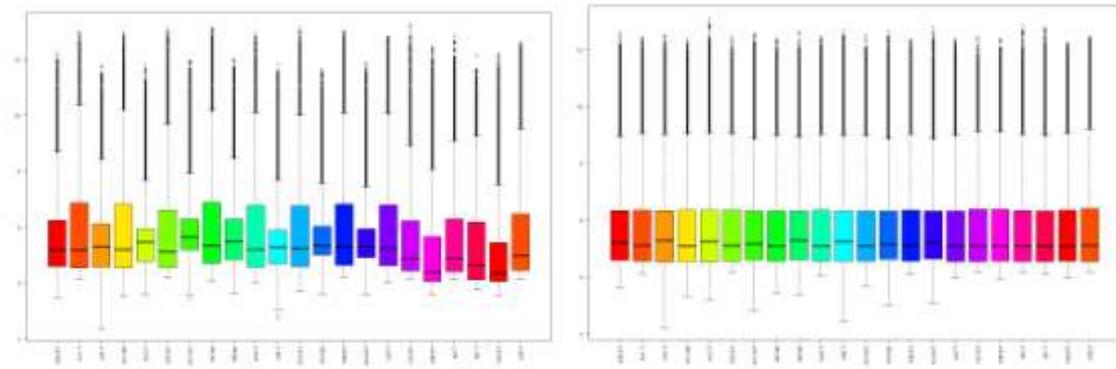


Figure 37 : Statistiques descriptives (Box-plots) des résultats de puces avant et après normalisation (Lowess)

2.2. Clustering général

Le clustering correspond au regroupement des profils d’expression selon leur ressemblance, et un arbre est construit indiquant les distances relatives existant entre chaque échantillon. Les données sont transformées en log (cela donne le même poids aux valeurs positives et négatives, et donne moins de poids aux valeurs extrêmes) et centrées sur la médiane, car seules les différences d’expression relative sont importantes. Les gènes surexprimés apparaissent en rouge, ceux qui sont sous-exprimés en vert et les gènes invariants en noir. Un premier clustering de tous les échantillons bruts a été réalisé (Figure 38), et permet de voir une nette différence de profils d’expression entre les échantillons infectés ou non-infectés et infectés-traités. On voit aussi que les échantillons non-infectés et infectés-traités clusterisent ensemble, ce qui valide le traitement antiviral et montre que l’antiviral ne semble pas avoir beaucoup d’effet sur l’expression des gènes cellulaires.

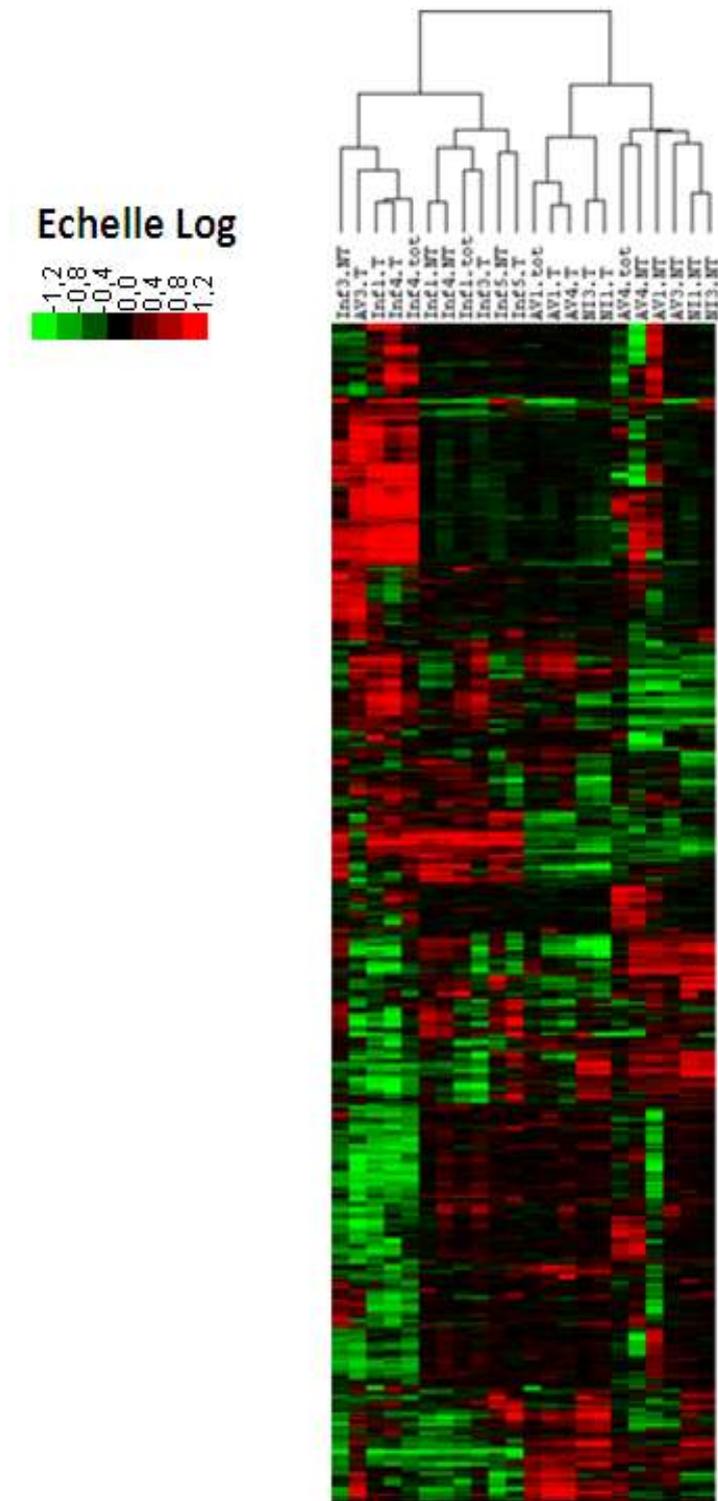


Figure 38 : Clustering des données brutes de puces d’expression

Les gènes sur-exprimés apparaissent en rouge, les gènes sous-exprimés en vert et les gènes invariants en noir. L’arbre représente les distances existant entre les profils d’expression des différents échantillons. *Inf* : échantillon infecté, *NI* : échantillon non-infecté, *AV* : échantillon infecté puis traité par un antiviral. *T* : fraction traduite, *NT* : fraction non-traduite, *tot* : ARN total.

3) Interprétation des puces sous l’angle de la transcription, de la traduction et de l’expression

3.1. Principe des 3 niveaux d’interprétation : transcription, traduction, expression

L’étude du transcriptome total, et des fractions traduites et non-traduites permet d’avoir 3 niveaux d’interprétation des données : le transcriptome total, classique, permet d’étudier les régulations intervenant au niveau de la transcription. La comparaison des fractions traduites permet de voir les différences au niveau de l’expression, résultant des régulations de la transcription et de la traduction. Enfin, l’étude du ratio ARN traduits/ARN non-traduits révèle les différences intervenant au niveau du taux de la traduction de l’ARNm.

Il faut bien distinguer ces trois niveaux, et comprendre que la quantité d’ARN présente dans la fraction traduite ne permet pas de tirer de conclusion sur des changements de traduction. En effet, l’augmentation de la quantité d’un gène donné dans la fraction traduite peut simplement résulter, par exemple, d’une augmentation de sa transcription, alors que son taux de traduction peut être inchangé ou même légèrement diminué. C’est pourquoi j’ai appelé ce niveau d’interprétation « expression », car ce terme permet de bien comprendre qu’il ne s’agit là ni de la transcription ni de la traduction mais de la résultante des deux.

3.2. Nombre de gènes régulés pour chaque niveau d’interprétation

Les cellules infectées (Inf) ont été comparées aux cellules infectées-traitées (AV, pour antiviral), ces dernières subissant également l’attachement et l’entrée du virus, mais la réplication étant ensuite négligeable (5 logs de moins). Cette comparaison permet de mettre en évidence les seuls effets de la réplication (et de la production des particules virales). Mais dans ce contrôle, l’antiviral (antiprotéase) en lui-même pourrait avoir des effets sur la cellule. On a donc également comme contrôles les mêmes cellules, cultivées de la même façon, mais sans infection (NI).

Pour chaque niveau d’analyse, la liste des gènes différentiellement exprimés (test de Student avec taux d’erreur de 1%) a été déterminée en comparant les conditions infecté et infecté-traité d’une part, et infecté et non-infectés d’autre part. Les gènes communs à ces deux tests ont ensuite été gardés pour l’analyse (on évite ainsi les biais dus à l’antiviral d’une part et à l’entrée du virus d’autre part).

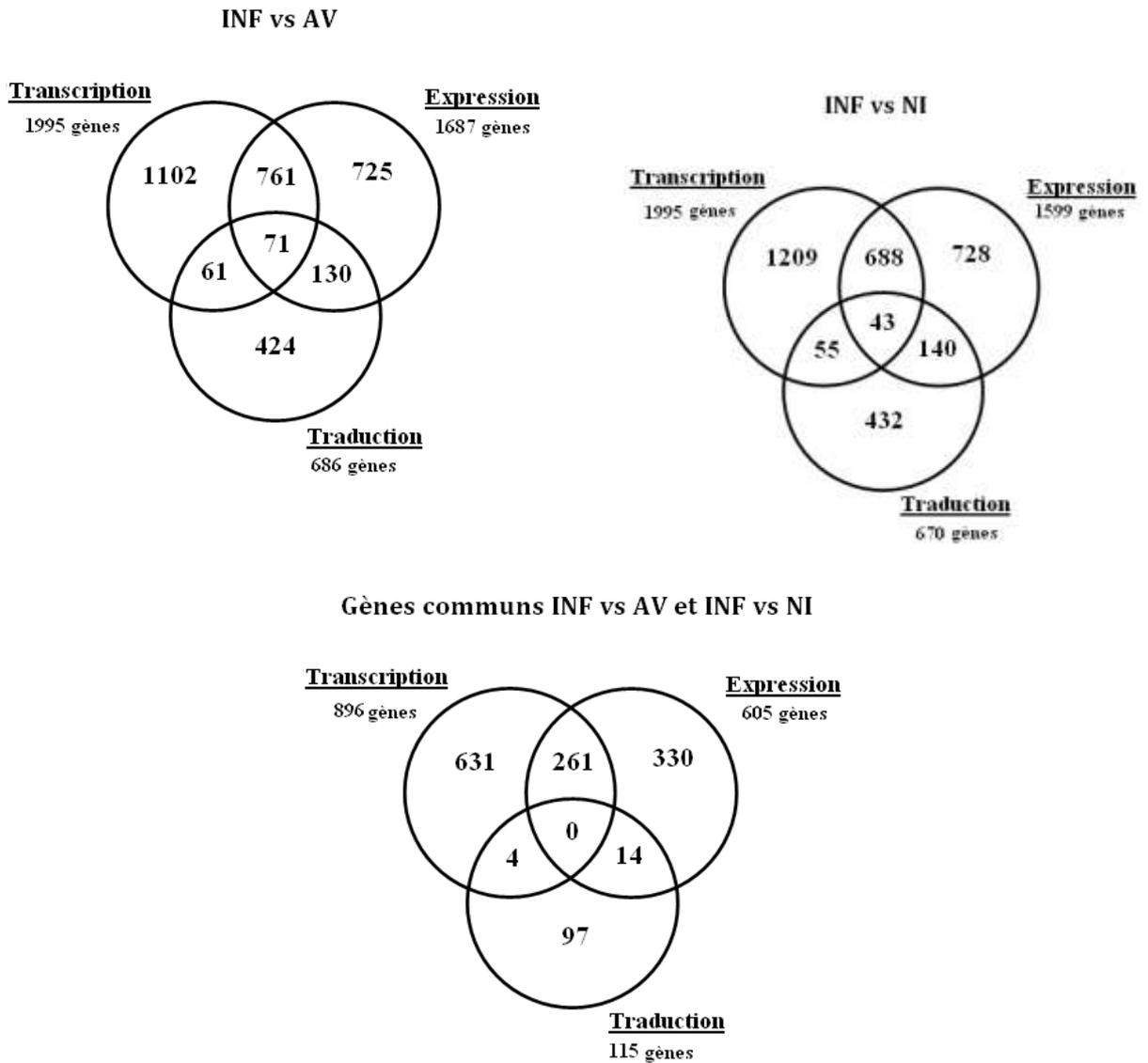


Figure 39 : Diagrammes de Venn représentant le nombre de gènes statistiquement régulés lors de l’infection, pour chaque niveau d’interprétation, transcription, traduction ou expression.

Au niveau de la transcription (comparaison des fractions totales, non fractionnées), 896 gènes sont différentiellement exprimés, 314 sont sous-transcrits et 582 sur-transcrits. Au niveau de l’expression, l’analyse a retenu 605 gènes, 215 sous-traduits et 390 sur-traduits. Au niveau de la traduction (ratio), 115 gènes sont régulés de façon significative lors de l’infection, 52 sont sous-traduits et 63 sur-traduits (Figure 39).

On remarque que 30 à 40% des gènes subissant des changements au niveau de la transcription sont également différentiellement exprimés dans la fraction traduite

(expression). Quand les gènes sont présents dans les deux listes, les changements vont dans le même sens. Il n’y a donc pas de régulation traductionnelle allant en sens inverse de la régulation transcriptionnelle (ou alors elle n’est pas significative statistiquement).

4) Analyse de la transcription

Nous avons réalisé le clustering des gènes différentiellement transcrits (transcriptome classique) dans les cellules infectées par rapport aux cellules non-infectées ou infectées-traitées (Figure 40). On peut définir des « clusters de gènes », présentant le même profil d’expression entre tous les échantillons et ceux-ci appartiennent en général aux mêmes catégories fonctionnelles (Eisen et al., 1998).

Les catégories fonctionnelles significativement sur- ou sous-transcrites ont été déterminées grâce au logiciel GoMiner.

Parmi les gènes **sur-transcrits**, les catégories fonctionnelles majeures sont l’**apoptose** (59 gènes, p value = $2,5 \cdot 10^7$), la **transcription** (87 gènes, p value 0,01), la régulation de la voie **NF-κB** (64 gènes, p-value 0,001), ainsi que l’**immunité** (34 gènes, p value 0,0008) et la **réponse au stress** (62 gènes, p-value 0,0003).

Les catégories fonctionnelles sur-représentées parmi les gènes **sous-transcrits** sont le **métabolisme oxydatif mitochondrial** (18 gènes, p value 0,03), le **métabolisme lipidique** (24 gènes, p value 0,005) et le **cycle cellulaire** (26 gènes, p value 0,03).

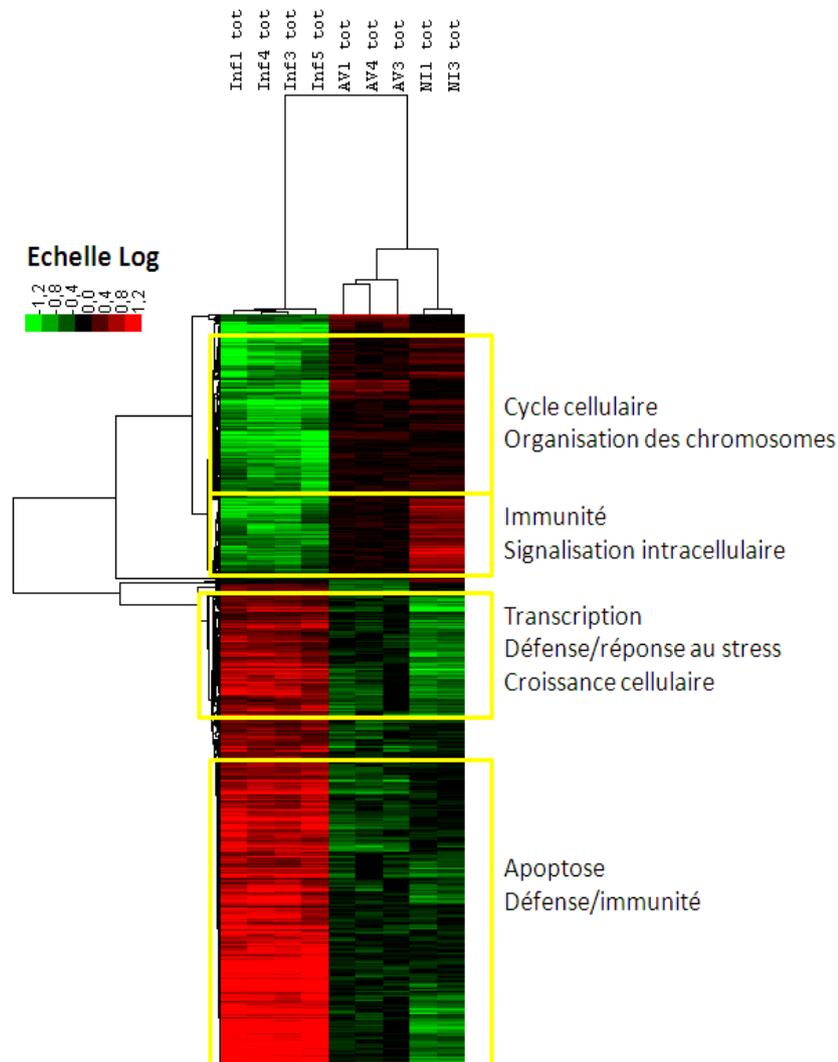


Figure 40 : Clustering des gènes significativement régulés au niveau de l’ARN total (transcriptome), avec les principales catégories fonctionnelles représentées dans chaque cluster de gènes. Les clusters de gènes sont définis comme des groupes de gènes ayant les mêmes régulations dans les différents échantillons. Les arbres représentent les distances existant entre les profils des différents échantillons d’une part, et des gènes d’autre part.

5) Analyse des fractions polysomiques (ARN traduits)

L’analyse des fraction polysomique permet d’étudier « l’expression » des ARNm, résultante de la transcription et de la traduction. Mais ce terme est inexact dans l’absolu car ne tient pas compte des modifications et régulations post-traductionnelles.

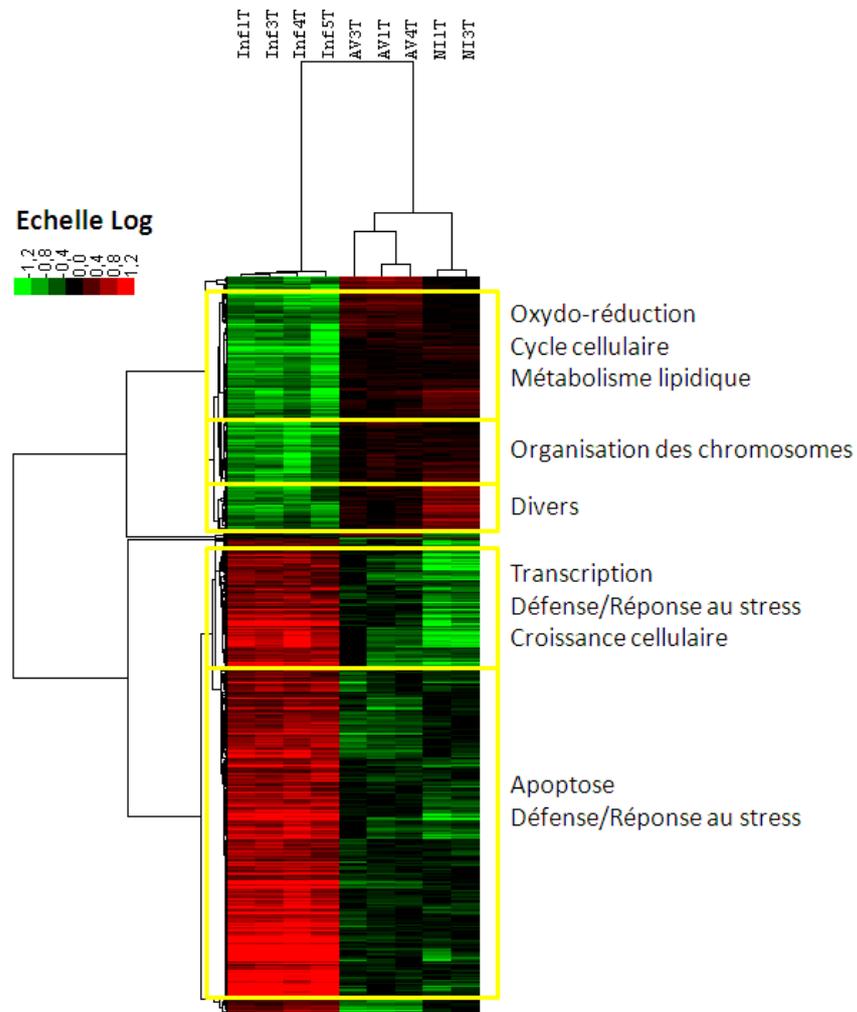
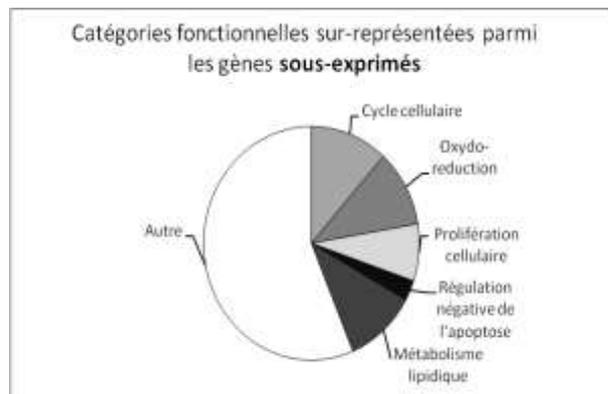
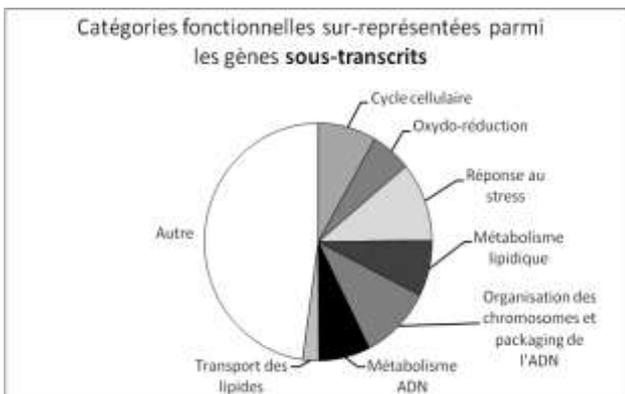


Figure 41 : Clustering des gènes significativement régulés au niveau de l’ARN polysomique (expression), avec les principales catégories fonctionnelles représentées dans chaque cluster.

Il est intéressant de comparer les catégories fonctionnelles régulées au niveau de la transcription avec celles régulées au niveau de l’expression (Figures 41 et 42).



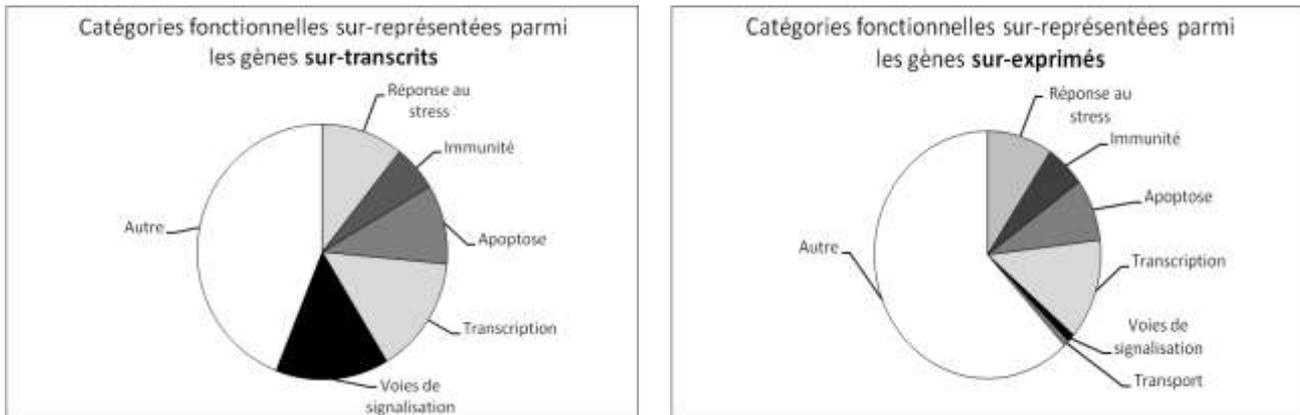


Figure 42 : Représentation des principales catégories fonctionnelles significativement régulées au niveau de la transcription et de l'expression. La taille des secteurs correspond à la proportion de gènes régulés appartenant à une catégorie donnée.

On remarque certaines catégories régulées au niveau de la transcription comme l'apoptose, le cycle cellulaire, le métabolisme lipidique, la réponse au stress se retrouvent également différenciellement exprimées. Cependant, le nombre de gènes régulés au sein de ces catégories varie entre ces deux niveaux, et certaines catégories régulées au niveau de la transcription comme le transport lipidique ou le métabolisme de l'ADN ne sont plus significativement régulées au niveau de l'expression. Tout cela indique qu'il existe des régulations post-transcriptionnelles, le transcriptome ne reflétant pas tout à fait le « traductome ».

6) Analyse du ratio traductionnel

C'est ce niveau de régulation qui nous intéresse tout particulièrement. En étudiant le ratio de la quantité d'ARN dans la fraction traduite sur celle présente dans la fraction non-traduite, nous avons une idée du niveau de traduction du gène, en s'affranchissant de la quantité d'ARN présente. Nous pouvons donc mettre en évidence les gènes qui sont régulés au niveau de la traduction, que cette régulation ait ou non une répercussion sur l'expression finale du gène (Figure 43).

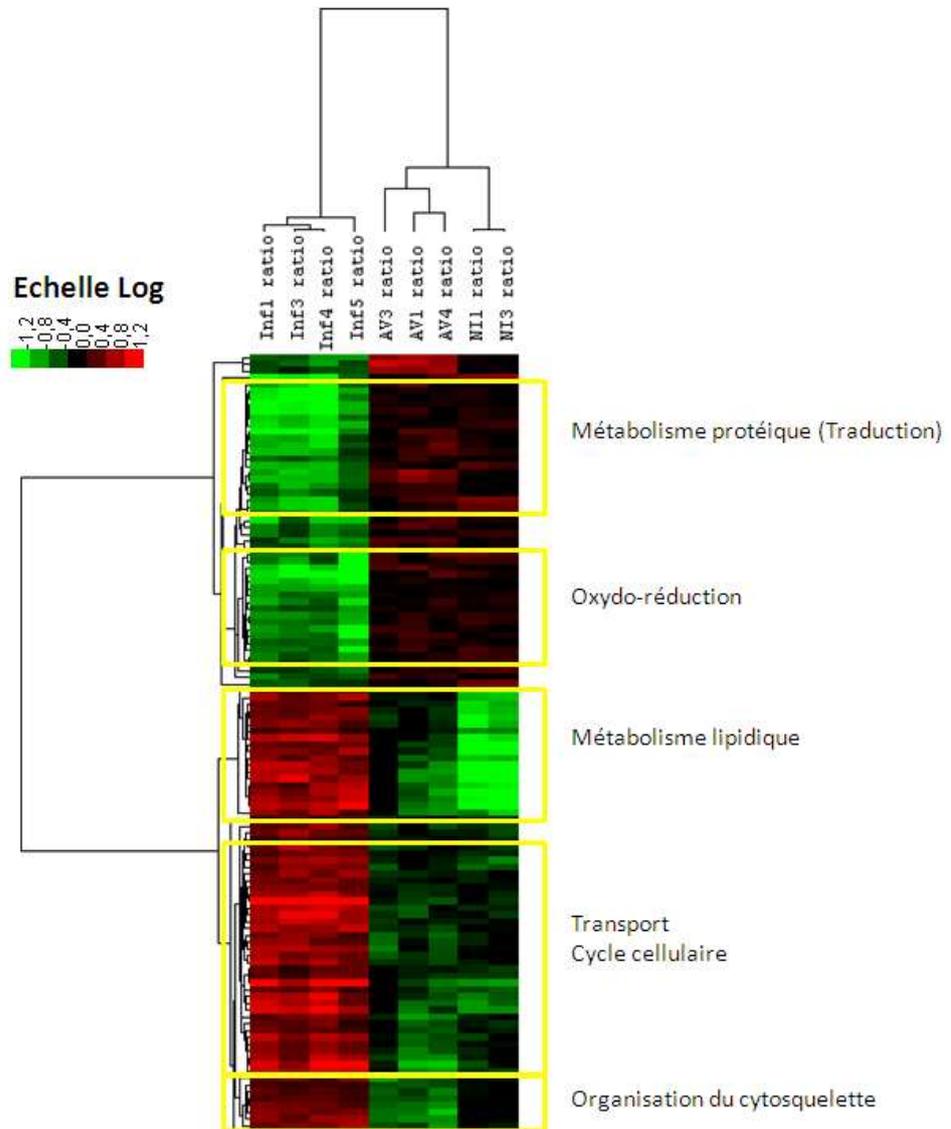


Figure 43 : Clustering des gènes significativement régulés au niveau du taux de traduction (ratio T/NT), avec les principales catégories fonctionnelles représentées dans chaque cluster

6.1. Catégories fonctionnelles régulées au niveau de la traduction

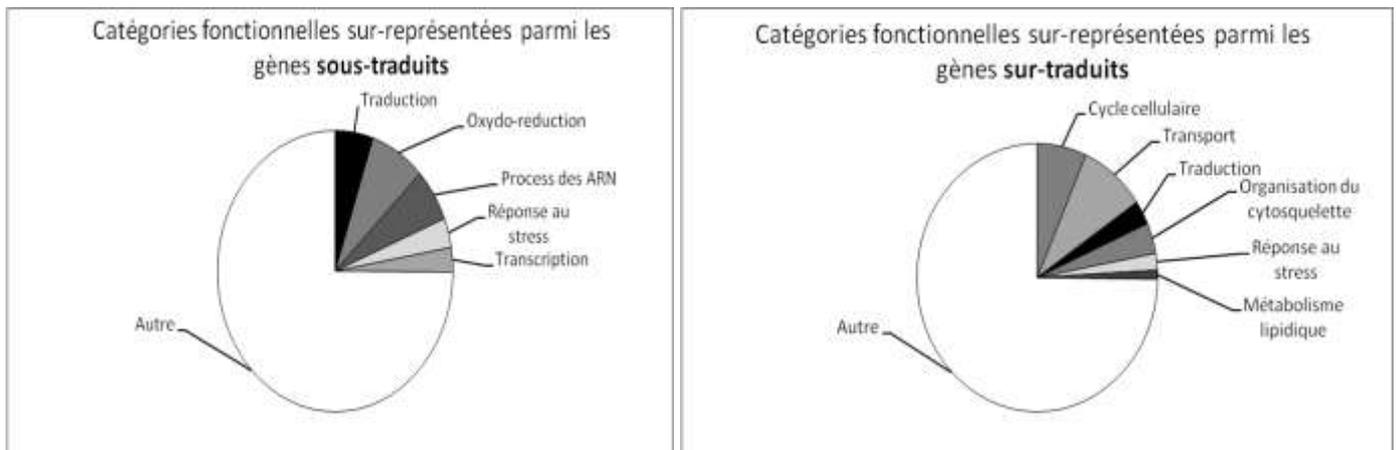


Figure 44 : Représentation des principales catégories fonctionnelles significativement régulées au niveau de la traduction (ratio T/NT). La taille des secteurs correspond à la proportion de gènes régulés appartenant à une catégorie donnée.

Certains gènes régulés au niveau de la traduction (Figure 44) appartiennent à des catégories fonctionnelles qui étaient également régulées au niveau de la transcription : l’oxydo-réduction, la transcription, la réponse au stress entre autres. Pour les gènes participant à l’oxydo-réduction mitochondriale, les régulations de la traduction et de la transcription vont dans le même sens, concourant à une diminution importante de ces gènes dans la fraction ribosomale, traduite. Par contre, pour les catégories du cycle cellulaire et du métabolisme lipidique, les régulations transcriptionnelles et traductionnelles vont en sens inverse, indiquant que les régulations traductionnelles pourraient avoir un rôle de modulation des phénomènes transcriptionnels trop intenses.

Les catégories fonctionnelles qui sont régulées uniquement au niveau de la traduction sont l’organisation du cytosquelette et la traduction.

La régulation traductionnelle de la traduction est très intéressante dans notre optique. Elle intervient de façon positive pour certains facteurs d’initiation de la traduction (eIF4E2, EIF4B, EIF4A2, PPP1R15A).

Les gènes de la traduction négativement régulés sont ceux codant pour les protéines ribosomales mitochondriales.

6.2. Recherche de motifs communs aux gènes régulés pour leur traduction

6.2.1. Motifs IRES ou 5’TOP

Nous avons cherché à comprendre pourquoi certains gènes pouvaient être régulés spécifiquement au niveau de leur traduction, en dehors d’une régulation traductionnelle générale.

Dans l’hypothèse d’une baisse globale de la traduction cellulaire, on pourrait s’attendre à un maintien ou à une augmentation de la traduction des gènes IRES-dépendants. Nous avons cherché si les gènes cellulaires dont on sait qu’ils comportent un IRES avaient une traduction modifiée (liste obtenue à partir des sites internet <http://www.rangueil.inserm.fr/IRESdatabase/> et <http://iresite.org/>). Des IRES ont été identifiés chez 59 gènes cellulaires (mais en réalité, on estime que près de 3% des ARNm cellulaires pourraient posséder un IRES). Parmi ces 59 gènes, seuls 4 sont sur-traduits dans notre étude (Annexe II). La traduction IRES-dépendante cellulaire ne semble donc pas modifiée lors de l’infection virale.

On a vu qu’il existe une régulation de la traduction de certains facteurs de la traduction dans notre étude. Ils sont connus, de même que les protéines ribosomales, pour être régulés au niveau de la traduction grâce à un motif poly-uridine situé dans la région 5’NC de leur ARNm (5’TOP) (Hamilton et al., 2006). Pourtant, certains facteurs d’initiation de la traduction sont sur-traduits, mais ce n’est pas le cas pour tous, ni pour les protéines ribosomales. Il est donc probable que la régulation de ces gènes ne passe pas par la régulation plus générale dépendant des motifs 5’TOP.

Par ailleurs, la sous-traduction des protéines ribosomales mitochondriales semble indiquer que la régulation traductionnelle de ces protéines passe par un mécanisme différent de celui des protéines ribosomales cytoplasmiques.

6.2.2. Analyse des longueurs des régions 5’NC et 3’NC des gènes régulés

Nous avons par ailleurs analysé les tailles des régions 5’NC, 3’NC et la taille totale de l’ARNm au sein des divers catégories. Pour les gènes sur- ou sous-transcrits, il n’y a aucune relation entre la taille de ces différentes régions et le niveau de la traduction.

Au niveau du profil ribosomal (expression), les gènes sur-exprimés dans les cellules infectées ont des longueurs d’ARN, de 5’ et de 3’ significativement plus longues que les gènes sous-traduits. Il est assez attendu que les ARNm que l’on retrouve le plus associés aux polysomes soient plus longs en moyenne que ceux qui sont sous-représentés dans cette fraction. En effet, ils ont statistiquement plus de chances d’être associés à au moins un ribosome au moment du traitement des cellules par la cycloheximide. Par contre, il est étrange de constater que l’infection semble favoriser la traduction d’ARNm plus longs. De plus, les longueurs des 5’NC, 3’NC et la taille totale de l’ARN ne sont pas corrélées, et le fait que l’infection favorise la traduction de gènes ayant également des régions non codantes longues pourrait indiquer une régulation traductionnelle particulière, les séquences régulatrices se trouvant en effet dans ces régions.

6.2.3. Analyse des cibles potentielles des microARN

Les microARN cellulaires pourraient être responsables de la régulation post-transcriptionnelle d’environ 50% des ARNm cellulaires. Il est donc probable que les régulations observées lors de l’infection par le VHC passent par la régulation de microARN.

Nous avons recherché les cibles potentielles de 677 microARN prédites par miRbase (<http://www.mirbase.org/>). Nous avons comparé la distribution des gènes cibles dans les différentes catégories de gènes régulés à leur distribution attendue (test du Chi deux), et mis en évidence une sur- ou sous-représentation des ARN ciblés par certains microARN parmi les gènes régulés au niveau de la transcription et/ou de la traduction.

Notamment, les miR-997, miR-1234 et miR-369-5p ont leurs ARNs cibles sur-représentés parmi les gènes sous-transcrits et sous-traduits lors de l’infection ($p < 0,001$ par le test du Chi²). On peut donc penser que ces microARN pourraient être sur-transcrits lors de l’infection et être responsables de la dégradation de ces ARNm cibles (se traduisant pas une « sous-transcription », en fait une baisse de la quantité d’ARNm), ainsi qu’une baisse de la traduction de ces ARNm.

D’autre part, les miR-1233, miR-1225-3p, miR-1227, miR-331-5p, miR-636, miR-885-3p, miR-1825, miR-329, miR-450b-3p, miR-486-5p, miR-504, miR-621 ont leurs cibles prédites sous-représentées dans les gènes sous-traduits, sur-représentées dans les gènes sur-traduits et sur-représentés parmi les gènes sous-transcrits. Ces microARN semblent donc

réguler la traduction de façon positive, et d'autre part avoir une activité de dégradation des l'ARNm cibles.

Il semble donc très probable que des microARN interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle, aussi bien négative que positive. Les microARN peuvent intervenir de plusieurs façons, en inhibant ou stimulant la traduction, ou en entraînant la destruction ou la séquestration des ARN, c'est pourquoi leur action peut être visible à la fois sur le transcriptome total et sur le traductome.

Nous sommes actuellement en train de réaliser des expériences de puces à microARN sur ces échantillons, pour valider ou infirmer ces prédictions.

7) Etude de quelques protéines cellulaires

7.1. Etude des facteurs d'initiation de la traduction

Des Western blots ont été réalisés sur les protéines extraites de cellules infectées, non-infectées et infectées-traitées ayant servi pour les analyses de puces à ADN.

Deux facteurs d'initiation de la traduction importants ont été étudiés, eIF4E et eIF2 α , car ils sont susceptibles d'être régulés lors d'une infection virale.

La phosphorylation de eIF2 α est un mécanisme de défense de la cellule en réponse à une infection virale ou à un stress et provoque une diminution de la traduction, cellulaire et virale. Il a été rapporté que le VHC peut inhiber la protéine kinase PKR, induite par l'interféron, puis activée par l'ARN viral, et qui phosphoryle eIF2 α .

EIF4E est un facteur d'initiation qui se fixe à la coiffe 5' des ARN messagers, il est donc indispensable pour la traduction des ARNm cellulaires, mais pas pour celle des gènes traduits grâce à un IRES, comme le VHC. Il est plus actif sous sa forme phosphorylée.

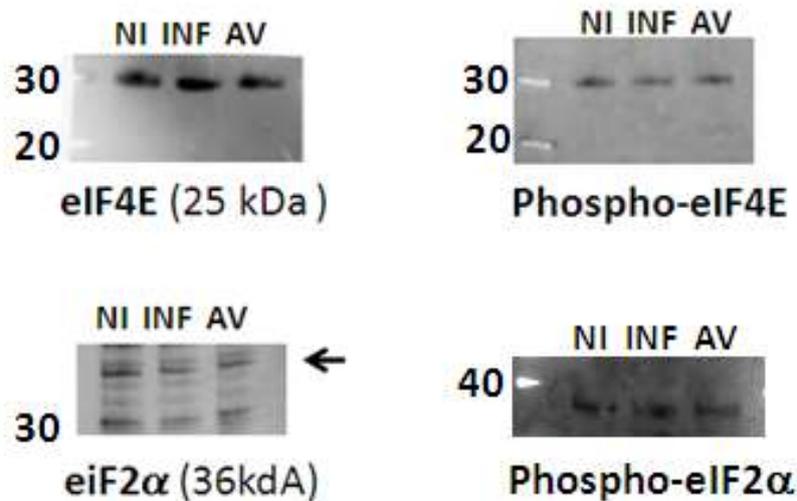


Figure 45 : Détection par Western Blots des formes totales et phosphorylées des facteurs d'initiation de la traduction eIF2 α et eIF4E, à partir de protéines totales extraites de cellules Huh7 infectées par JFH1 (INF), non-infectées (NI) et infectées puis traitées (AV). Les tailles sont indiquées en kDa.

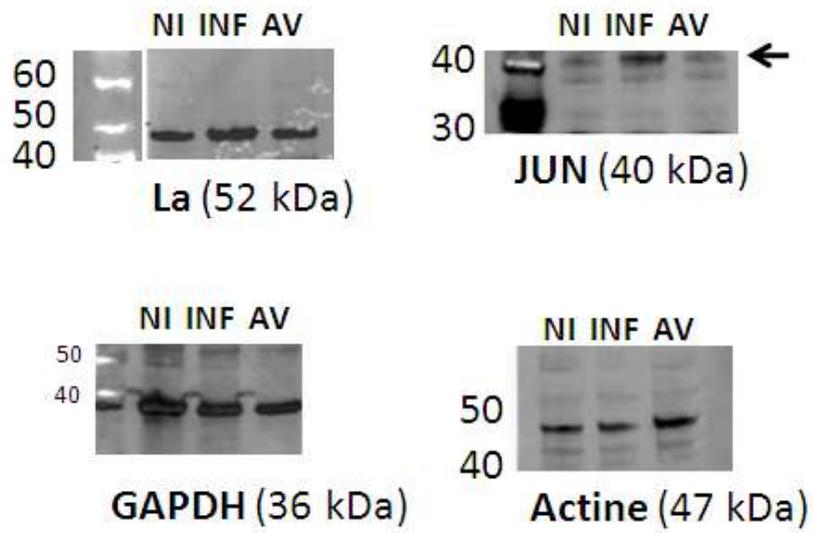
Ces deux facteurs de transcription ne présentaient pas de modification de leur expression dans notre étude sur puce. Les Western Blots confirment qu'il n'y a pas de modification de la quantité de eIF2 α et eIF4E lors de l'infection (Figure 45).

Nous n'avons pas observé non plus de modification de leur niveau de phosphorylation dans les cellules infectées (INF) par rapport aux cellules non-infectées (NI) ou infectées-traitées (AV).

7.2. Etude de quelques protéines d'intérêt

Des Westerns Blots ont également été réalisés sur quelques protéines cellulaires. Nous avons en premier lieu étudié la protéine JUN, dont l'ARNm est à la fois sur-transcrit et sur-traduit dans notre étude de puce à ADN. Le Western blot confirme bien la surexpression de cette protéine dans les cellules infectées et valide notre approche (Figure 46).

Nous avons également étudié la protéine La, qui est un ITAF majeur de l'IRES du VHC. On aurait donc pu s'attendre à une modification, transcriptionnelle et/ou traductionnelle de cette protéine, mais cela n'a pas été mis en évidence dans notre étude de puce, et confirmé sur les Western blots. Nous avons également mis en évidence pour contrôle les protéines GAPDH et actine qui n'étaient pas modifiées dans l'étude.



Discussion et perspectives

I. Régulation traductionnelle de l'IRES du VHC

1) Modèles pour l'étude de l'action de la région 3'NC sur la traduction IRES-dépendante du VHC

Notre équipe s'intéresse à la régulation traductionnelle du virus de l'hépatite C et en particulier aux déterminants de la séquence de l'IRES qui modulent la traduction, en relation avec l'interaction avec des ITAFs. La découverte chez des patients de variants IRES présentant des activités traductionnelles différentes suivant le type cellulaire concerné et suggérant que la traduction puisse être impliquée dans le tropisme cellulaire de ceux-ci nous a conduit à étendre cette étude à d'autres patients. Nous avons pris conscience que, pour l'étude des activités IRES, le choix d'un bon modèle d'étude est crucial. Le modèle bicistronique que nous avons employé nous a paru inadapté à l'étude des interactions de l'IRES avec des facteurs cellulaires (les ITAFs), la présence d'un cistron en amont de l'IRES provoquant une gêne stérique. Ce modèle souffre de plus de la présence d'un promoteur interne dans la séquence ADN de l'IRES du VHC pouvant fausser les résultats.

L'objectif de mon travail a été de déterminer quel modèle est le plus approprié pour l'étude des variants IRES, et d'inclure la région 3'NC, qui joue également un rôle important dans la traduction.

1.1. Plasmides monocistroniques

La première étape a consisté à étudier l'IRES dans un contexte monocistronique, en co-transfection avec un plasmide comportant le 2^{ème} gène rapporteur pour la normalisation. Sous cette forme, l'activité IRES est beaucoup plus élevée, ce qui montre que la présence du gène de la F luciférase avant l'IRES ne permet pas son fonctionnement optimal, comme cela avait été montré (Hennecke et al., 2001). Il faut cependant garder à l'esprit que l'ARN monocistronique transcrit dans la cellule est coiffé en 5'NC, et dispose donc d'un double de système de traduction, dont les contributions respectives à l'expression du gène rapporteur ne sont pas connues.

Pour l'étude du rôle de la région 3'NC du VHC dans la traduction, la séquence de la région 3'NC de la souche H77 a été rajoutée après le gène rapporteur. Dans un contexte bicistronique, la 3'NC n'a aucun effet sur la traduction IRES-dépendante. Cela était attendu, la présence d'un gène en amont de l'IRES gênant probablement les interactions entre celui-ci et la région 3'NC. Pourtant, nous n'avons pas détecté de contribution de la région 3'NC

même dans le cadre d'une construction monocistronique. L'interaction entre les deux extrémités peut dans ce cas être bloquée par la présence de la coiffe devant l'IRES, et par la présence d'une queue polyA après la 3'NC. Il a en effet été rapporté qu'il est crucial que la fin de la 3'NC soit exacte pour qu'elle ait une action sur la traduction, l'ajout de quelques nucléotides à la fin de cette région pouvant inhiber ce phénomène (Song et al., 2006).

Une autre explication possible, et complémentaire, est le fait que la présence d'une queue polyA stimule la traduction IRES-dépendante du VHC (Bradrick et al., 2006; Bung et al., 2010; Lourenco et al., 2008; McCaffrey et al., 2002), de façon aussi efficace que la 3'NC du VHC. La queue polyA présente en 3' de l'ARN aurait donc un effet positif sur la traduction IRES-dépendante, qu'il y ait ou non la 3'NC du VHC et masquant ainsi l'effet de celle-ci.

1.2. Utilisation d'une séquence ribozyme autocatalytique pour obtenir une région 3'NC avec une fin exacte

Nous avons ensuite testé l'introduction d'une séquence ribozyme, autocatalytique, à la fin de la 3'NC dans le but d'éliminer la queue polyA et d'obtenir une région 3'NC avec une fin exacte. Malgré un clivage correct du ribozyme dans 90% des ARN, nous n'avons toujours observé aucune modulation positive de la traduction par la région 3'NC. Dans le cas de la construction bicistronique, l'explication est toujours la même, l'interaction peut être bloquée par la présence de séquences en amont de l'IRES. Dans le cas de la construction monocistronique, l'observation d'une diminution de l'activité IRES pourrait provenir du fait que l'on compare cette construction avec une construction ne possédant pas de 3'NC, mais possédant une queue polyA. Il se pourrait que l'effet de la queue polyA sur la traduction de l'IRES soit plus important que celui de la région 3'NC. Il se pourrait aussi que les ARN dépourvus de queue polyA soient moins bien exportés dans le cytoplasme (où ils sont traduits), la queue polyA n'étant pas indispensable, mais néanmoins très favorable, à l'export nucléaire (Cole and Scarcelli, 2006). La traduction IRES-dépendante de la R luciférase étant normalisée par la traduction de la F luciférase, dont l'ARN possède une queue polyA et est donc normalement dans le cytoplasme, l'efficacité traductionnelle normalisée de la R luciférase se trouve diminuée, parce qu'en fait son ARN est présent en moins grande quantité que celui de la F luciférase dans le cytoplasme.

1.3. Utilisation d'ARN monocistroniques transcrits *in vitro* pour l'étude de l'effet de la région 3'NC sur la traduction IRES-dépendante du VHC

Nous avons également étudié l'influence de la 3'NC du VHC sur l'activité de son IRES en transfectant des ARN monocistroniques transcrits *in vitro*. Dans cette expérience, nous observons une augmentation (d'un facteur 1,3) de la traduction liée à l'IRES en présence de la 3'NC. Cet effet positif est plus faible que ce qui a pu être montré dans d'autres expériences, il semble que le moment de la lecture des activités des luciférases soit important, la stimulation de la traduction IRES par la 3'NC étant maximale entre 6 et 8 heures après la transfection (Song et al., 2006). Cela pourrait être dû à une dégradation plus rapide des ARN comportant la 3'NC du VHC par rapport à une queue polyA. La lecture des résultats peu de temps après la transfection pourrait permettre de limiter cette différence de quantité des ARN monocistroniques causée par des vitesses de dégradation différentes.

Il nous faudra donc vérifier la stabilité des différents ARN possédant des régions 3'NC différentes. Cependant, dans les études antérieures, il n'a pas été noté de différence de stabilité entre les ARN possédant une queue polyA et ceux possédant la région 3'NC du VHC.

Ces résultats montrent que l'utilisation d'ARN monocistroniques transcrits *in vitro* est indispensable pour l'étude du rôle de la région 3'NC du VHC dans sa traduction, comme cela avait été montré dans une autre étude (Song et al., 2006). L'utilisation d'une forme ARN présente en outre l'avantage de ne pas comporter de coiffe en 5' et d'avoir une fin exacte, déterminée par la fin du produit PCR utilisé pour la transcription *in vitro*, ce qui permet l'étude des deux régions non codante du VHC dans leur contexte naturel. De plus, ce système ne comporte pas le biais dû à la présence d'un promoteur interne dans la séquence ADN, artificielle, de l'IRES.

Les études précédentes du rôle de la 3'NC dans la traduction IRES-dépendante du VHC ont donné des résultats contradictoires, sans doute à cause de l'utilisation de modèles d'étude parfois inappropriés. Plusieurs études ne mettent en évidence aucun effet de la région 3'NC sur la traduction, mais elles ont été réalisées avec des constructions ADN, polyadénylées (Imbert et al., 2003), des ARN polyadénylés (Fang and Moyer, 2000) ou avec une normalisation par l'activité de l'IRES du VEMC, qui est lui aussi stimulé par la région 3'NC du VHC (Friebe and Bartenschlager, 2002). Beaucoup d'études réalisées *in vitro*, dans des lysats de réticulocytes de lapin, ne mettent en évidence aucune action de la 3'NC sur la

traduction (Lourenco et al., 2008; McCaffrey et al., 2002), ce qui montre bien que des facteurs cellulaires, non présents dans ces lysats, sont nécessaires pour l'interaction fonctionnelle entre les régions 5' et 3'NC.

Nous avons donc décidé d'effectuer nos futures études de l'activité de l'IRES en utilisant des ARN monocistroniques comportant la 3'NC du VHC, car c'est à notre avis le système le plus proche des conditions réelles, le VHC étant un virus à ARN simple brin positif (évitant la coiffe, queue polyA, promoteur interne).

1.4. Autres modèles d'étude de l'IRES

Il faut quand même évoquer d'autres modèles d'étude de l'IRES du VHC originaux et intéressants. Récemment, le système bicistronique luciférase a pu être exprimé de façon stable dans des lignées cellulaires grâce à l'utilisation d'un vecteur lentiviral (Lourenco et al., 2009). L'utilisation d'un tel système présente l'avantage d'étudier la traduction IRES-dépendante dans des cellules qui n'ont pas subi le stress de la transfection d'un plasmide, qui peut influencer son état traductionnel.

Le système rapporteur luciférase, transfecté sous forme de plasmide, peut être transcrit dans le cytoplasme par le promoteur T7, dans des cellules exprimant la T7 polymérase grâce à un vecteur vaccine. Ce système permet d'éviter la transcription à partir du promoteur interne ayant lieu dans le noyau. Il présente également l'avantage d'obtenir un transcrit non coiffé et non poly-adénylé (Aoki et al., 1998). Dans le même esprit, un transcrit comportant l'IRES du VHC suivi d'un gène rapporteur a pu être obtenu à partir d'un promoteur et d'un terminateur de l'ARN polymérase I, qui produit des transcrits non coiffés et non poly-adénylés à l'inverse de l'ARN polymérase II (Oem et al., 2007).

Il est à signaler également que le système bicistronique luciférase avec l'IRES du VHC a pu être exprimé par des souris transgénique, permettant une étude *in vivo* de l'IRES du VHC (McCaffrey et al., 2002). Il est fonctionnel dans le foie de souris et c'est donc un modèle intéressant pour le test de thérapies ciblant l'IRES du VHC.

2) Etude de l'influence de la variabilité de la séquence 3'NC sur la traduction IRES-dépendante

Le dernier résultat marquant de notre étude concerne l'étude de la variabilité de la région 3'NC. Nous avons à notre disposition deux régions 3'NC, l'une provenant de la souche H77, de génotype 1a, et l'autre de la souche con1, de génotype 1b (présentant 87% d'homologie de séquence entre elles). Nous avons testé les différences d'activité sur la traduction qu'il pourrait exister entre ces deux séquences, en utilisant le même IRES, qui est celui de la souche H77. Alors que la séquence 3'NC H77 augmente légèrement la traduction liée à l'IRES dans le modèle ARN monocistronique, la séquence 3'NC con1 entraîne au contraire une diminution de la traduction de deux fois, visible également sous forme ADN monocistronique, ce qui indique que le mécanisme par lequel cette séquence inhibe l'IRES est un peu différent de celui par lequel la séquence H77 la stimule. Une inhibition de la traduction IRES-dépendante du VHC a déjà été rapportée, avec l'utilisation d'une séquence de génotype 2a (Murakami et al., 2001).

A notre connaissance, l'influence de la variabilité de la séquence 3'NC sur l'activité traductionnelle n'a jamais été étudiée. La variabilité de différents couples de séquences 5' et 3'NC homologues de génotypes différents a déjà été étudiée, mais l'utilisation de couples hétérologue pour étudier uniquement la variabilité de la 3'NC n'a pas été réalisée (Lourenco et al., 2008). Cette étude a mis en évidence des différences d'efficacitées traductionnelles des séquences IRES de différents génotypes, mais surtout des différences de stimulation de la traduction de la 3'NC selon le génotype du couple IRES/3'NC. La stimulation la plus forte de la traduction a été mesurée pour l'IRES et la 3'NC du génotype 2a, suivi du génotype 1b puis 1a. L'intensité du rôle de la région 3'NC dépendait également du type cellulaire, et était inexistant *in vitro*, montrant encore une fois l'intervention de facteurs cellulaires dans la coopération entre les régions 5' et 3'NC.

Nous avons obtenu ce résultat très récemment et il faut encore que nous étudions les différentes combinaisons IRES/3'NC de séquences H77 ou con1, pour déterminer si cet effet inhibiteur de la 3'NC est dû à l'utilisation de deux séquences hétérologues ou si la séquence 3'NC de con1 a un effet inhibiteur même sur l'IRES con1 dans notre modèle.

Il est possible que les régions 5' et 3'NC, qui interagissent ensemble par l'intermédiaire de protéines cellulaires, co-évoluent ensemble et présentent une complémentarité fonctionnelle de leurs séquence.

L'inhibition de la traduction IRES-dépendante par la région 3'NC d'un autre sous-type du VHC est assez surprenante car il a été montré que la région 3'NC peut stimuler la traduction d'IRES de d'autres virus de façon non-spécifique (Bung et al., 2010; Ito et al., 1998). Il doit donc exister une interaction spécifique entre la séquence de l'IRES et celle de la 3'NC conduisant à une inhibition de la traduction. Un autre système hétérologue a déjà été étudié (Ito et al., 1998), avec l'IRES de génotype 1b et une région 3'NC de génotype 1a (l'inverse de ce qui a été fait dans notre étude), montrant une augmentation de la traduction IRES-dépendante par la séquence 3'NC. Cela laisse donc penser que l'action inhibitrice aurait spécifiquement dans cette combinaison IRES 1a et 3'NC 1b. Il faut cependant noter que dans l'étude de Ito, la séquence entière de la capsid était incluse, et cette séquence est connue pour réguler la traduction IRES et pourrait aussi intervenir dans les interactions entre la 5'NC et la 3'NC.

Nous chercherons ensuite à déterminer quels facteurs cellulaires interviennent dans la spécificité de ces interactions (interaction spécifique entre régions 5' et 3'NC de la même souche virale, ou interaction spécifique de la séquence 3'NC con1 avec des facteurs inhibiteurs, ce que nous allons bientôt déterminer). Nous allons effectuer le silencing des protéines La, PTB et IGF2R1 dans des cellules transfectées avec ces différentes constructions sous forme ARN. Ces protéines cellulaires sont connues pour interagir à la fois avec la région 5' et la région 3'NC du VHC (Spangberg et al., 1999; Tsuchihara et al., 1997; Weinlich et al., 2009), et pourraient permettre la coopération de ces deux régions pour l'initiation de la traduction. Les différents couples IRES/3'NC pourraient donc avoir une sensibilité différente au silencing de ces protéines. Nous envisageons aussi de réaliser des expériences d'UV cross-link sur ces deux séquences 3'NC de génotype 1a et 1b pour identifier des différences de fixation de facteurs cellulaires. Il est également envisageable de réaliser des expériences de mutagenèse dirigée pour identifier les séquences précises responsables des interactions positives ou négatives de ces deux régions, pour comprendre quels sont les déterminants viraux, agissant en *cis*, nécessaires à une initiation de la traduction efficace.

L'utilisation d'un système hétérologue va permettre de mettre en évidence les séquences virales et les facteurs cellulaires impliqués dans les interactions fonctionnelles spécifiques intervenant entre les régions 5' et 3'NC. Il est important de prendre en compte la variabilité des séquences du VHC, car les modes de fonctionnement de la traduction du virus sont différents suivant le génotype (Lourenco et al., 2008). Il est très probable que les régions

virales interagissant ensemble co-évoluent ensemble, donnant naissance à des modes de fonctionnement originaux.

II. Régulation traductionnelle des gènes cellulaires lors de l'infection

Nous avons étudié les modifications de régulation de la traduction cellulaire lors de l'infection par le VHC grâce à la technique du polysome. Cette technique nous a permis d'isoler les ARN liés aux ribosomes, activement traduits, des ARN libres. L'étude du ratio de ces deux fractions permet de mettre en évidence les gènes qui sont spécifiquement sur ou sous-traduits lors de l'infection.

Nous avons utilisé comme modèle d'étude des cellules Huh7.5.1 infectées par la souche JFH1, qui est la souche VHC qui se réplique le mieux dans les cellules en culture. De plus, elle est capable d'y établir un cycle viral complet avec la production de particules virales. Nous disposons de deux contrôles, des cellules non-infectées et des cellules infectées, puis traitées avec un antiviral antiprotéase inhibant la réplication du virus. Cela nous permet donc de distinguer les effets qui sont dus au binding et à l'entrée du virus, de ceux engendrés par la réplication virale. Il a en effet été montré avec l'utilisation d'une pseudoparticule virale que le binding du virus sur la cellule provoquent une importante modification du transcriptome, en particulier des gènes du métabolisme lipidique et de la réponse immunitaire innée (Fang et al., 2006). Par ailleurs, l'antiprotéase en lui-même pourrait avoir une action sur la transcription et/ou la traduction cellulaire, c'est pourquoi nous avons aussi comparé les cellules infectées à des cellules non-infectées.

1) Analyse du transcriptome

Nous avons tout d'abord effectué une analyse classique du transcriptome, en comparant les ARN totaux dans les trois conditions expérimentales. Cette étude est complémentaire de l'étude de la traduction, et permet de comparer notre expérience aux transcriptomes qui ont déjà été effectués.

L'analyse a été effectuée au 3^{ème} jour après l'infection : c'est le moment où la réplication virale et le nombre de gènes régulés sont maximaux (Walters et al., 2009), avant que les cellules n'entrent en apoptose.

Plusieurs transcriptomes de cellules infectées par le VHC ont été réalisés, à partir de biopsies de patients (Smith et al., 2003) ou de chimpanzés infectés (Bigger et al., 2004), de modèles de souris (Chang et al., 2008) ou de réplicons dans des cellules en culture

(Ciccaglione et al., 2008). Ces transcriptomes donnent des résultats assez variables, et dépendent beaucoup du modèle et de la souche virale utilisée. Les gènes qui sont le plus souvent retrouvés sur-transcrits sont les gènes induits par la réponse interféron et les gènes du métabolisme lipidique.

Seuls trois transcriptomes ont été très récemment réalisés avec la souche JFH1 (Blackham et al., 2010; Liu et al., 2009c; Walters et al., 2009). Ces trois études sont les seules à mettre en évidence une modification majeure des gènes de l'apoptose et du cycle cellulaire, qui sont les catégories fonctionnelles qui prédominent également dans notre liste de gènes régulés au niveau de la transcription. Cela montre bien que l'effet du VHC sur la cellule hôte dépend beaucoup de la souche virale, et également du modèle d'étude utilisé. Une apoptose des cellules infectées par JFH1 avait par ailleurs été démontré (Deng et al., 2008).

Le modèle d'étude utilisé, l'infection de cellules Huh7.5.1 par JFH1, permet une réplication très intense du virus. Cette situation est différente de ce qui se produit dans les hépatocytes infectés, où la réponse interféron limite la réplication du virus. Un arrêt du cycle cellulaire a cependant été également retrouvé dans le cas de prélèvements hépatiques infectés, et cet évènement était associé à une plus grande progression de la fibrose (Marshall et al., 2005; Sarfraz et al., 2008). Et un taux élevé de réplication virale est associée à la sévérité des lésions hépatiques (Pal et al., 2006a).

Cette perturbation du cycle cellulaire pourrait être due à une action directe des protéines virales. En particulier, la protéine de capsid pourrait être impliquée dans le blocage de la transition de la phase G1 à S, par l'augmentation de l'expression de p21 et la baisse de l'activité de cdk2 (Nguyen et al., 2003), ou par interaction avec la cycline-dépendante kinase-activating kinase (CAK) (Ohkawa et al., 2004). Cependant, nous ne retrouvons pas de modification de la transcription (ni de l'expression) de ces gènes dans notre étude. Une progression vers la phase S retardée a déjà été montrée par la sous-régulation de la cycline A (CCNA2) par NS2 (Yang et al., 2006), ce qui est le cas dans notre étude.

Dans ce modèle JFH1, ni notre étude ni les deux études précédentes ne mettent en évidence de changements transcriptionnels de gènes de la réponse interféron, pourtant prédominants dans les études à partir de prélèvements hépatiques ou de systèmes réplicon. Cela s'explique par le fait que notre étude a été réalisée dans des cellules Huh7.5.1, permissives à la réplication du VHC car leur réponse interféron est défaillante. Il a été montré que ces cellules présentent une inactivation de RIG-1, récepteur de motifs viraux qui déclenche la réponse interféron (Foy et al., 2005).

La modification du métabolisme lipidique, retrouvée dans notre étude, a été montrée dans de nombreuses études, cette modulation semble être une constante quelque soit le modèle d'étude et est à mettre en relation avec le fait que les lipides sont très importants pour le cycle viral du VHC.

2) Analyse des régulations traductionnelles

Certains gènes régulés au niveau de la traduction appartiennent à des catégories fonctionnelles qui étaient également régulées au niveau de la transcription : l'oxydo-réduction, la transcription, la réponse au stress entre autres.

Pour les gènes participant à l'oxydo-réduction mitochondriale, les régulations de la traduction et de la transcription vont dans le même sens, concourant à une diminution importante de ces gènes dans la fraction ribosomale, traduite. Une altération du métabolisme oxydatif mitochondrial avait déjà été rapporté (Korenaga et al., 2005).

Par contre, pour les catégories du cycle cellulaire et du métabolisme lipidique, les régulations transcriptionnelles et traductionnelles vont en sens inverse, indiquant que les régulations traductionnelles pourraient avoir un rôle de modulation des phénomènes transcriptionnels trop intenses.

Certaines catégories fonctionnelles de gènes sont régulées uniquement au niveau de leur traduction. C'est le cas des gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette, sur-traduits.

La sur-traduction des protéines du cytosquelette pourrait moduler la réplication du VHC, son complexe de réplication interagissant avec le cytosquelette cellulaire (Bost et al., 2003). Une sur-transcription des gènes de cette catégorie a déjà été montrée dans une autre étude transcriptomique (Ciccaglione et al., 2008), il est donc possible que la sur-traduction de ces gènes soit associée dans notre étude aussi à une sur-transcription, mais que celle-ci n'était pas tout à fait significative.

La régulation traductionnelle de la traduction est très intéressante dans notre optique.

Certains facteurs d'initiation de la traduction sont sur-traduits :

- eIF4E2, un analogue de facteur de fixation à la coiffe eIF4E, mais qui pourrait avoir des fonctions biologiques un peu différentes et avoir un rôle dans des régulations traductionnelles spécifiques encore mal connues (Cho et al., 2005).

- EIF4B, qui interagit avec eIF3 et est nécessaire à la traduction IRES-dépendante de certains virus, comme celui de la fièvre aphteuse, mais ne serait pas nécessaire à la traduction du VHC (Lopez de Quinto et al., 2001). Une autre étude montre pourtant une fixation de ce facteur à l'IRES du VHC (Pacheco et al., 2008). eIF4B pourrait peut être avoir un rôle facilitant pour la traduction IRES-dépendante du VHC, même si il ne lui est pas nécessaire.

- EIF4A2, une hélicase ARN-dépendante impliquée dans le dépliement des structures secondaires pour l'initiation de la traduction.

- PPP1R15A est exprimée lors d'arrêt de la croissance cellulaire et catalyse la déphosphorylation de eIF2 α (Brush et al., 2003).

Les conséquences exactes de la sur-expression de ces facteurs de la traduction ne sont pas connues, mais elles indiquent que l'infection par le VHC induit des modifications traductionnelles particulière dans la cellule hôte.

Les protéines ribosomales mitochondriales ont leur traduction diminuée dans les cellules infectées. Il est intéressant de noter que plusieurs de ces protéines, en plus d'assurer la traduction des gènes mitochondriaux, ont un rôle pro-apoptotique (Cavdar Koc et al., 2001). La forte transcription de gènes pro-apoptotiques pourrait donc être régulée par la sous-traduction de d'autres gènes impliqués dans l'apoptose.

Enfin, il faut noter que PSMA7, une sous-unité du protéasome impliquée dans la traduction IRES-dépendante du VHC (Kruger et al., 2001), est sous-traduit dans notre étude.

3) Analyse de quelques facteurs d'initiation de la traduction

Nous avons recherché par Western Blot s'il existait des changements de phosphorylation de eIF2 α . En effet, la phosphorylation de ce facteur d'initiation de la traduction intervient en réponse à une infection virale (par la voie interféron) ou à un stress cellulaire. Cela entraîne une inhibition générale de la traduction, cellulaire et virale. Il a été montré que deux protéines du VHC, E2 et NS5A, inhibent l'activité de la protéine PKR, protéine kinase responsable de la phosphorylation de eIF2 α , induite par la réponse interféron

et activée par la présence d'ARN double brin. Dans notre étude, le taux de phosphorylation de eIF2 α ne varie pas lors de l'infection cellulaire. Cela pourrait être dû au défaut au défaut de réponse interféron des cellules Huh7.5 de notre étude, et donc à un défaut d'induction de l'expression de PKR dans ces cellules, plus qu'à une action inhibitrice des protéines virales. En effet, une augmentation de la phosphorylation de eIF2 α dans des cellules Huh7 non permissives lors de l'infection par JFH1 a été montré (Kang et al., 2009).

Il est intéressant de noter que dans notre étude, la protéine PKR est sous-traduite (d'un facteur 2). Cela pourrait constituer un nouveau mécanisme d'inhibition de cette protéine kinase par le VHC, permettant le maintien de la traduction cellulaire et virale lors de l'infection.

Ne nous retrouvons pas non plus de modification de la quantité ni du taux de phosphorylation de eIF4E, facteur d'initiation nécessaire à la traduction coiffe-dépendante. Cela indique qu'il ne semble pas y avoir d'inhibition de la traduction coiffe-dépendante au profit de la traduction IRES-dépendante, et nous ne retrouvons d'ailleurs pas de modification globale significative de la traduction des gènes cellulaires possédant un IRES.

4) Rôle des microARN dans la régulation traductionnelle

Le mécanisme par lequel ces différents gènes, appartenant à plusieurs catégories fonctionnelles distinctes sont régulés au niveau traductionnel n'est pas compris. Cette régulation pourrait passer par la modulation des microARN. Ceux-ci interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle, aussi bien négative que positive. Les microARN peuvent intervenir de plusieurs façons, en inhibant ou stimulant la traduction (Orom et al., 2008), ou en entraînant la destruction ou la séquestration des ARN, c'est pourquoi leur action peut être visible à la fois sur le transcriptome total et sur le traductome.

Une étude du profil des microARN, en parallèle avec un transcriptome classique, a été récemment réalisée sur des cellules infectées par la souche JFH1 (Liu et al., 2009c). Les auteurs montrent la modulation de 63 microARN au 3^{ème} jour, et cette modulation est associée avec la sous-représentation de plusieurs gènes ciblés par ces microARN.

Nous allons également réaliser des puces microARN sur nos échantillons, afin de mettre en relation les modulations de certains microARN avec des modifications du transcriptome, mais également de la traduction de leurs gènes cibles.

D'autre part, il se pourrait également que l'action positive ou négative de certains microARN sur la traduction de leurs ARN cibles change lors de l'infection, en effet, il a été montré que des microARN ont une action positive ou négative variant selon la phase du cycle cellulaire (Vasudevan et al., 2007). Or, le cycle cellulaire est modifié lors de l'infection par le VHC dans notre étude, les régulations traductionnelles pourraient donc être différentes sans qu'il y ait de modification quantitative des microARN.

De plus, nous allons effectuer ces puces microARN sur l'ARN total, mais également sur les fractions traduites, afin de mettre en évidence une éventuelle redistribution des microARN entre ces deux fractions. En effet, des microARN peuvent être retrouvés associés aux ribosomes (Kim et al., 2004a; Maroney et al., 2006), cela pourrait être un mécanisme par lequel les microARN régulent la traduction, les modalités de cette régulation sont encore très mal connues.

5) Le modèle d'étude JFH1

Le JFH1 est le meilleur modèle d'étude cellulaire du VHC existant actuellement, mais c'est une souche très particulière, isolée à partir d'un patient atteint d'hépatite fulminante. L'apoptose induite par l'infection du JFH1 dans les cellules Huh7 pourrait être une particularité de cette souche virale, dont l'infection évolue sur un mode aigu à la différence de la majorité des souches VHC qui persiste dans les hépatocytes.

Le fractionnement polysomique à partir de biopsies hépatiques congelées a pu être réalisé, et l'ARN extrait était de bonne qualité. Nous n'avons cependant pas envisagé d'étude de puces à ADN à partir de prélèvement de patients, car la variabilité des prélèvements et l'impossibilité de comparer des biopsies de foie infecté ou non-infecté provenant du même patients implique d'étudier un trop grand nombre d'échantillons.

Conclusion : la traduction comme cible pour les thérapies antivirales

Le développement de molécules thérapeutiques contre le VHC est problématique à cause de la forte variabilité de ce virus, et le fort taux de quasispéciation qui se produit durant l'infection. Il apparaît donc que toute molécule ciblant la polymérase, l'hélicase, ou les protéases virales sera toujours limitée par l'apparition de souches résistantes.

L'implication des régions 5'UTR et 3'UTR du VHC dans la traduction et la réplication du virus, et le fait que ces deux régions soient très fortement conservées entre les génotypes en font de bonnes cibles thérapeutiques.

Les virus utilisent souvent des mécanismes spécifiques pour assurer une traduction efficace de leur ARN. De telles stratégies virales, différentes des processus conventionnels de la traduction des ARNm cellulaires, pourraient représenter des cibles potentielles pour des thérapies antivirales. L'utilité de cibler la traduction a été démontrée pour les thérapies antimicrobiennes, avec l'utilisation fructueuse d'antibiotiques comme la tétracycline ou l'érythromycine, qui ciblent des éléments spécifiques de la traduction bactérienne.

Pour développer des thérapeutiques ciblant la traduction, il faut identifier les cibles traductionnelles qui sont spécifiques au virus et s'assurer que la traduction cellulaire restera sélectivement intacte. Cela est un challenge difficile car la traduction virale interfère avec presque tous les aspects de la traduction cellulaire.

La découverte de nouvelles pistes thérapeutiques laisse penser qu'il pourra être possible d'interférer spécifiquement avec la traduction du virus. Il a en effet été découvert un ARN (l'IRNA) capable d'inhiber la traduction IRES-dépendante du VHC et de plusieurs virus, sans interférer avec la traduction coiffe-dépendante. Il agit en entrant en compétition avec l'IRES pour les ITAFs cellulaires, notamment la protéine La (Venkatesan et al., 1999).

D'autre part, très récemment, un antagomir dirigé contre le miR-122 a été testé chez des Chimpanzé infectés par le VHC. Cet antagomir a permis une diminution significative de la virémie, sans apparition d'effets secondaires (Lanford et al., 2010).

Ces pistes encourageantes montrent l'importance de la compréhension du fonctionnement de l'IRES pour les thérapies ciblées et l'importance d'explorer le rôle des microARN dans le cycle viral du VHC.

Annexes

ANNEXE 1

Article accepté pour publication dans la revue Gut

Occult infection of peripheral B-cells by hepatitis C variants which have low translational efficiency in cultured hepatocytes.

Tony Durand (1) *

Gaëtana Di Liberto (1, 2)*

Hélène Colman (1)

Anne Cammas (4)

Sebastien Boni (1)

Patrick Marcellin (2)

Annie Cahour (3)

Stephan Vagner (4)

Cyrille Féray (1) **

1 INSERM U948. Hôtel-Dieu, 9 quai Moncoussu, Nantes, 44. France.

2 Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon INSERM 3

3 UPRES EA 2387, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 75651 Paris, France.

4 INSERM U563, Toulouse, France.

Corresponding author: Cyrille Féray cyrille.feray@univ-nantes.fr

* the two authors contributed equally to this study

** to whom correspondence should be addressed

Word count: 3900

Abbreviation: Hepatitis C virus (HCV), Internal Entry Ribosome Site (IRES), Lupus antigen (LA)

"The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in Gut editions and any other BMJPGJL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence (<http://group.bmj.com/products/journals/instructions-for-authors/licence-forms>)."

Abstract

Background:

Plasma hepatitis C virus (HCV) originates from hepatocytes. However, in certain subjects, B-cells may harbour both plasma strains and occult HCV strains that are not detected in the plasma. The internal ribosome entry site (IRES) of these latter strains is mutated, suggesting that the efficiency of viral translation could drive the cellular tropism of HCV.

Aims:

To determine if the translational efficiency of IRES variants in cultured hepatocytes or B-cells is correlated with their cellular tropism *in vivo*.

Methods:

The efficiency of IRES of 10 B-cell-specific variants and 9 plasma variants, isolated from 6 patients with compartmentalized variants in B-cells, was estimated by bicistronic dual luciferase expression in hepatocyte cell types (Huh7), in primary cultured human hepatocytes (PCH) and in two B-cell lines (Raji and Daudi).

Results:

For each of the 6 subjects, the plasma IRESes were significantly and repeatedly more efficient than B-cell IRESes in Huh7 (1.7 ± 0.3 vs 0.7 ± 0.2 ; $p < 0.01$) and PCH cells. In B-cell lines, B-cell and plasma IRES had similar low efficiencies (0.8 ± 0.1 vs 0.9 ± 0.1 ; NS). For 3 subjects, 2 IRES variants from the same compartment could be analyzed, and had the same efficiency in each cell type. Silencing the lupus antigen, a known IRES trans-acting factor, inhibited plasma IRES variants to a greater extent than B cell-specific IRESes

Conclusions:

B-cells can harbour occult variants that have a poor translational efficiency in hepatocytes, strongly suggesting their extra-hepatic origin and raising the hypothesis that competition between HCV variants with different IRESes is driven at a translational level in hepatic, as well as in extra-hepatic, sites.

What is already known about this subject:

- The 5' part of the HCV RNA is the internal ribosomal entry site (IRES).
- Infection by HCV of other cell types than hepatocyte remains elusive.
- HCV RNA is frequently detected in B-cell compartment
- Mutations of the IRES can be observed when B-cell and plasma variants are compared.

What are the new findings:

- Translational activity of B-cell specific IRESes is poor in hepatocytes but not in B-cell lines.
- Translational activity of plasma IRESes depend more on lupus antigen than those of B-cells IRESes.
- Translational activity of mutants found in the same compartment are similar.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- HCV variants found in B-cells are not adapted to hepatocytes strongly suggesting their extra-hepatic origin.
- Extra-hepatic sites of HCV replication could be sources for mutants which could escape the immune response or antiviral therapies.

Introduction

The hepatitis C virus (HCV) can infect B lymphocytes (Muller et al., 1994) [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10]. However, although the detection in these cells of negatively-stranded HCV RNA (the replicative intermediate) and viral proteins has been reported [11] [12] [9] [13], there is, as yet, no proof for a complete, productive replication of HCV in B-cells or in other extra-hepatic sites.

The possibility of the extra-hepatic replication of HCV is suggested by the presence of non-random mutations when peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and plasma/liver HCV RNA are compared. This compartmentalization occurs systematically within the hypervariable region of the envelope protein [14]. It is also observed less frequently for the conserved 5' non-coding region [15], which is the internal ribosome entry site (IRES) comprising the 341 nucleotides of the 5' untranslated region (5'-UTR) and the first 30 nucleotides coding for the core protein. Differences in plasma and lymphocyte HCV IRES sequences are mainly observed in subjects who have received multiple transfusions or who are former intravenous drug users [15] [16], a population known to be exposed to multiple infections [17] [18] (Aitken et al., 2008). The sequencing of other regions of the viral genome has shown that strains with compartmentalized IRESes are globally distant strains. Liver RNA was available in these studies, and plasma variants originated from the liver in all cases. Finally, the compartmentalization was stable during a number of years of patient follow-up [15]. In the absence of any extra-hepatic replication of HCV, the only explanation for the compartmentalization of HCV quasispecies should be genomic divergence between non-replicative HCV RNA persisting in cells with a prolonged lifespan, such as PBMC, and strains replicating actively in hepatocytes and detected in the plasma. The function of these compartmentalized IRESes should not differ from the function of plasma/liver IRESes.

The efficiency of IRES variants detected in an extra-hepatic site has been measured in 3 studies, using bicistronic reporter experiments in different cell lines [6] [20] [21]. In the first study, an H77 genotype 1 variant was found in peripheral blood mononuclear cells of a chimpanzee inoculated with H77 and also emerged after inoculation of a B-cell line by H77 [6]. This variant had an efficient IRES activity in lymphoid cell lines [6]. In the second study, a similar variant was detected in the dendritic cells of one subject and its efficiency was low in various cell types [20]. A third team detected a similar variant in the brain of a patient; this variant was efficient in a hepatocytic cell line (Huh7) but not in a microglial cell line [21]. These isolated observations, although discordant, suggested that IRES variability may affect cell tropism.

In the present study, we studied 6 patients whose peripheral B-cells harboured HCV IRES variants

distant from plasma variants, in order to determine if the mutations of the IRES variants could influence the cell specificity of HCV RNA translation.

Materials and methods

Study subjects (Table 1)

Informed consent and local ethics committee approval was obtained from all 6 patients for the initial study. Blood samples showed that all patients were plasma HCV RNA-positive and HBsAg- and HIV-negative and none had received anti-HCV therapy. The six subjects of the study were selected from previously-published series on the compartmentalization of HCV [14, 15, 16]. All 6 had a past history of drug use and chronic hepatitis without cirrhosis at liver biopsy. The viral loads in plasma and B-cells are reported in Table 1. The negatively-stranded HCV RNA had been detected in B-cells of 2 of these 6 patients.

Patients harboured HCV variants distant from plasma variants in B-cells, as demonstrated by subcloning of the 5' non-coding region (Figure 1 and Table 2), the E2 region and, in some cases, NS5A (data not shown). In order to avoid sampling bias (Lui, SL, Science 1996), the cloning and sequencing of HCV RNA was performed from the same amount of HCV RNA and on more than 1000 copies. The plasma strains were similar to the strains amplified from liver RNA, as determined by direct sequencing in all six patients and cloning of the IRES region in three of them. Finally, in all these subjects, the same compartmentalization was observed in blood samples harvested one year after the first sample (data not shown).

Amplification of IRES

Mononuclear cells were isolated from 14 ml EDTA-treated blood by centrifugation through a Ficoll density gradient. Recovered cells were washed 3 times and counted. Peripheral B lymphocytes were positively-sorted with anti-CD19 magnetic beads with more than 95 % purity. Cellular RNA (from 10⁶ cells) and serum RNA (from 150 µl serum) were extracted as described previously [14].

HCV IRES RNA was reverse-transcribed and amplified from both plasma and B cells. Complementary DNAs were synthesized from plasma (150 µl) and cellular RNAs (1 µg) using 100 mM random hexanucleotides (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) for 1 hour at 37 °C. They were further amplified by nested PCR with high-fidelity Expand taq DNA polymerase (Roche, Meylan, France) using external primers S9 (5'CCTGATGGGGGCGACACT-CC3'; nt 9-28); 94 (5'CTTGACGTCCCTGTGGGCG3'; nt 393-410) and internal primers S40BamH1 (5'AGCGGGATCCATCACTCCCCTGTGAGG3'; nt 26-52) and 54Pst1 (5'GCGCCCTGCAGTTTTCTTTGAGGTTTAGG 3'; nt 354-383).

Plasmid construct

Bicistronic vectors were derived from the vector pRF as described previously [22]. This plasmid named pRF contains the CMV and T7 promoters for transcription, the coding sequence for the firefly luciferase (Fluc), followed by a polylinker containing BamH1 and Pst1 and the *Renilla* luciferase gene (Rluc) in the pcDNA3.1Zeo(+) vector (Invitrogen) (Figure 5). The tested IRESes were inserted in the previously described vector using Bamh1 and Pst1 restriction sites. We called pIRF, the interexperimental construction containing a reference IRES from a genotype 1 strain with an A at positions 204 and 243 [22]. Both firefly and *Renilla* luciferases were measured for their respective luminometric activities in cell lysates with the Dual Luciferase Assay (Promega, Charbonnières, FRANCE) 24 hours after transfection. IRES relative translational activity was represented by the Rluc/Fluc ratio and was normalized to the R/F ratio of pIRF measured in each experiment. Northern blot was tested on RNA extracted from Huh7 transfected with pIRF and other constructions as previously described [22].

In-vitro transcription and translation

DNA templates for *in-vitro* transcription were amplified using the Expand High Fidelity PLUS PCR system (Roche, Meylan, France) on the bicistronic vectors, allowing amplification of the gene encoding F luciferase, followed by the tested IRES and the R luciferase coding region. The 5' and 3' primers used for this amplification were 5' TAATACGACTCACTATAGG 3', and 5' T(35)TAGAAGGCACAGTCGAGG 3', respectively. The 3' primer contained a 35-nt polyT overhang, allowing transcription of an mRNA with a 35-nt poly A tail. The templates were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen).

Capped polyadenylated mRNAs were synthesized using the MEGAscript T7 kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions, with 5 µl of PCR product template. 6 mM cap analogue M⁷G(5')ppp(5')G was added to cap mRNAs, and the GTP solution was used at a 1:5 dilution. The mix was incubated for 4 hours at 37 °C and DNA was removed by digestion for 15 min with TURBODNase. All RNAs were purified using the MEGAclean kit (Ambion, Austin, TX, USA) to remove unincorporated nucleotides and cap analogue. All RNA transcripts were quantified by absorbance at 260 nm and their integrity was checked by Northern Blot as previously described [28]. *In-vitro* transcribed RNAs were also translated in rabbit reticulocyte lysates (Promega) as described previously [23].

Cell cultures

We tested one hepatocytic cell line, HUH7, and two human B-cell lymphoma cell-lines, Raji and Daudi. HUH7 cells were maintained in Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10 % fetal calf serum, 1 % penicillin streptomycin, 1 % L-glutamine and, for HepG2, 1 % non-essential amino acids. Primary cultured human hepatocytes (PCH) (monolayers) were supplied by Biopredic

(Rennes, France) and grown according to a previously-described protocol [24]. Non-adherent cell-lines were maintained with RPMI 1640 medium with 10 % fetal calf serum, 1 % L-Glutamine, 1 % penicillin streptomycin, 1 % non essential amino acids and 1 % sodium pyruvate. Raji and Daudi cell-lines were purchased from the American Type Culture Collection and the Huh7 cell-line was a generous gift from Christine Neuveut (Pasteur Institute, Paris France). All medium components were purchased from Sigma Aldrich (Fallavier, FRANCE). Cells were passaged twice weekly at the appropriate dilution for exponential growth and incubated at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. Transfections were carried out in triplicate if viability was > 90 %. Adherent cells were transfected at 70 % confluency. One day before transfection, 2 x 10⁵ adherent cells (Huh7, HepG2) were seeded in 24-well plates. For DNA transfection, 2 x 10⁶ Raji or Daudi cells were submitted to electroporation (Biorad, 260 V, 950 µF). Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used for the transfection of PCH and Huh7 cells. For RNA transfection, 2 µg mRNA was electroporated with nucleofector kit V (Amaxa, Koln, Germany) for Raji cells and with lipofectamine 2000 for Huh7 and PCH cells. In each experiment, pIRF (genotype 1 with a C204A; G243A) was included to normalize the different experiments.

Silencing F luciferase and the lupus antigen

To search for RNA transcribed from a cryptic promoter located within the tested IRES, an siRNA specifically targeting F luciferase, which was the upstream reporter gene (pGL2 luciferase control duplex firefly, Eurogentec, France) was cotransfected with the constructs. The siRNA directed against lupus antigen (LA) (ON-Targetplus SMARTpool SSB) and control siRNA (SiControl Non Targeting #4) were purchased from Dharmacon and all experiments were carried out as described previously [25]. Western blots were performed using standard protocols with a polyclonal antibody against La/SSB (D-20-Santa cruz Biotechnology) and normalization by actin (Santa Cruz Biotechnology). The siRNAs were transfected using lipofectamine.

Sequence analysis

Nucleic acid sequences were aligned using MEGA software version 4 (Tamura, Dudley, Nei, Kumar, 2007). The IRES sequences were compared to consensus sequences of genotypes 1 to 6 and also to that of H77. Analysis of quasispecies clustering in relation to their original compartment (plasma or B-cells) was based on Mantel's test, as described previously [5].

Statistical analysis

IRES efficiency was determined in triplicate and in 2 to 3 independent experiments. Each measure was normalized to the efficiency of the reference pIRF, also performed in triplicate for each transfection experiment. Statview software (SAS institute Inc)

was used to analyze the repeated measures of the efficiency of each IRES variant, according to the cell type or experimental conditions, with the Mann-Whitney U test.

Results

Selection of IRES sequences in B-cell and plasma compartments

PCR products were sub-cloned and a mean of 12 clones were derived from each compartment. At least one cluster of variants derived from B-cell HCV RNA (Figure 1) was detected in all patients. In 5/6 cases, B cells also harboured minor strains similar to those detected in plasma, as reported previously [15], while full compartmentalization between plasma and B cells was found in patient #M. In one of the 6 patients (#D), genotypes 1 and 2 were found in both plasma and B cells. In one patient (#G), genotypes 2 and 3 were both detected in plasma but only genotype 3 was detected in B cells. Table 2 shows the alignment of the main selected variants.

Figure 1 shows the 23 main clusters of IRES sequences in these 6 patients, each represented by at least 2 clones. One clone representing each of these 23 clusters was selected. The clones corresponding to 4 minor clusters of IRES sequences could not be reamplified and, thus, a total of 19 cloned IRES sequences (10 from B cells and 9 from plasma) were then tested in the luciferase assay with hepatocyte and B-cell lines. It is worth noting that, in 3 patients (#G, #D, #M), we could analyze 2 distinct HCV major variants derived from the plasma and the B-cell compartments.

B-cell specific IRES had a lower efficiency in hepatocytes than plasma/liver IRES.

In each experiment, bicistronic constructs were tested in triplicate and we repeated all experiments at least 3 times. Because repeated experiments were performed, we normalized the efficiency of tested IRES sequences by dividing the experimental Rluc/Fluc ratio by the Rluc/Fluc ratio of the reference IRES sequence (pIRF) measured in each experiment. The efficiency of the 9 plasma IRES sequences was significantly higher in Huh7 cells than that of the 10 corresponding B-cell-specific IRES variants (1.7 ± 0.3 vs 0.7 ± 0.2 ; $p < 0.01$; Figure 2). Similarly, the least efficient of the 9 tested plasma IRESes was 50 % more efficient than the most efficient of the 10 tested B-cell IRESes. We repeated tests of pairs of plasma and B-cell-specific IRES variants from 4 patients, using primary cultured human hepatocytes from 3 different donors (Figure 3). The differences between plasma and B-cell-specific variants were similar to those observed with Huh7 cells in 3 cases (#C, #M, #D), while this difference was smaller in patient #G. In these 6 patients coinfecting by distinct strains, the strains which predominated in the liver, and thus in the plasma, were those with a more-efficient IRES in hepatocyte cells.

In Raji cells, for 5/6 patients, the Rluc/Fluc ratios were similar with B cell and plasma IRES variants and were not significantly different to those

measured for B-cell IRESes in Huh7 (Figure 2). Similar results were observed with Daudi cells (data not shown). These results support the hypothesis of competition between IRES variants mediated by the translation efficiencies of coinfecting strains, since all 5 patients harboured both specific B-cell variants and variants whose IRESes were identical to those of plasma variants in their peripheral-cells. Conversely, the only patient (#M) whose B-cell-specific IRESes were slightly, but significantly, more efficient than paired plasma IRESes in Raji cells was the only patient who harboured specific variants only in his B-cells, with no plasma strains (complete compartmentalization). In the same view, 2 distinct IRESes could be isolated and analyzed in plasma and in B-cells in 3 patients. In each of these subjects, the efficiencies of the 2 IRESes detected in the same compartment were similar in all cell lines tested. This suggests that the coexistence of 2 IRES variants within a compartment is related to the same efficiency of IRES in the cell type.

Major IRES variants were also tested *in vitro* in a rabbit reticulocyte translation system. We observed a relatively wide range of efficiencies among the different IRESes (1.3 to 5.1) with a small, but significant, difference between paired plasma and B-cell IRESes (data not shown). No correlation was found between the R/F ratios determined in reticulocyte lysates and those in hepatocytes or B-cell cultures, suggesting a role of hepatocyte or B-cell-specific factors in explaining our observations.

A cryptic promoter did not play a role in bicistronic plasmid constructs

In most studies, HCV IRES activity has been measured in the same bicistronic dual luciferase expression system as that used here. One important potential source of bias is that reporter gene transcription may be initiated by a cryptic promoter located in the plasmid constructs. This has been demonstrated with cellular IRESes [26] as well as HCV IRESes [27]. We applied siRNAs directed against upstream firefly luciferase in Huh7 cells and in primary cultured human hepatocytes transfected with different bicistronic plasmids. SiRNAs specifically directed to firefly luciferase (ineffective on R luciferase) were tested with 9 clones and with pIRF. In each case a drastic reduction in firefly and *Renilla* luciferase activity was observed (Figure 4). However, silencing *Renilla* luciferase activity was slightly less efficient than silencing firefly luciferase, confirming the existence of an internal transcription promoter located in DNA encoding the HCV IRES [27]. The contribution of transcription of this promoter was weak in all tested clones and, therefore, did not markedly affect our results. The efficiency of luciferase silencing was poor in non-adherent cells (Raji and Daudi cells). The empty vector pRF without IRES was also tested in Huh7: the F luciferase activity was comparable to those obtained with plasmid with IRES such as pIRF but as expected in the absence of IRES, the R

luciferase activity was extremely low (figure 2). Finally, northern blot on RNAs extracted from Huh7 transfected with pIRF and 4 other constructs showed the expected 3 kb long bicistronic transcript (supplemental data).

Transfection of bicistronic RNA constructs confirmed results obtained with plasmid constructs (Figure 5)

The other important control was the transfection of capped bicistronic RNA containing B-cell and plasma IRES variants. In this case, artefacts due to cryptic promoters are impossible. Although the efficiency of RNA transfection was poor, reproducible results were obtained with Huh7 and Raji cells for 2 pairs of plasma and B-cell IRESes. In the former cell type, plasma IRES variants were more efficient than B-cell variants in both tested subjects. In subject #M, plasma IRES was less efficient than B-cell IRES in Raji cells, as demonstrated previously with plasmid constructs. In subject #D, activity was similar in plasma and B-cell variants, as observed using corresponding plasmid constructs. It should be noted that the efficiency of IRES measured with bicistronic RNA was higher than that obtained with the plasmid constructs. Indeed, the Rluc/Fluc ratio was between 2 and 9, while it was below 2 when measured with the plasmid constructs. This was because all RNA molecules cannot be capped, reducing the translation of firefly luciferase. Finally, we translated *in vitro* the RNA from the pRF (empty vector) and transfected it in Huh7 cells. We did not observe any R luciferase activity after RNA transfection while the measured F luciferase was comparable to the activity observed with RNA translated from pIRF. Altogether, these controls showed that the marked correlation between cell tropism and IRES efficiency was not due to reproducible artefacts.

The function of plasma IRES depends more on LA than B-cell specific IRES

Because LA has been shown to be a potent cellular IRES transacting factor of HCV IRES, we silenced this gene in PCH and Huh7 cells. Although LA silencing was relatively modest (50 %), a strong reduction in the Rluc/Fluc ratio was observed compared with scrambled siRNA, confirming that LA was a positive regulator of HCV IRES. In Huh7 cells, the reduction in IRES efficiency by LA silencing was more marked for plasma IRES (mean 2.7 ± 0.7) than for B-cell IRES (1.7 ± 0.2 , $p < 0.01$) (Figure 6). Similar results were observed with PCH cells. Despite repeated attempts, LA silencing could not be obtained in Raji or Daudi cells.

Discussion

The main finding of this study was the correlation between the cellular tropism of HCV variants for liver or B-lymphocytes *in vivo*, and the translational efficiency of their IRESes, tested by transfection in cultured hepatocytes and B-cells. The IRESes of the B-cell-specific strains had a common activity profile and were consistently less efficient than paired plasma IRESes in hepatocyte cells (Huh7 and primary cultured hepatocytes) but as efficient as these latter in non-hepatocytic cells (Raji, Daudi). These findings establish a new argument suggesting the existence of an extrahepatic replication of HCV. If we hypothesize the absence of an extra-hepatic replication of HCV, the variants found in B-cells are obligatorily of hepatocyte origin and the nucleotide sequence divergences between compartments are only due to mutations occurring in infected hepatocytes. Following this view, the fact that occult IRESes were systematically less efficient than plasma IRESes strongly suggests that B-cell-specific strains originated from cells other than hepatocytes.

Although we detected negative-stranded HCV RNA in B-cells of two of six cases studied, our findings do not demonstrate that replication obligatorily occurs in peripheral B-cells. Peripheral B-cells could harbour strains coming from non-liver tissues, such as lymph nodes [9]. A recent study showed clearly that B-cell-associated HCV readily infected hepatoma cells and had an enhanced infectivity compared with extracellular virus [28]. In this view, our results largely exclude a positive adaptation of the translation of HCV RNA to B-cells. In only 1/6 cases, the efficiency of B-cell IRESes was modestly higher in B-cell lines. However, we cannot exclude that these extra-hepatic strains are produced by tissues or cells in which the IRESes could be more efficient. Finally, these results suggest that these IRESes are not defective since their functions were similar to the plasma IRESes in Raji, as well as in Daudi, cells.

The group of patients studied is particular. They were selected according to the existence of an occult, persistent infection of their B-cells by HCV strains not found in plasma/liver. They were clearly infected by at least two distinct strains with different IRESes in a setting of past and repeated exposures. We used this clinical setting to test the hypothesis of a relation between IRES function and extra-hepatic replication of HCV. The fact that plasma IRESes were more competent than B-cell IRESes in hepatocytes suggested a selective pressure on extra-hepatic strains and, therefore, an extra-hepatic replication. Besides the issue of cellular tropism of different HCV variants, these findings suggest that strains coinfecting an individual, and having divergent IRESes, may compete through the efficiency of their IRES. Indeed, we observed in all available cases that the IRES variants coinfecting the same compartment *in vivo* had a similar translational efficiency in the corresponding cell system. Conversely, IRES variants which were dominant in a compartment had a stronger translational efficacy in the

corresponding cell system. Since all other viral regions of plasma and occult variants are also divergent, we have to postulate that efficacy of translation is dominant over other viral functions. The fact that the efficiency of IRES in different cell types was related to its distribution in plasma and B-cells suggests that the initiation of viral translation is dominant over other viral functions. Although the differences in IRES efficiency were highly significant and reproducible, they could seem relatively modest. However, for viral replication, any differences among competing strains rapidly favour those that initiate translation more efficiently. Finally, the analysis of more patients or more quasispecies might show that HCV variants with less-efficient translation, but with another strong selective advantage, exist.

This study, like others on the HCV IRES, was based mainly on the use of the classical bicistronic expression vector, which is more reproducible than monocistronic constructs but which may also be affected by artefacts. Silencing of reporter genes, RNA transfection, northern blot rules out any significant role of cryptic promoters or RNA splicing in our observations. Another point is that the 3'-UTR of HCV is also important for translation, although the isolated IRES is sufficient to initiate viral translation. We did not test the role of the 3'-UTR, although it likely enhances the translational efficiency of the IRES [29]. The main reason is that the complete amplification of the whole genome in a single PCR is quite challenging and, thus, the isolation of the 3'-UTR corresponding to a given IRES is still impossible.

Although it is non-coding, the IRES is a well-preserved region because of the secondary and tertiary structures necessary to bind ribosomal proteins, eIF3, and probably because of trans-acting factors such as the HCV core protein [23], liver-specific microRNA mi122 [30] or lupus antigen [25] [31]. Few mutations have been described in this region which could regulate translational efficiency. The reproducible differences in the sensitivity of compartmentalized IRES to silencing of the LA suggest that this trans-acting factor plays in our observations. Other trans-acting factors could also be involved (Semler and Waterman, 2007).

The most important issue raised by the hypothesis of IRES-driven competition between HCV strains is to determine the viral and host conditions leading to optimal translation of HCV RNA in hepatocytes, as this could lead to the discovery of novel therapeutic targets.

References

- 1 Muller HM, Kallinowski B, Solbach C, *et al.* B-lymphocytes are predominantly involved in viral propagation of hepatitis C virus (HCV). *Arch Virol Suppl* 1994;**9**:307-16.
- 2 Muratori L, Gibellini D, Lenzi M, *et al.* Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 1996;**88**:2768-74.
- 3 De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R, *et al.* Hepatitis C virus within a malignant lymphoma lesion in the course of type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1995;**86**:1887-92.
- 4 Sansonno D, De Vita S, Iacobelli AR, *et al.* Clonal analysis of intrahepatic B cells from HCV-infected patients with and without mixed cryoglobulinemia. *J Immunol* 1998;**160**:3594-601.
- 5 Roque Afonso AM, Jiang J, Penin F, *et al.* Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 1999;**73**:9213-21.
- 6 Lerat H, Shimizu YK, Lemon SM. Cell type-specific enhancement of hepatitis C virus internal ribosome entry site-directed translation due to 5' nontranslated region substitutions selected during passage of virus in lymphoblastoid cells. *J Virol* 2000;**74**:7024-31.
- 7 Fournillier A, Freida D, Defrance T, *et al.* Analysis of B-lymphocyte differentiation in patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol* 2004;**72**:566-74.
- 8 Bare P, Massud I, Parodi C, *et al.* Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *J Gen Virol* 2005;**86**:1717-27.
- 9 Pal S, Sullivan DG, Kim S, *et al.* Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism. *Gastroenterology* 2006;**130**:1107-16.
- 10 Machida K, Cheng KT, Sung VM, *et al.* Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol* 2006;**80**:866-74.
- 11 Lerat H, Berby F, Trabaud MA, *et al.* Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996;**97**:845-51.
- 12 Laskus T, Radkowski M, Piasek A, *et al.* Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000;**181**:442-8.
- 13 Pham TN, King D, Macparland SA, *et al.* Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection. *Gastroenterology* 2008;**134**:812-22.
- 14 Ducoulombier D, Roque-Afonso AM, Di Liberto G, *et al.* Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 2004;**39**:817-25.
- 15 Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, *et al.* Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005;**79**:6349-57.
- 16 Di Liberto G, Roque-Afonso AM, Kara R, *et al.* Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. *Gastroenterology* 2006;**131**:76-84.
- 17 Herring BL, Page-Shafer K, Tobler LH, *et al.* Frequent hepatitis C virus superinfection in injection drug users. *J Infect Dis* 2004;**190**:1396-403.
- 18 Micallef JM, Macdonald V, Jauncey M, *et al.* High incidence of hepatitis C virus reinfection within a cohort of injecting drug users. *J Viral Hepat* 2007;**14**:413-8.
- 19 Aitken CK, Lewis J, Tracy SL, *et al.* High incidence of hepatitis C virus reinfection in a cohort of injecting drug users. *Hepatology* 2008;**48**:1746-52.
- 20 Laporte J, Bain C, Maurel P, *et al.* Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 2003;**101**:52-7.
- 21 Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, *et al.* Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 2004;**78**:5170-83.
- 22 Laporte J, Malet I, Andrieu T, *et al.* Comparative analysis of translation efficiencies of hepatitis C virus 5' untranslated regions among intraindividual quasispecies present in chronic infection: opposite behaviors depending on cell type. *J Virol* 2000;**74**:10827-33.
- 23 Boni S, Lavergne JP, Boulant S, *et al.* Hepatitis C virus core protein acts as a trans-modulating factor on internal translation initiation of the viral RNA. *J Biol Chem* 2005;**280**:17737-48.
- 24 Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, *et al.* Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology* 1993;**18**:406-14.
- 25 Costa-Mattioli M, Svitkin Y, Sonenberg N. La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:6861-70.
- 26 Bert AG, Grepin R, Vadas MA, *et al.* Assessing IRES activity in the HIF-1alpha and other cellular 5' UTRs. *Rna* 2006;**12**:1074-83.
- 27 Dumas E, Staedel C, Colombat M, *et al.* A

promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**:1275-81.

28 Stamataki Z, Shannon-Lowe C, Shaw J, *et al.* Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood* 2009;**113**:585-93.

29 Song Y, Friebe P, Tzima E, *et al.* The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 2006;**80**:11579-88.

30 Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, *et al.* Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 2007;**449**:919-22.

31 Izumi RE, Das S, Barat B, *et al.* A peptide from autoantigen La blocks poliovirus and hepatitis C virus cap-independent translation and reveals a single tyrosine critical for La RNA binding and translation stimulation. *J Virol* 2004;**78**:3763-76.

32 Semler BL, Waterman ML. IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends Microbiol* 2007.

Legends to figures

Figure 1

Phylogenetic trees of HCV variants infecting the 6 patients showing 23 clusters of 2 or more clones: B-cell specific clusters are framed with dotted lines, plasma variants are framed with continuous lines. IRES sequences which could not be tested are indicated by a circle. Note that in all subjects but #M, some B-cell variants clustered with plasma variants.

Figure 2

R/F ratio of 19 IRES in Huh7 and in Raji. In all cases and in Huh7, the plasma variants had a significantly higher translational efficiency than B-cell variants ($p < 0.01$ indicated by *). In Raji, the efficiency of plasma IRES was lower than in Huh7 and similar to the efficiency of B-cell IRES variants. The R/F value of pRF (the empty vector) was very weak.

Figure 3

R/F ratio of plasma and B-cell IRES from 4 patients transfected in primary cultured human hepatocytes, confirming the low efficiency of B-cell IRES in hepatocyte cells.

Figure 4

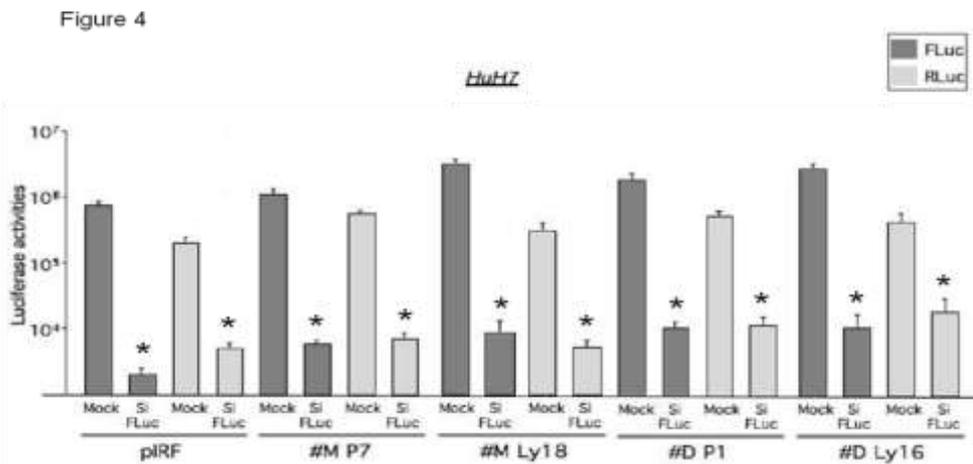
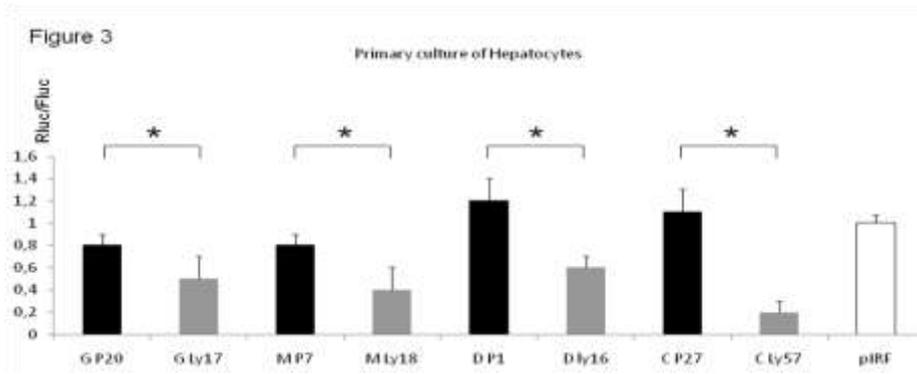
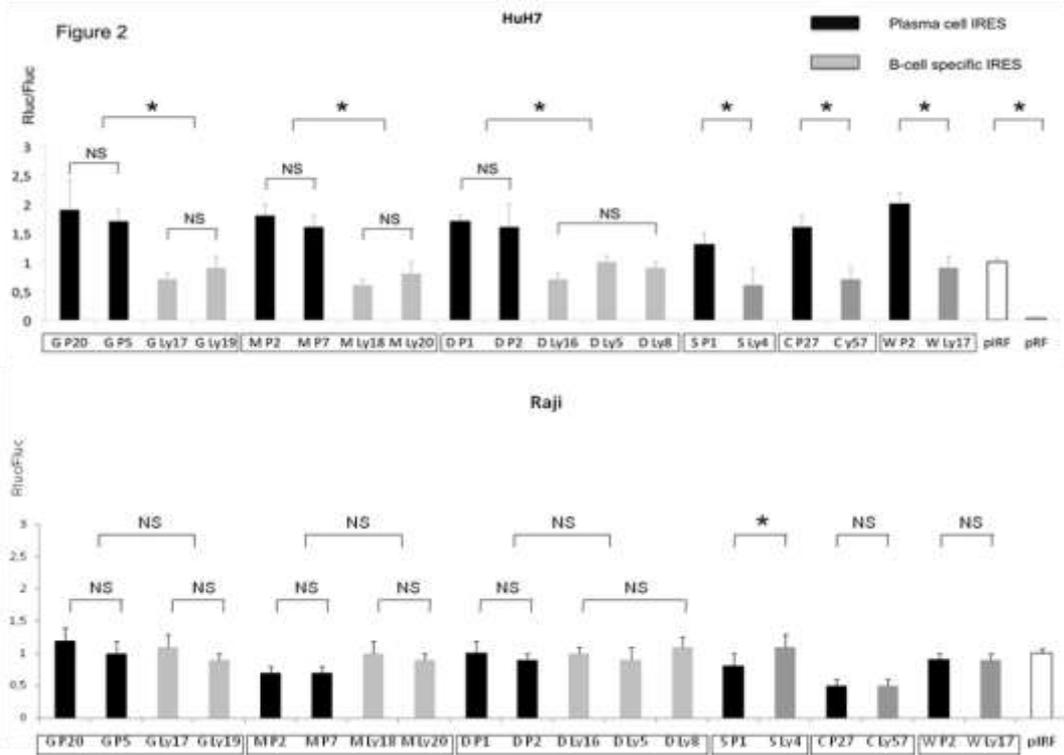
Effect of firefly luciferase silencing on the activity of F and R luciferase on different IRES. The residual *Renilla* expression was observed, confirming the existence of a low cryptic promoter within the plasmid sequence coding IRES. Note the logarithmic expression of IRES activity, magnifying weak residual *Renilla* expression.

Figure 5

Transfection of bicistronic RNA transcribed *in vitro* through the T7 polymerase promoter which was partially capped, confirming the stronger efficiency of plasma IRES in Huh7 and Raji cell lines, the results obtained with the corresponding plasmid vectors. RNA translated from the pRF (empty vector) was transfected and F luciferase but no R luciferase activity was observed.

Figure 6

Effect of lupus antigen silencing on the efficiency of plasma and B-cell-specific IRES expressed in Huh7 and primary cultured hepatocytes.



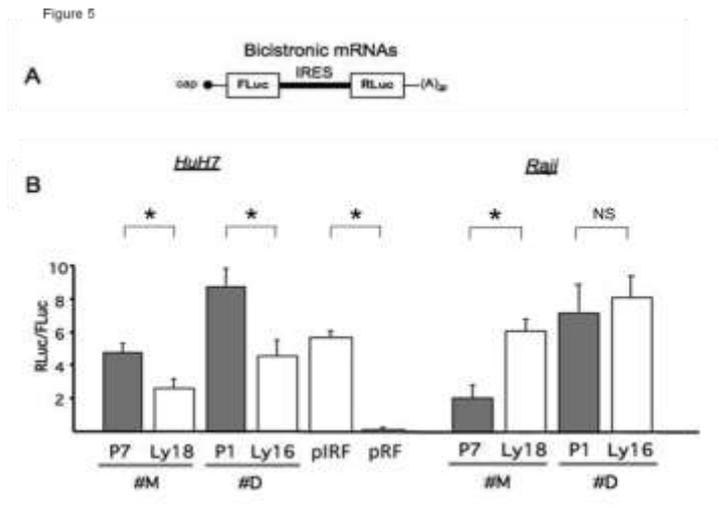
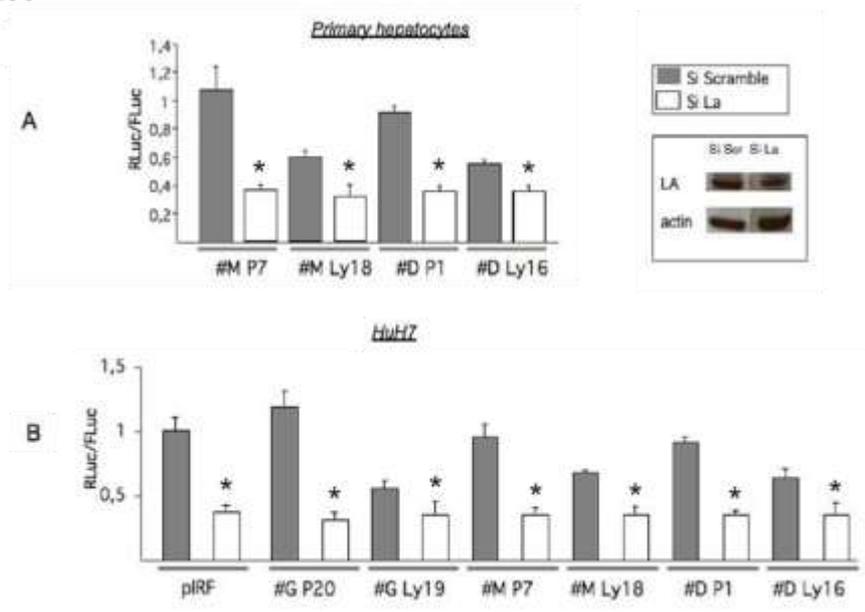


Figure 6



ANNEXE 2

Liste des gènes cellulaires possédant un IRES, avec les régulations identifiées par puces à ADN au niveau de leur transcription, de leur traduction et de leur expression lors de l'infection par la souche VHC JFH1. Le sens de la variation est indiqué, SUR, SOUS, ou 0 = pas de changement significatif.

Cette liste comprend les gènes cellulaires pour lesquels un IRES a été identifié, mais en réalité, on estime qu'environ 3% des gènes cellulaires pourraient posséder un IRES. La liste a été établie à partir des bases de données <http://www.rangueil.inserm.fr/IRESdatabase/> et <http://iresite.org/>.

Gene	Transcription	Traduction	Expression
JUN	SUR	SUR	SUR
Mnt	SUR	SUR	SUR
HSPA5	SUR	SUR	SUR
MYC	SUR	SUR	0
IGF2	SOUS	SUR	0
YAP1	SUR	0	SUR
VEGFA	SUR	0	SUR
Cyr61	SUR	0	SUR
Pim1	SUR	0	SUR
UBXN2B	SUR	0	0
BAG1	SUR	0	0
NAT1	SOUS	0	SOUS
HSPA2	SOUS	0	SOUS
DCLRE1A	SOUS	0	SOUS
GJB1	SOUS	0	SOUS
ATP5J2	SOUS	0	SOUS
Cat	SOUS	0	SOUS
MYB	SOUS	0	0
NDST1	SOUS	0	0
eIF4G1	SOUS	0	0
Rbm3	0	0	SOUS
LEF1	0	0	0
SSB	0	0	0
XIAP	0	0	0
BIRC2	0	0	0
Notch2	0	0	0
Lamb1	0	0	0
CCND1	0	0	0
FMR1	0	0	0
PRKCD	0	0	0

Gene	Transcription	Traduction	Expression
MYCN	0	0	0
RUNX1	0	0	0
Smad5	0	0	0
HIF1A	0	0	0
CSDE1	0	0	0
OXA7	0	0	0
Myt2	0	0	0
Nkx6-2	0	0	0
Nkx6-1	0	0	0
NRF	0	0	0
MYCL	0	0	0
RUNX1T1	0	0	0
APC	0	0	0
Apaf1	0	0	0
TP53	0	0	0
FGF2	0	0	0
PDGFB	0	0	0
AT1R	0	0	0
ESR1	0	0	0
IGF1R	0	0	0
GJA1	0	0	0
ARC	0	0	0
MAP2	0	0	0
CDC2L2	0	0	0
SDKN1B	0	0	0
SLC25A21	0	0	0
DDN	0	0	0
NRGN	0	0	0
NBS1	0	0	0

Bibliographie

- Alberti, A., and L. Benvegnu. 2003. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 38 Suppl 1:S104-18.
- Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-8.
- Ali, N., and A. Siddiqui. 1995. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* 69:6367-75.
- Ali, N., and A. Siddiqui. 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2249-54.
- Aoki, Y., H. Aizaki, T. Shimoike, H. Tani, K. Ishii, I. Saito, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1998. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. *Virology* 250:140-50.
- Arima, N., C.Y. Kao, T. Licht, R. Padmanabhan, Y. Sasaguri, and R. Padmanabhan. 2001. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 276:12675-84.
- Balvay, L., R. Soto Rifo, E.P. Ricci, D. Decimo, and T. Ohlmann. 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 1789:542-57.
- Baranick, B.T., N.A. Lemp, J. Nagashima, K. Hiraoka, N. Kasahara, and C.R. Logg. 2008. Splicing mediates the activity of four putative cellular internal ribosome entry sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4733-8.
- Bare, P., I. Massud, C. Parodi, L. Belmonte, G. Garcia, M.C. Nebel, M. Corti, M.T. Pinto, R.P. Bianco, M.M. Bracco, R. Campos, and B.R. Ares. 2005. Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *J Gen Virol* 86:1717-27.
- Baril, M., and L. Brakier-Gingras. 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* 33:1474-86.
- 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* 37:957-71.
- Bartenschlager, R., and V. Lohmann. 2001. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 52:1-17.
- 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* 69:7519-28.
- 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* 278:41003-12.
- Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633-42.
- Bartosch, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J.M. Pawlotsky, D. Lavillette, and F.L. Cosset. 2005. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79:8217-29.

- Beales, L.P., D.J. Rowlands, and A. Holzenburg. 2001. The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *Rna* 7:661-70.
- Bellecave, P., M.L. Andreola, M. Ventura, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak, and T. Astier-Gin. 2003. Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro. *Oligonucleotides* 13:455-63.
- Benga, W.J., S.E. Krieger, M. Dimitrova, M.B. Zeisel, M. Parnot, J. Lupberger, E. Hildt, G. Luo, J. McLauchlan, T.F. Baumert, and C. Schuster. 2010. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51:43-53.
- Berezikov, E., E. Cuppen, and R.H. Plasterk. 2006. Approaches to microRNA discovery. *Nat Genet* 38 Suppl:S2-7.
- Bigger, C.B., B. Guerra, K.M. Brasky, G. Hubbard, M.R. Beard, B.A. Luxon, S.M. Lemon, and R.E. Lanford. 2004. Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol* 78:13779-92.
- Blackham, S., A. Baillie, F. Al-Hababi, K. Remlinger, S. You, R. Hamatake, and M.J. McGarvey. 2010. Gene Expression Profiling Indicates The Role of Host Oxidative Stress, Apoptosis, Lipid Metabolism and Intracellular Transport Genes in the Replication of Hepatitis C Virus. *J Virol*.
- Blight, K.J., and C.M. Rice. 1997. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 71:7345-52.
- Blight, K.J., J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76:13001-14.
- Boisvert, J., X.S. He, R. Cheung, E.B. Keeffe, T. Wright, and H.B. Greenberg. 2001. Quantitative analysis of hepatitis C virus in peripheral blood and liver: replication detected only in liver. *J Infect Dis* 184:827-35.
- Boni, S., J.P. Lavergne, S. Boulant, and A. Cahour. 2005. Hepatitis C virus core protein acts as a trans-modulating factor on internal translation initiation of the viral RNA. *J Biol Chem* 280:17737-48.
- Borman, A.M., J.L. Bailly, M. Girard, and K.M. Kean. 1995. Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res* 23:3656-63.
- Bost, A.G., D. Venable, L. Liu, and B.A. Heinz. 2003. Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system. *J Virol* 77:4401-8.
- Boulant, 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* 88:2204-13.
- Braconi, C., N. Valeri, P. Gasparini, N. Huang, C. Taccioli, G. Nuovo, T. Suzuki, C.M. Croce, and T. Patel. 2010. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. *Clin Cancer Res* 16:957-66.
- Bradrick, S.S., R.W. Walters, and M. Gromeier. 2006. The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res* 34:1293-303.
- 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* 96:13034-9.
- Brown, E.A., H. Zhang, L.H. Ping, and S.M. Lemon. 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20:5041-5.

- Brush, M.H., D.C. Weiser, and S. Shenolikar. 2003. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 23:1292-303.
- Bukh, J., R.H. Purcell, and R.H. Miller. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4942-6.
- Bukh, J., T. Pietschmann, V. Lohmann, N. Krieger, K. Faulk, R.E. Engle, S. Govindarajan, M. Shapiro, M. St Claire, and R. Bartenschlager. 2002. Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14416-21.
- Bung, C., Z. Bochkava, I. Terenin, R. Zinovkin, I.N. Shatsky, and M. Niepmann. 2010. Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett*.
- Cavdar Koc, E., A. Ranasinghe, W. Burkhart, K. Blackburn, H. Koc, A. Moseley, and L.L. Spremulli. 2001. A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Lett* 492:166-70.
- Chang, J., S.H. Yang, Y.G. Cho, S.B. Hwang, Y.S. Hahn, and Y.C. Sung. 1998. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 72:3060-5.
- Chang, M.L., C.T. Yeh, J.C. Chen, C.C. Huang, S.M. Lin, I.S. Sheen, D.I. Tai, C.M. Chu, W.P. Lin, M.Y. Chang, C.K. Liang, C.T. Chiu, and D.Y. Lin. 2008. Altered expression patterns of lipid metabolism genes in an animal model of HCV core-related, nonobese, modest hepatic steatosis. *BMC Genomics* 9:109.
- Chang, S.C., J.H. Yen, H.Y. Kang, M.H. Jang, and M.F. Chang. 1994. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1284-90.
- Chatterji, U., M. Bobardt, S. Selvarajah, F. Yang, H. Tang, N. Sakamoto, G. Vuagniaux, T. Parkinson, and P. Gallay. 2009. The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 284:16998-7005.
- Cheng, J.C., M.F. Chang, and S.C. Chang. 1999. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J Virol* 73:7044-9.
- Chevaliez, S., and J.M. Pawlotsky. 2007. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13:2461-6.
- Cho, P.F., F. Poulin, Y.A. Cho-Park, I.B. Cho-Park, J.D. Chicoine, P. Lasko, and N. Sonenberg. 2005. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* 121:411-23.
- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-62.
- Choo, Q.L., K.H. Richman, J.H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P.J. Barr, and et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2451-5.
- Choo, Q.L., G. Kuo, R. Ralston, A. Weiner, D. Chien, G. Van Nest, J. Han, K. Berger, K. Thudium, C. Kuo, and et al. 1994. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1294-8.
- Chung, Y.L., M.L. Sheu, and S.H. Yen. 2003. Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 107:65-73.

- Ciccaglione, A.R., C. Marcantonio, E. Tritarelli, P. Tataseo, A. Ferraris, R. Bruni, B. Dallapiccola, G. Gerosolimo, A. Costantino, and M. Rapicetta. 2008. Microarray analysis identifies a common set of cellular genes modulated by different HCV replicon clones. *BMC Genomics* 9:309.
- Cole, C.N., and J.J. Scarcelli. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 18:299-306.
- Collier, A.J., S. Tang, and R.M. Elliott. 1998. Translation efficiencies of the 5' untranslated region from representatives of the six major genotypes of hepatitis C virus using a novel bicistronic reporter assay system. *J Gen Virol* 79 (Pt 10):2359-66.
- Cormier, E.G., F. Tsamis, F. Kajumo, R.J. Durso, J.P. Gardner, and T. Dragic. 2004. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7270-4.
- Cornelis, S., Y. Bruynooghe, G. Denecker, S. Van Huffel, S. Tinton, and R. Beyaert. 2000. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5:597-605.
- Costa-Mattioli, M., Y. Svitkin, and N. Sonenberg. 2004. La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24:6861-70.
- Craig, A.W., A. Haghighat, A.T. Yu, and N. Sonenberg. 1998. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392:520-3.
- Cribier, B., C. Schmitt, A. Bingen, A. Kirn, and F. Keller. 1995. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 10):2485-91.
- Cullen, B.R. 2009. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* 457:421-5.
- Das, S., P. Coward, and A. Dasgupta. 1994. A small yeast RNA selectively inhibits internal initiation of translation programmed by poliovirus RNA: specific interaction with cellular proteins that bind to the viral 5'-untranslated region. *J Virol* 68:7200-11.
- Das, S., D.J. Kenan, D. Bocskai, J.D. Keene, and A. Dasgupta. 1996. Sequences within a small yeast RNA required for inhibition of internal initiation of translation: interaction with La and other cellular proteins influences its inhibitory activity. *J Virol* 70:1624-32.
- Das, S., M. Ott, A. Yamane, W. Tsai, M. Gromeier, F. Lahser, S. Gupta, and A. Dasgupta. 1998. A small yeast RNA blocks hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation and inhibits replication of a chimeric poliovirus under translational control of the HCV IRES element. *J Virol* 72:5638-47.
- Dash, S., R. Prabhu, S. Hazari, F. Bastian, R. Garry, W. Zou, S. Haque, V. Joshi, F.G. Regenstein, and S.N. Thung. 2005. Interferons alpha, beta, gamma each inhibit hepatitis C virus replication at the level of internal ribosome entry site-mediated translation. *Liver Int* 25:580-94.
- De Benedetti, A., and J.R. Graff. 2004. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23:3189-99.
- Delhem, N., A. Sabile, R. Gajardo, P. Podevin, A. Abadie, M.A. Blaton, D. Kremsdorf, L. Beretta, and C. Brechot. 2001. Activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by hepatocellular carcinoma derived-hepatitis C virus core protein. *Oncogene* 20:5836-45.
- Deng, L., T. Adachi, K. Kitayama, Y. Bungyoku, S. Kitazawa, S. Ishido, I. Shoji, and H. Hotta. 2008. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase 3-dependent pathway. *J Virol* 82:10375-85.

- Di Liberto, G., A.M. Roque-Afonso, R. Kara, D. Ducoulombier, G. Fallot, D. Samuel, and C. Feray. 2006. Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. *Gastroenterology* 131:76-84.
- 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* 82:9008-22.
- Doherty, E.A., and J.A. Doudna. 2000. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 69:597-615.
- Domitrovich, A.M., K.W. Diebel, N. Ali, S. Sarker, and A. Siddiqui. 2005. Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* 335:72-86.
- Dubuisson, J., F. Helle, and L. Cocquerel. 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 10:821-7.
- Ducoulombier, D., A.M. Roque-Afonso, G. Di Liberto, F. Penin, R. Kara, Y. Richard, E. Dussaix, and C. Feray. 2004. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 39:817-25.
- Dumas, E., C. Staedel, M. Colombat, S. Reigadas, S. Chabas, T. Astier-Gin, A. Cahour, S. Litvak, and M. Ventura. 2003. A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR. *Nucleic Acids Res* 31:1275-81.
- Dumoulin, F.L., A. von dem Bussche, J. Li, L. Khamzina, J.R. Wands, T. Sauerbruch, and U. Spengler. 2003. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 305:260-6.
- Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown, and D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14863-8.
- Elazar, M., P. Liu, C.M. Rice, and J.S. Glenn. 2004. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* 78:11393-400.
- Erdtmann, L., N. Franck, H. Lerat, J. Le Seyec, D. Gilot, I. Cannie, P. Gripon, U. Hibner, and C. Guguen-Guillouzo. 2003. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278:18256-64.
- Evans, M.J., C.M. Rice, and S.P. Goff. 2004. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13038-43.
- Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-5.
- Fang, J.W., and R.W. Moyer. 2000. The effects of the conserved extreme 3' end sequence of hepatitis C virus (HCV) RNA on the in vitro stabilization and translation of the HCV RNA genome. *J Hepatol* 33:632-9.
- Fang, X., M.B. Zeisel, J. Wilpert, B. Gissler, R. Thimme, C. Kreutz, T. Maiwald, J. Timmer, W.V. Kern, J. Donauer, M. Geyer, G. Walz, E. Depla, F. von Weizsacker, H.E. Blum, and T.F. Baumert. 2006. Host cell responses induced by hepatitis C virus binding. *Hepatology* 43:1326-36.
- Farci, P., H.J. Alter, S. Govindarajan, D.C. Wong, R. Engle, R.R. Lesniewski, I.K. Mushahwar, S.M. Desai, R.H. Miller, N. Ogata, and et al. 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258:135-40.
- 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* 292:767-70.

- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-11.
- Flisiak, R., S.V. Feinman, M. Jablkowski, A. Horban, W. Kryczka, M. Pawlowska, J.E. Heathcote, G. Mazzella, C. Vandelli, V. Nicolas-Metral, P. Groscurin, J.S. Liz, P. Scalfaro, H. Porchet, and R. Crabbe. 2009. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 49:1460-8.
- Forns, X., P.J. Payette, X. Ma, W. Satterfield, G. Eder, I.K. Mushahwar, S. Govindarajan, H.L. Davis, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh. 2000. Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* 32:618-25.
- Forton, D.M., P. Karayiannis, N. Mahmud, S.D. Taylor-Robinson, and H.C. Thomas. 2004. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 78:5170-83.
- Foy, E., K. Li, R. Sumpter, Jr., Y.M. Loo, C.L. Johnson, C. Wang, P.M. Fish, M. Yoneyama, T. Fujita, S.M. Lemon, and M. Gale, Jr. 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2986-91.
- Friebe, P., and R. Bartenschlager. 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76:5326-38.
- Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager. 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75:12047-57.
- Fukuda, K., T. Umehara, S. Sekiya, K. Kunio, T. Hasegawa, and S. Nishikawa. 2004. An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 325:670-5.
- Fukushi, S., M. Okada, T. Kageyama, F.B. Hoshino, K. Nagai, and K. Katayama. 2001a. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome. *Virus Res* 73:67-79.
- Fukushi, S., M. Okada, J. Stahl, T. Kageyama, F.B. Hoshino, and K. Katayama. 2001b. Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 276:20824-6.
- Gale, M., Jr. 2003. Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 37:975-8.
- Gale, M.J., Jr., M.J. Korth, N.M. Tang, S.L. Tan, D.A. Hopkins, T.E. Dever, S.J. Polyak, D.R. Gretch, and M.G. Katze. 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230:217-27.
- Gamarnik, A.V., and R. Andino. 2000. Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J Virol* 74:2219-26.
- Gao, L., H. Aizaki, J.W. He, and M.M. Lai. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78:3480-8.
- Garaigorta, U., and F.V. Chisari. 2009. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 6:513-22.

- Gardner, J.P., R.J. Durso, R.R. Arrigale, G.P. Donovan, P.J. Maddon, T. Dragic, and W.C. Olson. 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4498-503.
- Gault, E., P. Soussan, Y. Morice, L. Sanders, A. Berrada, B. Rogers, and P. Deny. 2003. Evaluation of a new serotyping assay for detection of anti-hepatitis C virus type-specific antibodies in serum samples. *J Clin Microbiol* 41:2084-7.
- Ghosh, A.K., M. Majumder, R. Steele, K. Meyer, R. Ray, and R.B. Ray. 2000a. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus Res* 67:173-8.
- Ghosh, A.K., M. Majumder, R. Steele, P. Yaciuk, J. Chrivia, R. Ray, and R.B. Ray. 2000b. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 275:7184-8.
- Girard, S., E. Vossman, D.E. Misek, P. Podevin, S. Hanash, C. Brechot, and L. Beretta. 2004. Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signaling revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology* 40:708-18.
- Gong, G., G. Waris, R. Tanveer, and A. Siddiqui. 2001. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9599-604.
- Gontarek, R.R., L.L. Gutshall, K.M. Herold, J. Tsai, G.M. Sathe, J. Mao, C. Prescott, and A.M. Del Vecchio. 1999. hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res* 27:1457-63.
- Gonzalez, M.E., and L. Carrasco. 2003. Viroporins. *FEBS Lett* 552:28-34.
- Gosert, R., K.H. Chang, R. Rijnbrand, M. Yi, D.V. Sangar, and S.M. Lemon. 2000. Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites *In vivo*. *Mol Cell Biol* 20:1583-95.
- Gottlieb, E., and J.A. Steitz. 1989. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *Embo J* 8:851-61.
- Grakoui, A., N.H. Shoukry, D.J. Woollard, J.H. Han, H.L. Hanson, J. Ghrayeb, K.K. Murthy, C.M. Rice, and C.M. Walker. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302:659-62.
- 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* 72:8782-8.
- Hamilton, T.L., M. Stoneley, K.A. Spriggs, and M. Bushell. 2006. TOPs and their regulation. *Biochem Soc Trans* 34:12-6.
- 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* 20:3520.
- Hazari, S., A. Patil, V. Joshi, D.E. Sullivan, C.D. Fermin, R.F. Garry, R.M. Elliott, and S. Dash. 2005. Alpha interferon inhibits translation mediated by the internal ribosome entry site of six different hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 86:3047-53.
- He, L., X. He, L.P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A.L. Jackson, P.S. Linsley, C. Chen, S.W. Lowe, M.A. Cleary, and G.J. Hannon. 2007. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447:1130-4.
- He, Y., W. Yan, C. Coito, Y. Li, M. Gale, Jr., and M.G. Katze. 2003. The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins. *J Gen Virol* 84:535-43.

- He, Y., H. Nakao, S.L. Tan, S.J. Polyak, P. Neddermann, S. Vijaysri, B.L. Jacobs, and M.G. Katze. 2002. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 76:9207-17.
- Heller, T., S. Saito, J. Auerbach, T. Williams, T.R. Moreen, A. Jazwinski, B. Cruz, N. Jeurkar, R. Sapp, G. Luo, and T.J. Liang. 2005. An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2579-83.
- 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* 27:3300-10.
- Hennecke, M., M. Kwissa, K. Metzger, A. Oumard, A. Kroger, R. Schirmbeck, J. Reimann, and H. Hauser. 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 29:3327-34.
- Honda, M., E.A. Brown, and S.M. Lemon. 1996. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna* 2:955-68.
- Honda, M., M.R. Beard, L.H. Ping, and S.M. Lemon. 1999a. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 73:1165-74.
- Honda, M., R. Rijnbrand, G. Abell, D. Kim, and S.M. Lemon. 1999b. Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol* 73:4941-51.
- Honda, M., S. Kaneko, E. Matsushita, K. Kobayashi, G.A. Abell, and S.M. Lemon. 2000. Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* 118:152-62.
- Hou, W., Q. Tian, J. Zheng, and H.L. Bonkovsky. 2009. MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins. *Hepatology*.
- Huang, H., F. Sun, D.M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr., and J. Ye. 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5848-53.
- Hwang, B., J.H. Lim, B. Hahm, S.K. Jang, and S.W. Lee. 2009. hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 378:584-8.
- Hwang, L.H., C.L. Hsieh, A. Yen, Y.L. Chung, and D.S. Chen. 1998. Involvement of the 5' proximal coding sequences of hepatitis C virus with internal initiation of viral translation. *Biochem Biophys Res Commun* 252:455-60.
- Ikeda, M., K. Abe, M. Yamada, H. Dansako, K. Naka, and N. Kato. 2006. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 44:117-25.
- Imbert, I., M. Dimitrova, F. Kien, M.P. Kieny, and C. Schuster. 2003. Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J Gen Virol* 84:1549-57.
- Isken, O., M. Baroth, C.W. Grassmann, S. Weinlich, D.H. Ostareck, A. Ostareck-Lederer, and S.E. Behrens. 2007. Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *Rna* 13:1675-92.
- Ito, T., and M.M. Lai. 1997. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol* 71:8698-706.

- 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* 254:288-96.
- Ito, T., S.M. Tahara, and M.M. Lai. 1998. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* 72:8789-96.
- 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* 283:28546-62.
- Johannes, G., M.S. Carter, M.B. Eisen, P.O. Brown, and P. Sarnow. 1999. Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13118-23.
- Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309:1577-81.
- Kalliampakou, K.I., M. Kalamvoki, and P. Mavromara. 2005. Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein downregulates HCV IRES-dependent translation. *J Gen Virol* 86:1015-25.
- Kanda, T., R. Steele, R. Ray, and R.B. Ray. 2007. Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol* 81:669-76.
- Kang, J.I., S.N. Kwon, S.H. Park, Y.K. Kim, S.Y. Choi, J.P. Kim, and B.Y. Ahn. 2009. PKR protein kinase is activated by hepatitis C virus and inhibits viral replication through translational control. *Virus Res* 142:51-6.
- Kapadia, S.B., H. Barth, T. Baumert, J.A. McKeating, and F.V. Chisari. 2007. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* 81:374-83.
- Kaplan, D.E., K. Sugimoto, K. Newton, M.E. Valiga, F. Ikeda, A. Aytaman, F.A. Nunes, M.R. Lucey, B.A. Vance, R.H. Vonderheide, K.R. Reddy, J.A. McKeating, and K.M. Chang. 2007. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 132:654-66.
- Kato, J., N. Kato, H. Yoshida, S.K. Ono-Nita, Y. Shiratori, and M. Omata. 2002a. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 66:187-99.
- Kato, J., N. Kato, M. Moriyama, T. Goto, H. Taniguchi, Y. Shiratori, and M. Omata. 2002b. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. *J Infect Dis* 186:155-63.
- Kato, N., K.H. Lan, S.K. Ono-Nita, Y. Shiratori, and M. Omata. 1997. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 71:8856-9.
- 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* 64:334-9.
- Kaukinen, P., M. Sillanpaa, S. Kotenko, R. Lin, J. Hiscott, K. Melen, and I. Julkunen. 2006. Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. *Virol J* 3:66.
- Kawamura, T., A. Furusaka, M.J. Koziel, R.T. Chung, T.C. Wang, E.V. Schmidt, and T.J. Liang. 1997. Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology* 25:1014-21.
- Kelaidi, C., F. Rollot, S. Park, M. Tulliez, B. Christoforov, Y. Calmus, P. Podevin, D. Bouscary, P. Sogni, P. Blanche, and F. Dreyfus. 2004. Response to antiviral treatment in hepatitis C virus-associated marginal zone lymphomas. *Leukemia* 18:1711-6.

- Kieft, J.S. 2008. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci* 33:274-83.
- Kieft, J.S., K. Zhou, R. Jubin, and J.A. Doudna. 2001. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *Rna* 7:194-206.
- Kikuchi, K., T. Umehara, K. Fukuda, A. Kuno, T. Hasegawa, and S. Nishikawa. 2005. A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain III. *Nucleic Acids Res* 33:683-92.
- Kim, J., A. Krichevsky, Y. Grad, G.D. Hayes, K.S. Kosik, G.M. Church, and G. Ruvkun. 2004a. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:360-5.
- Kim, J.H., K.Y. Paek, S.H. Ha, S. Cho, K. Choi, C.S. Kim, S.H. Ryu, and S.K. Jang. 2004b. A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol* 24:7878-90.
- Kim, S.J., J.H. Kim, Y.G. Kim, H.S. Lim, and J.W. Oh. 2004c. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 279:50031-41.
- Kim, Y.K., S.H. Lee, C.S. Kim, S.K. Seol, and S.K. Jang. 2003. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *Rna* 9:599-606.
- Kittleson, D.J., K.A. Chianese-Bullock, Z.Q. Yao, T.J. Braciale, and Y.S. Hahn. 2000. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 106:1239-49.
- Klein, K.C., S.J. Polyak, and J.R. Lingappa. 2004. Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *J Virol* 78:9257-69.
- 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* 74:6242-50.
- Kolykhalov, A.A., S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70:3363-71.
- Kolykhalov, A.A., E.V. Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277:570-4.
- Kong, L.K., and P. Sarnow. 2002. Cytoplasmic expression of mRNAs containing the internal ribosome entry site and 3' noncoding region of hepatitis C virus: effects of the 3' leader on mRNA translation and mRNA stability. *J Virol* 76:12457-62.
- Korenaga, M., T. Wang, Y. Li, L.A. Showalter, T. Chan, J. Sun, and S.A. Weinman. 2005. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 280:37481-8.
- Kozak, M. 2005. A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* 33:6593-602.
- Krausslich, H.G., M.J. Nicklin, H. Toyoda, D. Etchison, and E. Wimmer. 1987. Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J Virol* 61:2711-8.
- Kronke, J., R. Kittler, F. Buchholz, M.P. Windisch, T. Pietschmann, R. Bartenschlager, and M. Frese. 2004. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 78:3436-46.

- Kruger, M., C. Beger, P.J. Welch, J.R. Barber, M.P. Manns, and F. Wong-Staal. 2001. Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* 21:8357-64.
- Kruger, M., C. Beger, Q.X. Li, P.J. Welch, R. Tritz, M. Leavitt, J.R. Barber, and F. Wong-Staal. 2000. Identification of eIF2Bgamma and eIF2gamma as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8566-71.
- Kusakawa, T., T. Shimakami, S. Kaneko, K. Yoshioka, and S. Murakami. 2007. Functional interaction of hepatitis C Virus NS5B with Nucleolin GAR domain. *J Biochem* 141:917-27.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., M.E. Van Eden, P. Younan, and R.E. Lloyd. 2004. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol* 24:1779-90.
- Kwong, A.D., L. McNair, I. Jacobson, and S. George. 2008. Recent progress in the development of selected hepatitis C virus NS3.4A protease and NS5B polymerase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 8:522-31.
- Lamarre, D., P.C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D.R. Cameron, M. Cartier, M.G. Cordingley, A.M. Faucher, N. Goudreau, S.H. Kawai, G. Kukulj, L. Lagace, S.R. LaPlante, H. Narjes, M.A. Poupert, J. Rancourt, R.E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y.S. Tsantrizos, S.M. Weldon, C.L. Yong, and M. Llinas-Brunet. 2003. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426:186-9.
- Lan, K.H., M.L. Sheu, S.J. Hwang, S.H. Yen, S.Y. Chen, J.C. Wu, Y.J. Wang, N. Kato, M. Omata, F.Y. Chang, and S.D. Lee. 2002. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 21:4801-11.
- Lancaster, A.M., E. Jan, and P. Sarnow. 2006. Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Rna* 12:894-902.
- Lanford, R.E., E.S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M.E. Munk, S. Kauppinen, and H. Orum. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327:198-201.
- Laporte, J., C. Bain, P. Maurel, G. Inchauspe, H. Agut, and A. Cahour. 2003. Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101:52-7.
- Laporte, J., I. Malet, T. Andrieu, V. Thibault, J.J. Toulme, C. Wychowski, J.M. Pawlotsky, J.M. Hureau, H. Agut, and A. Cahour. 2000. Comparative analysis of translation efficiencies of hepatitis C virus 5' untranslated regions among intraindividual quasispecies present in chronic infection: opposite behaviors depending on cell type. *J Virol* 74:10827-33.
- Lau, J.Y., X. Xie, M.M. Lai, and P.C. Wu. 1998. Apoptosis and viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 18:169-76.
- Lavie, M., A. Goffard, and J. Dubuisson. 2007. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* 9:71-86.
- 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* 81:8752-65.
- Lechner, F., D.K. Wong, P.R. Dunbar, R. Chapman, R.T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B.D. Walker. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191:1499-512.

- Lerat, H., Y.K. Shimizu, and S.M. Lemon. 2000. Cell type-specific enhancement of hepatitis C virus internal ribosome entry site-directed translation due to 5' nontranslated region substitutions selected during passage of virus in lymphoblastoid cells. *J Virol* 74:7024-31.
- Lerat, H., M. Honda, M.R. Beard, K. Loesch, J. Sun, Y. Yang, M. Okuda, R. Gosert, S.Y. Xiao, S.A. Weinman, and S.M. Lemon. 2002. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122:352-65.
- Lipardi, C., Q. Wei, and B.M. Paterson. 2001. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107:297-307.
- Liu, H.M., H. Aizaki, K.S. Choi, K. Machida, J.J. Ou, and M.M. Lai. 2009a. SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 386:249-56.
- Liu, S., W. Yang, L. Shen, J.R. Turner, C.B. Coyne, and T. Wang. 2009b. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83:2011-4.
- Liu, X., T. Wang, T. Wakita, and W. Yang. 2009c. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology*.
- Logvinoff, C., M.E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, S.M. Feinstone, H. Alter, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10149-54.
- Lohmann, V., J.O. Koch, and R. Bartenschlager. 1996. Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. *J Hepatol* 24:11-9.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-3.
- Lopez de Quinto, S., E. Lafuente, and E. Martinez-Salas. 2001. IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *Rna* 7:1213-26.
- Lourenco, S., F. Costa, B. Debarges, T. Andrieu, and A. Cahour. 2008. Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by cis-acting RNA elements and trans-acting viral factors. *Febs J* 275:4179-97.
- Lourenco, S., S. Boni, D. Furling, F.L. Cosset, and A. Cahour. 2009. A cell-based bicistronic lentiviral reporter system for identification of inhibitors of the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J Virol Methods* 158:152-9.
- Lozach, P.Y., H. Lortat-Jacob, A. de Lacroix de Lavalette, I. Staropoli, S. Foug, A. Amara, C. Houles, F. Fieschi, O. Schwartz, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and R. Altmeyer. 2003. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278:20358-66.
- 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* 7:1105-10.
- Luo, G., S. Xin, and Z. Cai. 2003. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77:3312-8.
- Lyons, A.J., J.R. Lytle, J. Gomez, and H.D. Robertson. 2001. Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II. *Nucleic Acids Res* 29:2535-41.

- 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* 82:7624-39.
- Magrin, S., A. Craxi, C. Fabiano, L. Marino, G. Fiorentino, O. Lo Iacono, R. Volpes, V. Di Marco, P. Almasio, A. Vaccaro, M.S. Urdea, J.C. Wilber, C. Bonura, F. Gianguzza, V. Capursi, S. Filiberti, L. Stuyver, and L. Pagliaro. 1996. HCV viraemia is more important than genotype as a predictor of response to interferon in Sicily (southern Italy). *J Hepatol* 25:583-90.
- Majumder, M., A.K. Ghosh, R. Steele, R. Ray, and R.B. Ray. 2001. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 75:1401-7.
- Manns, M.P., H. Wedemeyer, and M. Cornberg. 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 55:1350-9.
- Marcellin, P. 2009. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int* 29 Suppl 1:1-8.
- Maroney, P.A., Y. Yu, J. Fisher, and T.W. Nilsen. 2006. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13:1102-7.
- Marshall, A., S. Rushbrook, S.E. Davies, L.S. Morris, I.S. Scott, S.L. Vowler, N. Coleman, and G. Alexander. 2005. Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 128:33-42.
- Maylin, S., M. Martinot-Peignoux, R. Mouchari, N. Boyer, M.P. Ripault, D. Cazals-Hatem, N. Giuily, C. Castelnau, A.C. Cardoso, T. Asselah, C. Feray, M.H. Nicolas-Chanoine, P. Bedossa, and P. Marcellin. 2008. Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 135:821-9.
- McCaffrey, A.P., K. Ohashi, L. Meuse, S. Shen, A.M. Lancaster, P.J. Lukavsky, P. Sarnow, and M.A. Kay. 2002. Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol Ther* 5:676-84.
- McHutchison, J.G., K. Patel, P. Pockros, L. Nyberg, S. Pianko, R.Z. Yu, F.A. Dorr, and T.J. Kwok. 2006. A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 44:88-96.
- Meertens, L., C. Bertaux, L. Cukierman, E. Cormier, D. Lavillette, F.L. Cosset, and T. Dragic. 2008. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82:3555-60.
- Mehta, S.H., A. Cox, D.R. Hoover, X.H. Wang, Q. Mao, S. Ray, S.A. Strathdee, D. Vlahov, and D.L. Thomas. 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 359:1478-83.
- Mercer, D.F., D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W.R. Addison, K.P. Fischer, T.A. Churchill, J.R. Lakey, D.L. Tyrrell, and N.M. Kneteman. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7:927-33.
- Meuleman, P., J. Hesselgesser, M. Paulson, T. Vanwolleghem, I. Desombere, H. Reiser, and G. Leroux-Roels. 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48:1761-8.
- Miller, R.H., and R.H. Purcell. 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2057-61.
- 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* 9:1089-97.
- Molina, S., V. Castet, C. Fournier-Wirth, L. Pichard-Garcia, R. Avner, D. Harats, J. Roitelman, R. Barbaras, P. Graber, P. Ghersa, M. Smolarsky, A. Funaro, F. Malavasi,

- D. Larrey, J. Coste, J.M. Fabre, A. Sa-Cunha, and P. Maurel. 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46:411-9.
- Morikawa, K., T. Ito, H. Nozawa, M. Inokuchi, M. Uchikoshi, T. Saito, K. Mitamura, and M. Imawari. 2006. Translational enhancement of HCV RNA genotype 1b by 3'-untranslated and envelope 2 protein-coding sequences. *Virology* 345:404-15.
- Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, and K. Koike. 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4:1065-7.
- Muerhoff, A.S., T.P. Leary, J.N. Simons, T.J. Pilot-Matias, G.J. Dawson, J.C. Erker, M.L. Chalmers, G.G. Schlauder, S.M. Desai, and I.K. Mushahwar. 1995. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 69:5621-30.
- Murakami, K., M. Abe, T. Kageyama, N. Kamoshita, and A. Nomoto. 2001. Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol* 146:729-41.
- Murakami, Y., H.H. Aly, A. Tajima, I. Inoue, and K. Shimotohno. 2009. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 50:453-60.
- Murakami, Y., T. Yasuda, K. Saigo, T. Urashima, H. Toyoda, T. Okanoue, and K. Shimotohno. 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25:2537-45.
- Murata, K., M. Lechmann, M. Qiao, T. Gunji, H.J. Alter, and T.J. Liang. 2003. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6753-8.
- Nakajima, N., M. Hijikata, H. Yoshikura, and Y.K. Shimizu. 1996. Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol* 70:3325-9.
- Nakazawa, T., N. Kato, S. Ohkoshi, A. Shibuya, and K. Shimotohno. 1994. Characterization of the 5' noncoding and structural region of the hepatitis C virus genome from patients with non-A, non-B hepatitis responding differently to interferon treatment. *J Hepatol* 20:623-9.
- Nguyen, H., M. Mudryj, M. Guadalupe, and S. Dandekar. 2003. Hepatitis C virus core protein expression leads to biphasic regulation of the p21 cdk inhibitor and modulation of hepatocyte cell cycle. *Virology* 312:245-53.
- O'Donnell, K.A., E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C.V. Dang, and J.T. Mendell. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435:839-43.
- Oem, J.K., Z. Xiang, Y. Zhou, L.A. Babiuk, and Q. Liu. 2007. Utilization of RNA polymerase I promoter and terminator sequences to develop a DNA transfection system for the study of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-dependent translation. *J Clin Virol* 40:55-9.
- Ohkawa, K., H. Ishida, F. Nakanishi, A. Hosui, K. Ueda, T. Takehara, M. Hori, and N. Hayashi. 2004. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem* 279:11719-26.
- Oketani, M., Y. Asahina, C.H. Wu, and G.Y. Wu. 1999. Inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression by a DNA ribonuclease. *J Hepatol* 31:628-34.
- Okuda, M., K. Li, M.R. Beard, L.A. Showalter, F. Scholle, S.M. Lemon, and S.A. Weinman. 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122:366-75.
- Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund. 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30:460-71.

- Otsuka, M., N. Kato, K. Lan, H. Yoshida, J. Kato, T. Goto, Y. Shiratori, and M. Omata. 2000. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 275:34122-30.
- Pacheco, A., S. Reigadas, and E. Martinez-Salas. 2008. Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA. *Proteomics* 8:4782-90.
- Paek, K.Y., C.S. Kim, S.M. Park, J.H. Kim, and S.K. Jang. 2008. RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 82:12082-93.
- Pal, S., M.C. Shuhart, L. Thomassen, S.S. Emerson, T. Su, N. Feuerborn, J. Kae, and D.R. Gretch. 2006a. Intrahepatic hepatitis C virus replication correlates with chronic hepatitis C disease severity in vivo. *J Virol* 80:2280-90.
- Pal, S., D.G. Sullivan, S. Kim, K.K. Lai, J. Kae, S.J. Cotler, R.L. Carithers, Jr., B.L. Wood, J.D. Perkins, and D.R. Gretch. 2006b. Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism. *Gastroenterology* 130:1107-16.
- Park, K.J., S.H. Choi, S.Y. Lee, S.B. Hwang, and M.M. Lai. 2002. Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus modulates tumor necrosis factor alpha-stimulated nuclear factor kappa B activation. *J Biol Chem* 277:13122-8.
- Pasquinelli, C., J.M. Shoenberger, J. Chung, K.M. Chang, L.G. Guidotti, M. Selby, K. Berger, R. Lesniewski, M. Houghton, and F.V. Chisari. 1997. Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology* 25:719-27.
- Pavio, N., S. Battaglia, D. Boucreux, B. Arnulf, R. Sobesky, O. Hermine, and C. Brechot. 2005. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. *Oncogene* 24:6119-32.
- Pedersen, I.M., G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C.M. Croce, F.V. Chisari, and M. David. 2007. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449:919-22.
- Penin, F., C. Combet, G. Germanidis, P.O. Fraïnais, G. Deleage, and J.M. Pawlotsky. 2001. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol* 75:5703-10.
- Pestka, J.M., M.B. Zeisel, E. Blaser, P. Schurmann, B. Bartosch, F.L. Cosset, A.H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, K. Rispeter, H.E. Blum, M. Roggendorf, and T.F. Baumert. 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6025-30.
- 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* 12:67-83.
- Petrik, J., H. Parker, and G.J. Alexander. 1999. Human hepatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds to the poly(U) tract of the 3' non-coding region of hepatitis C virus genomic RNA. *J Gen Virol* 80 (Pt 12):3109-13.
- Pfeffer, S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F.A. Grasser, L.F. van Dyk, C.K. Ho, S. Shuman, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, G. Randall, B.D. Lindenbach, C.M. Rice, V. Simon, D.D. Ho, M. Zavolan, and T. Tuschl. 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2:269-76.
- Pham, T.N., C.S. Coffin, and T.I. Michalak. 2010. Occult hepatitis C virus infection: what does it mean? *Liver Int.*

- Piccininni, S., A. Varaklioti, M. Nardelli, B. Dave, K.D. Raney, and J.E. McCarthy. 2002. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J Biol Chem* 277:45670-9.
- 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* 103:7408-13.
- 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* 282:938-41.
- Ploss, A., and C.M. Rice. 2009. Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* 10:1220-7.
- Preiss, T., and M. Hentze. 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25:1201-11.
- Pudi, R., P. Srinivasan, and S. Das. 2004. La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 279:29879-88.
- Puig, M., K. Mihalik, J.C. Tilton, O. Williams, M. Merchlinsky, M. Connors, S.M. Feinstone, and M.E. Major. 2006. CD4+ immune escape and subsequent T-cell failure following chimpanzee immunization against hepatitis C virus. *Hepatology* 44:736-45.
- Pyronnet, S., L. Pradayrol, and N. Sonenberg. 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5:607-16.
- Randall, G., M. Panis, J.D. Cooper, T.L. Tellinghuisen, K.E. Sukhodolets, S. Pfeffer, M. Landthaler, P. Landgraf, S. Kan, B.D. Lindenbach, M. Chien, D.B. Weir, J.J. Russo, J. Ju, M.J. Brownstein, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, and C.M. Rice. 2007. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12884-9.
- Rao, H.Y., F.R. Ren, W.L. Guan, M. Houde, S.C. Du, C.L. Liu, X.Y. Gong, and L. Wei. 2009. Evaluation of the performance of the EIAgen HCV test for detection of hepatitis C virus infection. *J Virol Methods* 162:203-7.
- Ray, R.B., R. Steele, K. Meyer, and R. Ray. 1997. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 272:10983-6.
- Ray, R.B., L.M. Lagging, K. Meyer, R. Steele, and R. Ray. 1995. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 37:209-20.
- Ray, R.B., K. Meyer, R. Steele, A. Shrivastava, B.B. Aggarwal, and R. Ray. 1998. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 273:2256-9.
- Raychaudhuri, S., V. Fontanes, B. Barat, and A. Dasgupta. 2009. Activation of ribosomal RNA transcription by hepatitis C virus involves upstream binding factor phosphorylation via induction of cyclin D1. *Cancer Res* 69:2057-64.
- Rijnbrand, R., P.J. Bredenbeek, P.C. Haasnoot, J.S. Kieft, W.J. Spaan, and S.M. Lemon. 2001. The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *Rna* 7:585-97.
- Rijnbrand, R., P. Bredenbeek, T. van der Straaten, L. Whetter, G. Inchauspe, S. Lemon, and W. Spaan. 1995. Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett* 365:115-9.

- Rivas-Estilla, A.M., Y. Svitkin, M. Lopez Lastra, M. Hatzoglou, A. Sherker, and A.E. Koromilas. 2002. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* 76:10637-53.
- Robert, F., L.D. Kapp, S.N. Khan, M.G. Acker, S. Kolitz, S. Kazemi, R.J. Kaufman, W.C. Merrick, A.E. Koromilas, J.R. Lorsch, and J. Pelletier. 2006. Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability. *Mol Biol Cell* 17:4632-44.
- Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, H. Drobecq, F. Le Naour, S. Charrin, S. Levy, E. Rubinstein, J. Dubuisson, and L. Cocquerel. 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* 3:e1866.
- Roque-Afonso, A.M., D. Ducoulombier, G. Di Liberto, R. Kara, M. Gigou, E. Dussaix, D. Samuel, and C. Feray. 2005. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 79:6349-57.
- Roque Afonso, A.M., J. Jiang, F. Penin, C. Tareau, D. Samuel, M.A. Petit, H. Bismuth, E. Dussaix, and C. Feray. 1999. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 73:9213-21.
- Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448:83-6.
- Ruggieri, A., T. Harada, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1997. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 229:68-76.
- Saito, T., D.M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano, and M. Gale, Jr. 2008. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454:523-7.
- Saiz, J.C., S. Lopez de Quinto, N. Ibarrola, F.X. Lopez-Labrador, J.M. Sanchez-Tapias, J. Rodes, and E. Martinez-Salas. 1999. Internal initiation of translation efficiency in different hepatitis C genotypes isolated from interferon treated patients. *Arch Virol* 144:215-29.
- Sarfraz, S., S. Hamid, A. Siddiqui, S. Hussain, S. Pervez, and G. Alexander. 2008. Altered expression of cell cycle and apoptotic proteins in chronic hepatitis C virus infection. *BMC Microbiol* 8:133.
- Sarobe, P., J.J. Lasarte, A. Zabaleta, L. Arribillaga, A. Arina, I. Melero, F. Borrás-Cuesta, and J. Prieto. 2003. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol* 77:10862-71.
- Sarrazin, C., and S. Zeuzem. 2010. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138:447-62.
- Saunier, B., M. Triyatni, L. Ulianich, P. Maruvada, P. Yen, and L.D. Kohn. 2003. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 77:546-59.
- Sauter, D., K. Himmelsbach, M. Kriegs, M. Carvajal Yepes, and E. Hildt. 2009. Localization determines function: N-terminally truncated NS5A fragments accumulate in the nucleus and impair HCV replication. *J Hepatol* 50:861-71.
- Schregel, V., S. Jacobi, F. Penin, and N. Tautz. 2009. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5342-7.
- Schwer, B., S. Ren, T. Pietschmann, J. Kartenbeck, K. Kaehlcke, R. Bartenschlager, T.S. Yen, and M. Ott. 2004. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol* 78:7958-68.
- Shi, S.T., S.J. Polyak, H. Tu, D.R. Taylor, D.R. Gretch, and M.M. Lai. 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 292:198-210.

- Shim, J.H., G. Larson, J.Z. Wu, and Z. Hong. 2002. Selection of 3'-template bases and initiating nucleotides by hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 76:7030-9.
- 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* 78:2738-48.
- Shimazaki, T., M. Honda, S. Kaneko, and K. Kobayashi. 2002. Inhibition of internal ribosomal entry site-directed translation of HCV by recombinant IFN-alpha correlates with a reduced La protein. *Hepatology* 35:199-208.
- Shimizu, Y.K., H. Igarashi, T. Kanematu, K. Fujiwara, D.C. Wong, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1997. Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol* 71:5769-73.
- Shimoike, T., S.A. McKenna, D.A. Lindhout, and J.D. Puglisi. 2009. Translational insensitivity to potent activation of PKR by HCV IRES RNA. *Antiviral Res* 83:228-37.
- Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1999. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 73:9718-25.
- Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, K.L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R.H. Plasterk, and A. Fire. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-76.
- Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I.T. Shin, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-73.
- Smith, M.W., Z.N. Yue, M.J. Korth, H.A. Do, L. Boix, N. Fausto, J. Bruix, R.L. Carithers, Jr., and M.G. Katze. 2003. Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology* 38:1458-67.
- Soler, M., M. Pellerin, C.E. Malnou, D. Dhumeaux, K.M. Kean, and J.M. Pawlotsky. 2002. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 298:160-73.
- Sonenberg, N., and A.C. Gingras. 1998. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 10:268-75.
- Song, Y., P. Friebe, E. Tzima, C. Junemann, R. Bartenschlager, and M. Niepmann. 2006. The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 80:11579-88.
- Spahn, C.M., J.S. Kieft, R.A. Grassucci, P.A. Penczek, K. Zhou, J.A. Doudna, and J. Frank. 2001. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291:1959-62.
- Spangberg, K., L. Wiklund, and S. Schwartz. 2000. HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities. *Virology* 274:378-90.
- Spangberg, K., L. Goobar-Larsson, M. Wahren-Herlenius, and S. Schwartz. 1999. The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region. *J Hum Virol* 2:296-307.

- Spriggs, K.A., M. Stoneley, M. Bushell, and A.E. Willis. 2008. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100:27-38.
- Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A.H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 3:e103.
- Stone, M., S. Jia, W.D. Heo, T. Meyer, and K.V. Konan. 2007. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* 81:4551-63.
- Su, A.I., J.P. Pezacki, L. Wodicka, A.D. Brideau, L. Supekova, R. Thimme, S. Wieland, J. Bukh, R.H. Purcell, P.G. Schultz, and F.V. Chisari. 2002. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15669-74.
- Sumpter, R., Jr., Y.M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S.M. Lemon, and M. Gale, Jr. 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79:2689-99.
- Sung, V.M., S. Shimodaira, A.L. Doughty, G.R. Picchio, H. Can, T.S. Yen, K.L. Lindsay, A.M. Levine, and M.M. Lai. 2003. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* 77:2134-46.
- Suzuki, R., Y. Matsuura, T. Suzuki, A. Ando, J. Chiba, S. Harada, I. Saito, and T. Miyamura. 1995. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol* 76 (Pt 1):53-61.
- 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* 70:8477-84.
- Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, L. Deng, R. Hidajat, M. Tanaka, H. Mizuta, and H. Hotta. 2004. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol* 48:591-8.
- Tallet-Lopez, B., L. Aldaz-Carroll, S. Chabas, E. Dausse, C. Staedel, and J.J. Toulme. 2003. Antisense oligonucleotides targeted to the domain III_d of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation. *Nucleic Acids Res* 31:734-42.
- Tan, S.L., H. Nakao, Y. He, S. Vijaysri, P. Neddermann, B.L. Jacobs, B.J. Mayer, and M.G. Katze. 1999. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5533-8.
- Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, and K. Shimotohno. 1995. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* 215:744-9.
- Targett-Adams, P., G. Hope, S. Boulant, and J. McLauchlan. 2008. Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* 283:16850-9.
- Taylor, D.R., S.T. Shi, P.R. Romano, G.N. Barber, and M.M. Lai. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285:107-10.
- Tellinghuisen, T.L., K.L. Foss, and J. Treadaway. 2008. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4:e1000032.
- Thelu, M.A., E. Drouet, M.N. Hilleret, and J.P. Zarski. 2004. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol* 72:396-405.

- Thelu, M.A., V. Leroy, M. Ramzan, T. Dufeu-Duchesne, P. Marche, and J.P. Zarski. 2007. IRES complexity before IFN-alpha treatment and evolution of the viral load at the early stage of treatment in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 79:242-53.
- Timm, J., G.M. Lauer, D.G. Kavanagh, I. Sheridan, A.Y. Kim, M. Lucas, T. Pillay, K. Ouchi, L.L. Reyor, J. Schulze zur Wiesch, R.T. Gandhi, R.T. Chung, N. Bhardwaj, P. Klenerman, B.D. Walker, and T.M. Allen. 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200:1593-604.
- Tingting, P., F. Caiyun, Y. Zhigang, Y. Pengyuan, and Y. Zhenghong. 2006. Subproteomic analysis of the cellular proteins associated with the 3' untranslated region of the hepatitis C virus genome in human liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 347:683-91.
- Tischendorf, J.J., C. Beger, M. Korf, M.P. Manns, and M. Kruger. 2004. Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) inhibits Hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation, but does not affect HCV replication. *Arch Virol* 149:1955-70.
- Tsuchihara, K., T. Tanaka, M. Hijikata, S. Kuge, H. Toyoda, A. Nomoto, N. Yamamoto, and K. Shimotohno. 1997. Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J Virol* 71:6720-6.
- Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66:1476-83.
- Tu, H., L. Gao, S.T. Shi, D.R. Taylor, T. Yang, A.K. Mircheff, Y. Wen, A.E. Gorbalenya, S.B. Hwang, and M.M. Lai. 1999. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263:30-41.
- Vagner, S., B. Galy, and S. Pyronnet. 2001. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2:893-8.
- Varnholt, H., U. Drebber, F. Schulze, I. Wedemeyer, P. Schirmacher, H.P. Dienes, and M. Odenthal. 2008. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47:1223-32.
- Vassilaki, N., P. Friebe, P. Meuleman, S. Kallis, A. Kaul, G. Paranhos-Baccala, G. Leroux-Roels, P. Mavromara, and R. Bartenschlager. 2008. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* 82:11503-15.
- Vasudevan, S., and J.A. Steitz. 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128:1105-18.
- Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318:1931-4.
- Venkatesan, A., S. Das, and A. Dasgupta. 1999. Structure and function of a small RNA that selectively inhibits internal ribosome entry site-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 27:562-72.
- Vyas, J., A. Elia, and M.J. Clemens. 2003. Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *Rna* 9:858-70.
- Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-6.
- Walewski, J.L., T.R. Keller, D.D. Stump, and A.D. Branch. 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna* 7:710-21.

- Walters, K.A., A.J. Syder, S.L. Lederer, D.L. Diamond, B. Paeper, C.M. Rice, and M.G. Katze. 2009. Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS Pathog* 5:e1000269.
- Wang, A.G., D.S. Lee, H.B. Moon, J.M. Kim, K.H. Cho, S.H. Choi, H.L. Ha, Y.H. Han, D.G. Kim, S.B. Hwang, and D.Y. Yu. 2009. Non-structural 5A protein of hepatitis C virus induces a range of liver pathology in transgenic mice. *J Pathol* 219:253-62.
- Wang, C., S.Y. Le, N. Ali, and A. Siddiqui. 1995. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *Rna* 1:526-37.
- Wang, C., J. Pflugheber, R. Sumpter, Jr., D.L. Sodora, D. Hui, G.C. Sen, and M. Gale, Jr. 2003. Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 77:3898-912.
- Wang, H., X.T. Shen, R. Ye, S.Y. Lan, L. Xiang, and Z.H. Yuan. 2005. Roles of the polypyrimidine tract and 3' noncoding region of hepatitis C virus RNA in the internal ribosome entry site-mediated translation. *Arch Virol* 150:1085-99.
- Wang, T.H., R.C. Rijnbrand, and S.M. Lemon. 2000. Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 74:11347-58.
- Wang, Y., N. Kato, A. Jazag, N. Dharel, M. Otsuka, H. Taniguchi, T. Kawabe, and M. Omata. 2006. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* 130:883-92.
- Waris, G., K.D. Tardif, and A. Siddiqui. 2002. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem Pharmacol* 64:1425-30.
- Weinlich, S., S. Huttelmaier, A. Schierhorn, S.E. Behrens, A. Ostareck-Lederer, and D.H. Ostareck. 2009. IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *Rna* 15:1528-42.
- Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34:7-11.
- Welch, P.J., S. Yei, and J.R. Barber. 1998. Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol* 10:163-71.
- Wilkinson, J., M. Radkowski, and T. Laskus. 2009. Hepatitis C virus neuroinvasion: identification of infected cells. *J Virol* 83:1312-9.
- Wilson, J.A., and C.D. Richardson. 2005. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol* 79:7050-8.
- Wolk, B., B. Buchele, D. Moradpour, and C.M. Rice. 2008. A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 82:10519-31.
- Yamamoto, C., N. Enomoto, M. Kurosaki, S.H. Yu, J. Tazawa, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato. 1997. Nucleotide sequence variations in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus-1b: no association with efficacy of interferon therapy or serum HCV-RNA levels. *Hepatology* 26:1616-20.
- Yang, X.J., J. Liu, L. Ye, Q.J. Liao, J.G. Wu, J.R. Gao, Y.L. She, Z.H. Wu, and L.B. Ye. 2006. HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression. *Virus Res* 121:134-43.
- Yang, Y.H., S. Dudoit, P. Luu, D.M. Lin, V. Peng, J. Ngai, and T.P. Speed. 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30:e15.

- Yasmeen, A., S. Hamid, F.N. Granath, H. Lindstrom, R.M. Elliott, A.A. Siddiqui, and M.A. Persson. 2006. Correlation between translation efficiency and outcome of combination therapy in chronic hepatitis C genotype 3. *J Viral Hepat* 13:87-95.
- Yasui, K., T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S.I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J.R. Wands, and M. Kohara. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72:6048-55.
- Yi, M., and S.M. Lemon. 2003. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77:3557-68.
- Yi, M., R.A. Villanueva, D.L. Thomas, T. Wakita, and S.M. Lemon. 2006. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2310-5.
- Yokota, T., N. Sakamoto, N. Enomoto, Y. Tanabe, M. Miyagishi, S. Maekawa, L. Yi, M. Kurosaki, K. Taira, M. Watanabe, and H. Mizusawa. 2003. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4:602-8.
- You, S., and C.M. Rice. 2008. 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *J Virol* 82:184-95.
- Yu, K.L., S.I. Jang, and J.C. You. 2009. Identification of in vivo interaction between Hepatitis C Virus core protein and 5' and 3' UTR RNA. *Virus Res* 145:285-92.
- Zeuzem, S. 2001. The kinetics of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 5:917-30.
- Zhang, C., Z. Cai, Y.C. Kim, R. Kumar, F. Yuan, P.Y. Shi, C. Kao, and G. Luo. 2005. Stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 79:8687-97.
- Zhang, J., O. Yamada, H. Yoshida, T. Iwai, and H. Araki. 2002. Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* 293:141-50.
- Zhang, Z., D. Harris, and V.N. Pandey. 2008. The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus. *J Virol* 82:5761-73.
- Zibert, A., W. Kraas, H. Meisel, G. Jung, and M. Roggendorf. 1997. Epitope mapping of antibodies directed against hypervariable region 1 in acute self-limiting and chronic infections due to hepatitis C virus. *J Virol* 71:4123-7.
- Zignego, A.L., and A. Craxi. 2008. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 12:611-36, ix.
- Zignego, A.L., C. Giannini, M. Monti, and L. Gragnani. 2007. Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. *Dig Liver Dis* 39 Suppl 1:S38-45.

REGULATIONS TRADUCTIONNELLES LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC)

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un problème majeur de santé publique, il infecte de façon chronique 3% de la population mondiale et cause cirrhose et cancer du foie. Il n'existe pas de vaccin et son traitement est inactif chez près de la moitié des patients.

Le génome du VHC est un ARN positif simple brin, présentant une grande variabilité génétique. Sa traduction est initiée par un IRES (Internal Ribosome Entry Site), permettant de recruter le ribosome sans l'aide de tous les facteurs classiques d'initiation de la traduction. Cette région possède des structures secondaires et sa séquence est conservée parmi les génotypes viraux. Elle est donc une cible thérapeutique potentielle. La traduction virale est modulée par des facteurs viraux et cellulaires, dont les modalités ne pas encore bien connues.

A partir de variants naturels de l'IRES présentant des efficacités traductionnelles et des tropismes cellulaires différents, nous avons cherché à comprendre quels sont les déterminants (séquence virale et facteurs cellulaires agissant en trans (les ITAF, IRES Trans Acting Factors)) conditionnant l'efficacité de l'IRES dans l'hépatocyte.

Nous avons parallèlement analysé les modifications traductionnelles des ARN cellulaires lors de l'infection virale dans le modèle des cellules Huh-7 infectées par la souche JFH-1 en comparant le transcriptome traduit, liés aux ribosomes (polysome) et le transcriptome libre. Nous avons montré la régulation traductionnelle de gènes régulant le cytosquelette, la traduction, le métabolisme mitochondrial et le cycle cellulaire. Certaines de ces régulations pourraient impliquer des microARN cellulaires.

Mots clés : Virus de l'Hépatite C (VHC), Site d'entrée interne du ribosome (IRES), Traduction protéique, Polysome, Transcriptome

TRANSLATIONAL REGULATIONS DURING HEPATITIS C VIRUS (HCV) INFECTION

The hepatitis C virus (HCV) infection is a major world health problem, since 3% of the world's population is chronically infected and it can lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. There is currently no vaccine against this virus and the treatment is inactive for about half of the patients.

HCV is a positive sense single strand RNA virus with highly sequence variability. Its translation initiation occurs through an internal ribosome entry site (IRES) in its 5' untranslated region, allowing the ribosome recruitment without the need of all the canonical translation initiation factors. This region is highly structured and is well conserved amongst the viral genotypes. That makes the IRES an attractive target for future therapies. The IRES function is modulated by viral and cellular factors, but the mechanisms of this regulation are not well understood.

With the study of natural IRES variants harboring different translational efficiencies and cellular tropisms, we have tried to understand some factors (the viral sequence and the cellular proteins acting in trans (ITAFs, IRES Trans Acting Factors)) conditioning the efficiency of HCV translation in hepatocytes.

We have also studied the translational modifications of the cellular genes during HCV infection in Huh7 cells harbouring replication of the JFH-1 strain, by comparing the translated transcriptome, bound to the ribosomes (polysome) and the free transcriptome. We have shown that the viral infection modulates the translation of genes belonging to specific functional categories (cytoskeleton, translation, mitochondrial metabolism, cell cycle regulation). Some of these regulations could occur via microRNA modulation.

Key Words : Hepatitis C Virus (HCV), Internal Ribosome Entry Site (IRES), Translation, Polysome, Transcriptome

Hélène COLMAN

U948, CHU Hôtel-Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44000 NANTES