



HAL
open science

Phosphatidylinositol 4 -Kinases de type III hépatiques : implication au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C et lien avec le carcinome hépatocellulaire

Adeodat Ilboudo

► **To cite this version:**

Adeodat Ilboudo. Phosphatidylinositol 4 -Kinases de type III hépatiques : implication au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C et lien avec le carcinome hépatocellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1B006 . tel-00950335

HAL Id: tel-00950335

<https://theses.hal.science/tel-00950335>

Submitted on 21 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie et Santé

Ecole doctorale VAS, Vie-Agro-Santé

présentée par

Wendkuuni Adeodat ILBOUDO

Préparée à l'unité Inserm U1085-IRSET
Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail
Faculté de Pharmacie de l'Université de Rennes 1

**Phosphatidylinositol
4-kinases de type III
hépatiques :
implication au cours
de l'infection par le
virus de l'hépatite C
et lien avec le
carcinome
hépatocellulaire**

**Thèse soutenue à Rennes
le 8 Juillet 2013**

devant le jury composé de :

Gilles DUVERLIE

Pr, Université de Picardie / *rapporteur*

Yves ROUILLE

DR, Institut de Biologie de Lille / *rapporteur*

Philippe CHOUTEAU

MCU, Université de Créteil / *examineur*

Anne GOUGEON

PU-PH, Université de Rennes 1 / *examineur*

Christian MICHELET

PU-PH, Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

Jacques LE SEYEC

CR, Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Remerciements

Voilà bientôt neuf années que je suis partie de mon Burkina Faso natal pour la France, à la recherche du savoir. A mi-chemin de cette quête inachevée mais bien avancée, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont fait partie de l'aventure et ont contribué à mon enrichissement personnel et professionnel.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'EA SeRAIC devenue IRSET en cours de thèse. Je voudrais donc remercier le Dr Dominique Lagadic de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie le Pr Christian Michelet d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour votre disponibilité.

Je remercie le Dr Yves Rouillé et le Pr Gilles Duverlie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir donné de leur temps pour juger ce travail. Je tiens également à remercier le Dr Philippe Chouteau et le Pr Anne Gougeon d'avoir accepté de participer à ce jury et d'apporter leurs critiques à ce travail.

Je souhaite également remercier les chercheurs qui ont pris part à mes différents comités de thèse ; les Dr Christian Jaulin, Pascal Loyer et Nicolas Eterradosi. Merci d'avoir toujours pris le temps pour nos rencontres. Merci pour vos conseils avisés et vos encouragements. Je remercie le Dr Eterradosi d'avoir accepté d'être mon tuteur de thèse.

Les prochains remerciements sont à l'égard du Dr Jacques Le Seyec, mon directeur scientifique. Merci de m'avoir permis d'effectuer cette thèse à tes côtés. Merci pour ta confiance et pour la chance que tu m'as donnée. Merci de m'avoir toujours impliquée dans l'organisation de notre duo. Ta disponibilité, ton écoute, ton soutien, tes conseils et ton encadrement m'ont été précieux tout au long de cette thèse. Et merci aussi de m'avoir toujours encouragée à développer mes arguments, même si tu n'étais pas souvent convaincu au final ! Ton esprit critique et ton exigence scientifique ont été d'une puissance redoutable. J'ai énormément appris à tes côtés. Une sagesse africaine dit ceci : « Si tu manges le fruit d'un grand arbre, n'oublies pas de remercier le vent ». Alors, merci de m'avoir aidé à goûter au fruit de ce grand arbre qu'est la recherche.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'IRSET Campus Villejean, pour leur sympathie. Merci également aux membres de mon équipe. Merci à Michel Samson, notre coordonnateur pour ses conseils et nos discussions. Merci à Claire Picquet-Pellorce et Philippe Gripon. Je voudrais particulièrement remercier Annie, Valentine, Laurence, Nicolas Vu, Michel Rauch pour l'ambiance excellente et animée qui régnait toujours au Bâtiment 8. Annie et Valentine : les mots me manquent

pour vous témoigner ma reconnaissance. Merci pour votre soutien et votre compréhension. Merci pour votre bonne humeur, et d'avoir accepté que je vous attribue des surnoms. Je voudrais aussi remercier en particulier Fidaa, ma colocataire de bureau. A nos délires ! Ce fut un plaisir de partager le même bureau que toi, même si on ne s'y est pas vu très souvent, finalement ! Je n'oublie pas ma chère Octavie. Merci pour tout, ta gentillesse, ta bonne humeur, et nos idées pas toujours très logiques, mais tellement drôles et toujours spontanées. Vive le chocolat !

J'ai aussi une pensée pour tous ceux et celles qui ont débuté cette thèse en même temps que moi, ainsi que tous les doctorants actuels. Une pensée spéciale à Aurore, l'acolyte de Fidaa, dans leurs « coups bas » contre moi !

J'ai également une pensée pour trois anciennes doctorantes du laboratoire. Merci à toi Maud, de m'avoir épaulé pendant la première année de ma thèse. Merci pour tes conseils, ta bonne humeur, et toutes les petites douceurs d'Allemagne.... Merci également à Sandrine et Julie pour leur sympathie et leur gentillesse.

Je voudrais aussi remercier Marine, Valérie, Karin et Laure. Merci les filles, pour votre gentillesse et votre soutien.

Brigitte, merci d'avoir partagé avec moi cette affection pour l'Afrique. Merci pour ta gentillesse, ta générosité, et ta sympathie. Ce fut un plaisir de te côtoyer au quotidien, ma « Birzit ».

Merci à la Dream Team de Dan'Seraic : Hari, Brigitte, Béatrice, Ariane et Sandrine.

A mes colocataires du Batiment 8 : David Gilot, Nicolas Mouchet, Amine Bouaffia, ainsi que toutes les filles de l'U991 : Tatiana, Camille, Julie Pajaud, Florence, Karima, Jacinthe.... Merci à toutes les filles, avec qui j'ai partagé des délires sportifs. Merci en particulier à Carine Lambert. Grâce à toi, « j'aime le sport » et ce n'est pas rien, tu peux me croire ! Je pense aussi à Nadia, Mathilde et Julie Massard, avec qui j'ai partagé une année de « Too-too you too » en ta compagnie ! Ce fut...génial. Une mention spéciale à Sihem, pour son amitié. Nous avons partagé bien plus de choses que de simples galères de thèse.

Je remercie aussi mes co-équipières de TP, Latifa Bousarghin et Sandrine Le Gall-David. Merci de m'avoir initiée à l'enseignement, merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, votre aide, et vos encouragements. Merci également à André Lejeune. Ce fut une joie de travailler avec vous.

Un merci particulier à Ariane et Audrey.

Mon séjour en France n'aurait certainement pas eu la même saveur sans ma seconde famille, ma famille « Nassara » : Jézéquel, Adam-Bacchini, et Versang-Zlatoper. Un merci tout particulier à mes deux mamans « Nassara », Krystine et Patricia. Merci pour votre affection. Sans vous, mes premières années dans ce pays n'auraient jamais été aussi sereines, même loin des miens. Benjamin, mon petit frère « Nassara » : tu n'as jamais presque rien compris à ce que je te racontais sur mon travail, mais cela ne t'a pas empêché d'être fier de moi ! Merci.

Je tiens à remercier du fond du cœur toutes les personnes formidables que j'ai pu côtoyer au cours de ces neuf années, et qui ont contribué, à leur manière, à rendre mon séjour agréable. Je vous attends au pays des hommes intègres !

Merci la Bretagne, vive les crêpes, vive le cidre !

Pour terminer ces remerciements, je pense particulièrement aux miens :

-m'baaba ramba : Y bark wousgo. Wend maag yamba, m'paama baangré. Y barka, y namsga yiinga. Wend na kit ti y rii a yoondo.

-maam yopa : a Sompasaté, a LouiPatrick nèe Andy Joël. Mam sounra noomamè, ti mam yaa yamb kièèma.

-M' moonga: Fo sakam ti mam karm yiiga. Dar fan ka yi nanayé. La nonglom yiida boum faan. Wend na pasd nonglom, la ning barka. Mam noonga fo.

Je ne saurais terminer sans remercier « M'ba Wendé » pour la vie.

Liste des figures

- Figure 1** : Estimation de la prévalence globale de l'infection par le VHC en 2010.
- Figure 2** : Evolution de l'infection par le VHC.
- Figure 3** : Morphologie du virion VHC.
- Figure 4** : Représentation de la structure primaire et secondaire de la région 5'NC.
- Figure 5** : Représentation de la structure primaire et secondaire de la région 3'NC.
- Figure 6** : Organisation génétique du VHC et maturation des protéines virales.
- Figure 7** : Structure et association à la membrane des protéines du VHC.
- Figure 8** : Production des pseudoparticules de VHC.
- Figure 9** : Représentation schématique du système de réplicon.
- Figure 10** : Représentation schématique du modèle VHCcc.
- Figure 11** : Représentation schématique du LDL-R.
- Figure 12** : Représentation schématique de CD81.
- Figure 13** : Représentation schématique de SRBI.
- Figure 14** : Représentation schématique de la Claudine-1.
- Figure 15** : Représentation schématique de l'Occludine.
- Figure 16** : Potentiels rôles fonctionnels de NPC1L1, de l'EGF-R et de l'EphA2 dans l'entrée du VHC.
- Figure 17** : Représentation schématique du rôle de l'IRES du VHC dans l'assemblage des complexes ribosomiques et l'initiation de la traduction.
- Figure 18** : Assemblage des particules virales.
- Figure 19** : Cycle biologique du VHC, zone d'intervention et classes d'inhibiteurs.
- Figure 20** : Cycle biologique du VHC et cibles des plus puissants inhibiteurs naturels.
- Figure 21** : Voies métaboliques de la production des phosphoinositides.
- Figure 22** : Distribution cellulaire des PI4Ks.
- Figure 23** : Représentation schématique des deux isoformes de PI4KIII α .
- Figure 24** : Distribution intracellulaire des PI4Ks et des effecteurs de PI4P dans les cellules de mammifères.
- Figure 25** : Diagramme de l'appareil de Golgi.
- Figure 26** : Régulation Mitogène dépendante de Sac1 et signalisation de PI4P à l'appareil de Golgi.
- Figure 27** : Vue d'ensemble des différents modes de recrutement des PI4KIII α au niveau des complexes de réplication du VHC, des entérovirus et du Virus Aichi.
- Figure 28** : PI4KIII α est un composant du complexe de réplication de l'ARN du VHC.
- Figure 29** : Carcinome hépatocellulaire de Grade 1 à 4.

Figure 30 : Immunohistochimie sur les tissus du foie congelés provenant d'un patient non infecté par le VHC et d'un patient infecté chroniquement par le VHC.

Figure 31 : Représentation schématique du plasmide codant pour le gène *PI4KIII α WT*.

Figure 32 : Représentation schématique du plasmide codant pour le gène *PI4KIII β WT*.

Figure 33 : Principe de production des lentivirus-shRNA.

Figure 34 : Détermination des IC₅₀ d'inhibiteurs des PI4KIII α et analyse de leur effet sur la viabilité des hépatocytes humains primaires et leur susceptibilité à l'infection par le VHCpp.

Figure 35 : Efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIII α et PI4KIII β dans les Huh7.5.1 par transduction lentivirale.

Figure 36 : Effet de l'inhibition de PI4KIII α sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires.

Figure 37 : Effet de l'inhibition de PI4KIII α sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1.

Figure 38 : Test de restauration de l'infection par le VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires partiellement dépourvus de PI4KIII α endogène.

Figure 39 : Efficacité de la surexpression protéique de PI4KIII α par différentes constructions lentivirales.

Figure 40 : Test de restauration de l'infection par le VHCcc de génotype 2a (J6/JFH1) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1 partiellement dépourvues de PI4KIII α .

Figure 41 : Test de restauration de l'infection par le VHCcc de génotype 2a (J6/JFH1) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1 partiellement dépourvues de PI4KIII α endogène.

Figure 42 : Test de restauration de l'infection par le VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires partiellement dépourvus de PI4KIII α endogène.

Figure 43 : Effet de l'inhibition de PI4KIII β sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires.

Figure 44 : Effet de l'inhibition de PI4KIII β sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1.

Figure 45: Test de restauration de l'infection par du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires partiellement dépourvus de PI4KIII β endogène.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales combinaisons thérapeutiques actuellement en cours.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des PI4KIII.

Tableau 3 : Classification d'Edmonson-Steiner.

Tableau 4 : Séquences des shRNA ciblant PI4KIII α .

Tableau 5 : Séquences des shRNA ciblant PI4KIII β .

Tableau 6 : Séquences des oligonucléotides utilisés.

Tableau 7 : Gamme des IC₅₀ issues de différentes études

Liste des principales abréviations

AAD : Antiviraux à Action Directe
ADN: acide désoxyribonucléique
ARN: acide ribonucléique
ARNi: ARN interférence

CD81: *cluster of differentiation 81*
CERT: *ceramide-transfert protein*
CHC: Carcinome Hépatocellulaire
CMV : Cytomégalovirus

DC-SIGN: *dendritic cell-specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*

EC₅₀ : *half maximal effective concentration*
ECMV: virus de l'encéphalo-myocardite
EGCG : Epigallocatechine-3-gallate
EGF-R : *Epidermal Growth Factor-Receptor*, récepteur au facteur de croissance épithéliale

FAPP : *phosphatidylinositol Four-phosphate-AdaPtor Protein*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*, facteur de croissance des fibroblastes

GAG: glycosaminoglycane
GFP: protéine fluorescente verte
GOLPH3 : *Golgi Phosphoprotein 3*

HDL: lipoprotéine de forte densité

IC₅₀: *half maximal inhibitory concentration*
IFN : interféron
IGF : *Insulin-like Growth Factor*
INVS : Institut National de Veille Sanitaire
IRES : *Internal Ribosome Entry Site*, site interne d'entrée des ribosomes

JFH1 : clone 1 du VHC issu d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante

kDa: kilo Dalton

LDL: lipoprotéine de faible densité
LDL-R : récepteur aux lipoprotéines de faible densité
LKU: *Lipid Kinase Unique*
L-SIGN : *liver-specific ICAM3-Grabbing non-integrin*
LVP : lipoviroparticule

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*
MLV : virus de la leucémie murine
MOI : *Multiplicity Of Infection*, Multiplicité d'infection

NC : Non Codante
NeoR : gène de la néomycine phosphotransférase
NLS : signal de localisation nucléaire
NPC1L1 : *Niemann-Pick C1-Like 1*
NS : Non Structurale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OSBP: *OxySterol/cholesterol Binding Protein*

PH: *Plekstrin Homology*
PI : Phosphoinositide
PIK: Phosphatidylinositol kinase
PIP: Phosphatidylinositol phosphate
PIPK: Phosphatidylinositol phosphate kinase
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
PI4K: Phosphatidylinositol 4-kinase
PI4KIII: Phosphatidylinositol 4-kinase de type III
PI4P: Phosphatidylinositol 4-Phosphate
PtdIns : phosphatidylinositol

RE : Réticulum Endoplasmique
RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase
RVS : Réponse Virologique Soutenue

shRNA : *short hairpin RNA*, ARN interférent en forme d'épingle à cheveu
siRNA : petit ARN interférent
SRBI : *Scavenger Receptor class B, type 1*

TEM : *Tetraspanin Enriched Microdomains*, domaines riche en tétraspanines
TGF : *Transforming Growth Factor*

UI/mL : Unités Infectieuses/mL

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VHA : Virus de l'Hépatite A
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC : Virus de l'Hépatite C
VHCc : clone cellulaire du VHC (particules virales du VHC produites *in vitro*)
VHCpp : pseudoparticules virales du VHC
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLDL : lipoprotéine de très faible densité
VSV : Virus de la Stomatite Vésiculaire

WB : Western Blot

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Chapitre 1 : Le virus de l'hépatite C	2
I. Aspects cliniques du VHC	3
A. Découverte de l'agent pathogène.....	3
B. Epidémiologie et transmission du VHC.....	3
C. Physiopathologie de l'infection par le VHC.....	4
II. Biologie du VHC	6
A. Classification taxonomique et variabilité génétique du VHC.....	6
B. Morphologie du virion.....	8
C. Génome viral.....	9
1. Régions non codantes.....	9
2. Région codante.....	11
a) Protéines structurales.....	13
➤ Protéine de capsid C.....	13
➤ Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	14
b) Protéine p7.....	16
c) Protéines non structurales.....	16
➤ NS2.....	16
➤ NS3 et NS4A.....	17
➤ NS4B.....	17
➤ NS5A.....	18
➤ NS5B.....	19
III. Modèles d'étude <i>in vitro</i> de la biologie du VHC	19
A. Modèle des pseudoparticules du VHC.....	20
B. Modèle du réplicon du VHC.....	21
C. Modèle du clone cellulaire du VHC.....	23
IV. Cycle viral du VHC	25
A. Tropisme cellulaire.....	25
B. Mécanismes d'entrée.....	26
1. Interaction avec des partenaires cellulaires de surface.....	26
a) Les facteurs d'attachement.....	27
➤ Glycosaminoglycanes.....	27
➤ Lectines de type C.....	27
➤ Récepteur des LDL.....	27
b) Les récepteurs.....	29
➤ CD81.....	29
➤ SRBI.....	30
➤ Claudine-1.....	32
➤ Occludine.....	33
➤ D'autres récepteurs candidats : EGF-R, EphA2 et NPC1L1.....	34
2. Internalisation du virus et fusion entre membranes virales et cellulaires.....	37
C. Traduction du génome viral et clivage de la polyprotéine.....	37
D. Réplication de l'ARN viral, assemblage et sécrétion des néovirus.....	38

Chapitre 2 : Les stratégies thérapeutiques	41
I. Traitements actuels	42
II. Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques	43
A. Les nouveaux interférons	43
B. Les alternatives à la ribavirine.....	44
C. Les inhibiteurs spécifiques du VHC.....	44
1. Les inhibiteurs de la protéase virale NS3/4A	45
2. Les inhibiteurs de la phosphoprotéine NS5A.....	46
3. Les inhibiteurs de la polymérase virale NS5B.....	46
III. Les combinaisons thérapeutiques	49
IV. Vers des composés naturels anti-VHC ?	53
A. Les flavonoïdes.....	54
B. Les lignanes.....	55
Chapitre 3 : Le métabolisme des phosphoinositides	58
I. Les phosphatidylinositol kinases mammaliennes	61
A. Les PI 3-Kinases	61
1. Les PI3Ks de la classe I.....	62
2. Les PI3Ks de la classe II.....	62
3. Les PI3Ks de la classe III.....	62
B. Les PIP Kinases.....	63
1. Les PIP 4-kinases	63
2. Les PIP 5-kinases	63
C. Les PI 4-Kinases	63
1. Les PI 4-kinases de type II.....	64
2. Les PI 4-kinases de type III.....	65
a) PI4KIII α	66
b) PI4KIII β	68
II. Le Phosphatidylinositol 4-phosphate	70
A. Les protéines adaptatrices.....	72
B. Les protéines de transfert de lipides de la famille COF	72
1. CERT	73
2. OSBP.....	73
3. FAPP2	74
III. La phosphatase mammalienne SacI	76
IV. PI4KIIIβ et virus pathogènes	78
V. PI4KIIs, PI4Ps et VHC	80

Chapitre 4 : Carcinome hépatocellulaire, PI4Ks et cancers	85
I. Le carcinome hépatocellulaire	86
A. Epidémiologie et manifestations cliniques du CHC.....	86
B. Altérations génétiques dans le CHC	88
II. PI4Ks, PI4P et cancers	90
A. PI4P et cancers	91
B. PI4KIII α dans le cancer du pancréas et dans la chimiorésistance	92
C. PI4KIII β et cancer du sein.....	93
D. PI4KII α dans la régulation de récepteurs et dans le cancer.....	93
E. PI4KII β et le carcinome hépatocellulaire	94
CADRE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	95
OUTILS EXPERIMENTAUX	97
I. Culture cellulaire	98
A. Les hépatocytes humains primaires.....	98
B. Les lignées cellulaires	98
II. Constructions plasmidiques	99
III. Production de particules virales	102
A. Pseudoparticules VHCpp.....	102
B. Particules dérivées de clone cellulaire VHCcc.....	102
C. Particules contenant les shRNA ou les gènes <i>PI4KIIIα</i> et <i>PI4KIIIβ</i> , <i>WT</i> et <i>KD</i>	102
IV. Titration des particules virales	104
V. Procédures d'infection	104
A. Protocole d'inhibition des gènes <i>PI4KIIIα</i> et <i>PI4KIIIβ</i>	104
B. Protocole de restauration de l'infection par le VHC	105
C. Analyse de l'infection	105
VI. Inhibiteurs chimiques et détermination des IC₅₀ sur <i>PI4KIIIα</i>	106
VII. Traitement des hépatocytes humains primaires avec les inhibiteurs chimiques	106
VIII. Evaluation de la cytotoxicité <i>in vitro</i>	107
IX. Extraction d'ARN et PCR quantitative	107
X. Western Blot	108
XI. Analyses statistiques	109

RESULTATS ET DISCUSSION	110
Résultat 1 : Effet d'inhibiteurs des PI4KIIIs sur l'entrée du VHC.....	111
Résultat 2 : Mise au point de la stratégie d'extinction des PI4KIIIs.....	118
Résultat 3 : Implication de PI4KIIIα dans l'entrée du VHC	122
Résultat 4 : Implication de PI4KIIIβ dans l'entrée du VHC	146
Résultat 5 : Article ; Surexpression de PI4KIIIα et carcinome hépatocellulaire	157
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164

Introduction

« Quand on ne sait pas où l'on va, qu'on sache d'où l'on vient. »

Tradition orale sérieuse

Chapitre 1 :

Le virus de l'hépatite C

I. Aspects cliniques du VHC

A. Découverte de l'agent pathogène

Avant la découverte du virus de l'hépatite C (VHC), deux agents pathogènes viraux étaient connus pour causer une hépatite : le virus de l'hépatite A (VHA) et celui de l'hépatite B (VHB). Cependant, plusieurs patients atteints d'hépatite n'abritaient ni le VHA, ni le VHB. Leur pathologie a alors été désignée « hépatite non VHA-non VHB » ; elle était infectieuse et pouvait être transmise par transfusion sanguine, suggérant l'implication d'un facteur viral (Bradley & Maynard, 1986). Grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire, les efforts de recherche ont permis d'identifier un nouveau virus à ARN, rebaptisé VHC. En effet, l'équipe de Michael Houghton a découvert le virus grâce à un isolement et un séquençage partiel de son génome, ce qui a permis l'accès à de nombreuses informations sur le virus. (Choo *et al.*, 1989). Par la suite, l'identification de la séquence complète du génome du VHC a permis d'élucider son organisation génétique (Choo *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1990).

On estime aujourd'hui que 170 millions de personnes dans le monde sont chroniquement infectées par le VHC (OMS, 2010). Même deux décennies après la découverte de l'agent pathogène, aucun vaccin n'est disponible et à ce jour, tous les traitements contre le VHC ne sont que partiellement efficaces, même s'ils ont été dernièrement améliorés grâce à des antiviraux à action directe.

B. Épidémiologie et transmission du VHC

L'hépatite C est une infection pandémique et constitue un problème majeur de santé publique. Les pays industrialisés d'Amérique du Nord et d'Europe occidentale ont les taux de prévalence les plus faibles (moins de 2%), alors que le VHC infecte plus de 10% de la population en Mongolie, en Bolivie et en Égypte, ce dernier pays ayant le taux de prévalence le plus élevé (22%, Figure 1) (Lavanchy, 2011). L'utilisation de seringues contaminées dans les traitements contre la schistosomiase dans tout le pays au cours des années 1970 est considérée comme la cause d'une telle séroprévalence du VHC en Égypte (Frank *et al.*, 2000). La France a une séroprévalence de 0,84%, avec 367.055 personnes ayant des anticorps anti-VHC (INVS-CPAM, 2003-2004).

Le VHC se transmet principalement par contact avec du sang infecté. Avant le développement des méthodes systématiques de dépistage dans les années 1990, le sang contaminé des donneurs a représenté le facteur majeur de transmission (Huber *et al.*, 1996). A l'heure actuelle, la consommation de drogues injectables est devenue la principale voie de transmission du VHC dans les pays industrialisés, alors que les transfusions de sang contaminé et les injections à visée thérapeutique sont encore les modes de transmission les plus rencontrés dans les pays en voie de développement (Shepard *et al.*, 2005). Chez les enfants, la transmission mère-enfant est la plus fréquente. Bien que significative, la propagation du VHC par voie sexuelle est beaucoup moins fréquente que pour d'autres virus sexuellement transmissibles (Alter, 2007).

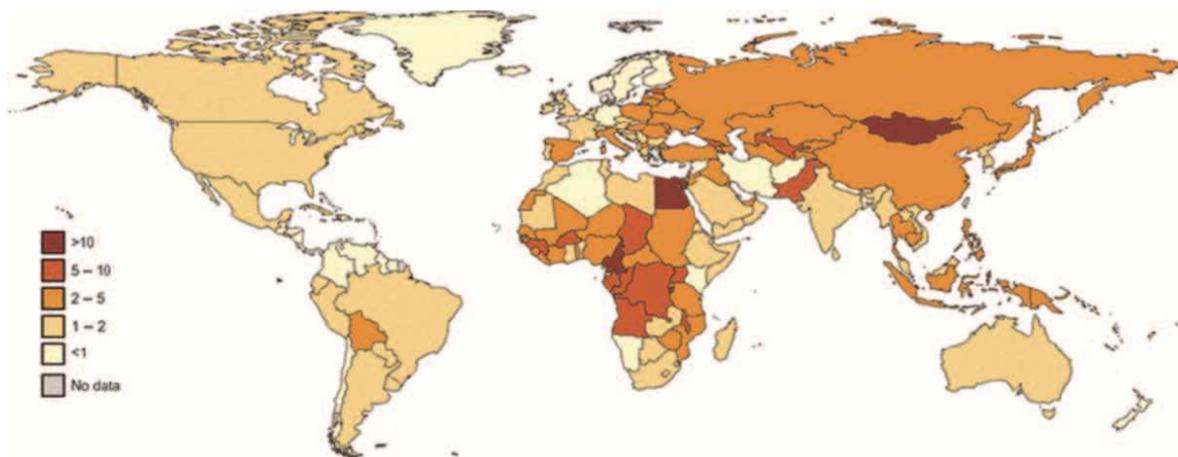


Figure 1 : Estimation de la prévalence globale de l'infection par le VHC en 2010 (% population infectée). D'après Lavanchy, 2011.

C. Physiopathologie de l'infection par le VHC

Dans la majorité des cas, l'infection aiguë par le VHC est asymptomatique, bien qu'environ 20 à 30% des patients présentant une infection aiguë puissent développer des symptômes typiques d'une hépatite tels qu'une jaunisse, 3 à 12 semaines après l'infection (Alter & Seeff, 2000). L'ARN viral peut être détecté dans le sérum des patients dans les 2 semaines suivant l'exposition au virus (Thimme *et al.*, 2001). Dans certains cas, les symptômes de l'infection aiguë peuvent être sévères et rapides. De très rares cas d'hépatite fulminante ont été rapportés (Farci *et al.*, 1996). Bien que l'infection aiguë soit spontanément guérie chez 15 à 25% des patients, dans la majorité des cas, le virus échappe à la réponse immunitaire et si l'infection

persiste plus de six mois, elle conduit à une hépatite chronique (Shimotohno, 2000). La majorité des patients chroniquement infectés développent des symptômes tels que des lésions lobulaires et une inflammation portale (Di Bisceglie, 1998). La transition vers une infection chronique est influencée par un grand nombre de facteurs tels que l'âge, le sexe, une co-infection avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ou le VHB et certains gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (Lavanchy, 2009). Environ 20% des patients chroniquement infectés développent une cirrhose du foie dans les 15 à 20 ans après l'infection (Di Bisceglie, 1998) (Figure 2).

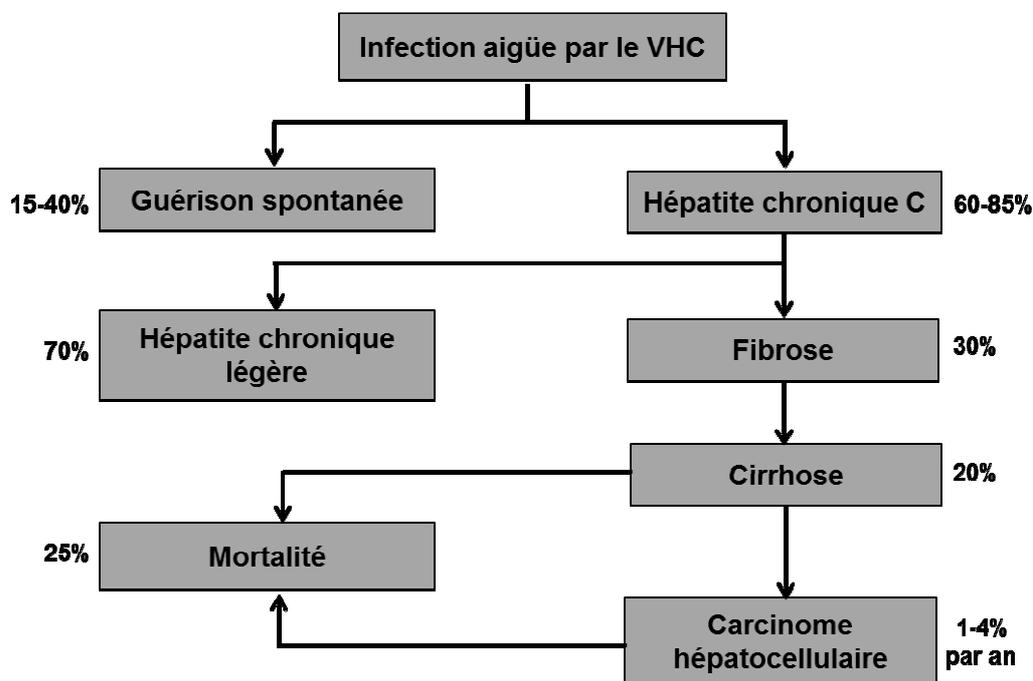


Figure 2 : Evolution de l'infection par le VHC.

On estime que chaque année, 1 à 4% des patients chroniquement infectés par le VHC développent un cancer primitif du foie ou un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Di Bisceglie, 1998; Gordon *et al.*, 1998). L'infection chronique par le VHC est devenue la principale cause de cancer primitif du foie au Japon car 80-90% des patients atteints d'un CHC sont porteurs du VHC. De plus, la modélisation des données épidémiologiques prévoit une tendance similaire en Europe (Aizawa *et al.*, 2000; El-Serag & Rudolph, 2007; Kiyosawa *et al.*, 2004). En Europe occidentale, l'infection par le VHC prévaut chez la majorité des patients atteints d'un CHC, allant de 44 à 66% en Italie, 27 à 58% en France et 60 à 75% en Espagne (El-

Serag & Rudolph, 2007). L'infection par le VHC augmenterait le risque de CHC de 17 fois par rapport aux sujets non infectés (Donato *et al.*, 2002). Le temps moyen de développement d'un CHC chez les patients infectés par le VHC est estimé à 28 ± 11 ans après l'infection (Tong *et al.*, 1995). Des données indiquent que les lésions hépatiques induites par le VHC sont responsables de la moitié des transplantations hépatiques aux Etats-Unis (Brown, 2005).

II. Biologie du VHC

A. Classification taxonomique et variabilité génétique du VHC

L'analyse d'un grand nombre de séquences de VHC partout dans le monde a permis de diviser le VHC en six génotypes qui diffèrent de 30-35% dans leur séquence nucléotidique. Chaque génotype peut être subdivisé en plusieurs sous-types, dont la variation de séquence nucléotidique est de 20-25% (Simmonds, 2004). Les génotypes et sous-types du VHC sont distribués de façon hétérogène dans le monde. Le génotype 1, suivi des génotypes 2 et 3 sont plus fréquents en Amérique du Nord et du Sud, ainsi qu'en Europe. Le génotype 4 est prédominant en Égypte, en Afrique sub-saharienne et au Moyen-Orient. Jusque très récemment, on pensait que le génotype 5 était confiné à l'Afrique du Sud, où il représente 40% de tous les génotypes (Antaki *et al.*, 2010). Cependant, quatre poches de ce génotype ont été retrouvées en France, en Espagne, en Belgique et en Syrie. Le génotype 6 quant à lui est rare et confiné au Sud-Est Asiatique, ainsi que chez les Américano- et Australo-asiatiques (Antaki *et al.*, 2010; Dev *et al.*, 2002).

L'ARN polymérase du VHC est dépourvue d'activité de relecture exonucléasique, ce qui conduit à l'introduction fréquente de mutations dans le génome viral. Comme le taux de mutation est très élevé, le VHC évolue à un rythme soutenu (Okamoto *et al.*, 1992). Ce taux élevé de mutation conduit à une variabilité considérable non seulement entre les populations virales parmi différents patients, mais aussi entre les virus chez un même patient infecté, donnant lieu à des quasi-espèces. Les quasi-espèces virales sont composées d'un mélange dynamique et complexe de variants génétiquement distincts mais intimement liés. Ces quasi-espèces confèrent une plus grande adaptabilité au VHC et peuvent avoir des implications

importantes dans la persistance virale, la réponse au traitement et la pathogénicité (Forns *et al.*, 1999; Lerat *et al.*, 2008; Lyra *et al.*, 2004).

Le VHC appartient à la famille des Flaviviridae. Les virus de cette famille sont enveloppés et leur génome est composé d'un ARN simple brin de polarité positive, linéaire et non segmenté et qui reste tout au long du cycle viral sous forme ARN. Cette famille regroupe trois genres bien établis (*Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus*), et un quatrième genre proposé (*Pegivirus*) (Stapleton *et al.*, 2011) :

(i) le genre *Flavivirus* dont la plupart des virus se répliquent chez les mammifères et les arthropodes hématophages, tiques et moustiques. Certains de ces virus, pathogènes pour l'Homme et l'animal, posent des problèmes majeurs de santé publique comme le virus de la fièvre jaune, le virus de l'encéphalite à tiques, le virus de la dengue ou encore le virus de la fièvre du Nil occidental.

(ii) le genre *Pestivirus* qui regroupe des virus infectant principalement des animaux domestiques : cochons et ruminants. Parmi ces virus, on compte le virus de la peste porcine et le virus de la diarrhée bovine.

(iii) le genre *Hepacivirus* qui est constitué du VHC et du virus GBV-B. Le GBV-B a été isolé chez un singe tamarin présentant une hépatite inexplicée. Cependant, ce virus n'est pas retrouvé chez les humains (Stapleton *et al.*, 2011). Récemment, le genre *Hepacivirus* a été élargi avec la découverte d'un virus canin homologue du VHC, nommé hépacivirus canin (HVC). C'est le premier hépacivirus non-primate mis en évidence (Burbelo *et al.*, 2012; Kapoor *et al.*, 2011). Cette même équipe a aussi identifié un nouvel hépacivirus qui infecte les souris sauvages *Peromyscus maniculatus*, rongeurs de la famille des Muridae et retrouvées en Amérique du Nord (Kapoor *et al.*, 2013).

(iv) le genre *Pegivirus* qui regroupe 3 virus nommés GBV-A, GBV-C et GBV-D, pathogènes chez le singe tamarin et la chauve-souris principalement. Le GBV-C est retrouvé chez l'humain, mais n'est pas associé à une hépatite virale (Stapleton *et al.*, 2011). Des virus appartenant à ce genre infectent aussi les rongeurs comme *Neotoma albugila*. Ce sont les Pégivirus de rongeurs (Kapoor *et al.*, 2013).

B. Morphologie du virion

Depuis l'identification du VHC en 1989, de nombreuses équipes ont tenté de visualiser les particules virales circulantes dans le sérum de patients infectés sans réel succès, en partie en raison de leur faible concentration dans le sérum et d'une purification difficile (Li *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1996). Une équipe japonaise a réalisé des études de microscopie électronique indirecte en utilisant des billes d'or. Les auteurs décrivent une particule virale de symétrie icosaédrique et de taille comprise entre 55 et 65 nm, et démontrent la présence en surface des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Kaito *et al.*, 2006a, b). Cette enveloppe virale entoure une capside de 30 à 35 nm qui renferme l'ARN viral (Figure 3). Ces résultats sont conformes avec les données structurales des autres virus de la famille des Flavivirus.

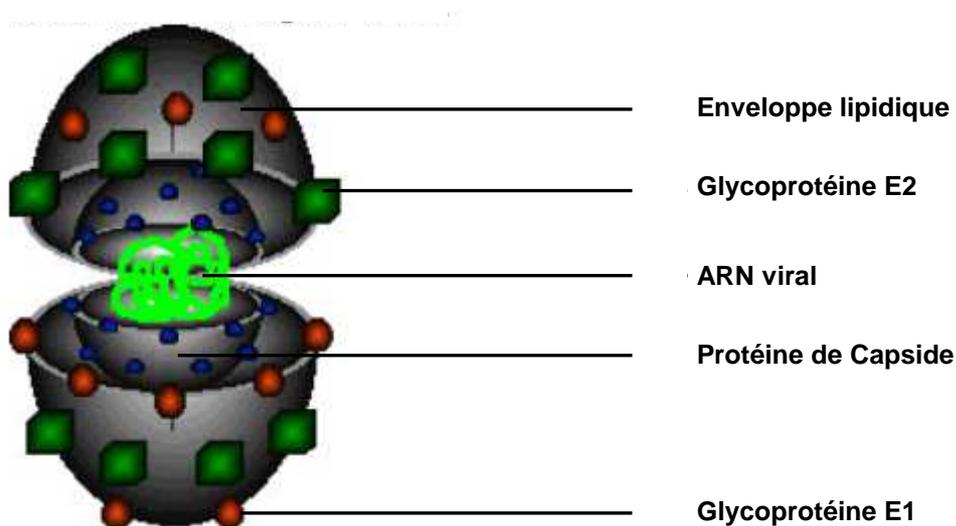


Figure 3 : Morphologie du virion VHC (Image de Futura Sciences.com).

D'autre part, une série d'études a mis en évidence l'existence dans le sérum de malades, de plusieurs structures de densités variables et contenant l'ARN viral (Hijikata *et al.*, 1993; Kanto *et al.*, 1995; Thomssen *et al.*, 1992). D'une étude à l'autre, les résultats de fractionnement par densité sont très variables. Les variations observées peuvent être imputées à une forte variabilité individuelle en fonction du stade d'évolution de la maladie ainsi qu'aux techniques de fractionnement en elles-mêmes. Malgré ces différences apparentes, de nombreux arguments montrent la présence :

- de structures de densité inférieure à 1,08 g/mL qui correspondent à des particules virales associées de manière complexe à des lipoprotéines de faible densité (LDL) (André *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2006; Thomssen *et al.*, 1992) ou de très faible densité (VLDL) (Nielsen *et al.*, 2006; Prince *et al.*, 1996). Ces complexes nommés « lipoviroparticules » (LVPs) renfermeraient des virions complets où les protéines de l'enveloppe virale sont susceptibles d'interagir avec les différentes formes de lipoprotéines de la cellule hôte (Monazahian *et al.*, 1999). Les LVPs sont des particules sphériques enrichies en triglycérides et en apolipoprotéines B et E (André *et al.*, 2002).

- des structures de densité supérieure à 1,08g/mL qui comprennent des particules virales libres ou complexées à des immunoglobulines (Hijikata *et al.*, 1993; Kanto *et al.*, 1995).

Dans le serum des patients, les virions sont donc en complexe avec des LDL ou des VLDL (André *et al.*, 2002). Il a été démontré que la densité de flottaison des virions sécrétés (1,03 à 1,16 g/mL) est inférieure à celui des virions intracellulaires (1,15 à 1,20 g/mL) (Gastaminza *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que les virions seront dotés de ces lipoprotéines au cours du processus de sécrétion. Il a été démontré que la sécrétion *in vitro* des particules par les hépatocytes infectés était étroitement liée à la sécrétion des VLDL (Gastaminza *et al.*, 2008). Il a été également démontré que, même en l'absence d'autres protéines virales, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sécrétées sont associées aux lipoprotéines (Icard *et al.*, 2009).

C. Génome viral

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire de polarité positive d'une longueur d'environ 9600 nucléotides. À ce jour, deux phases ouvertes de lecture ont été identifiées. La région codante est encadrée par deux régions non codantes (NC), aux extrémités 5' et 3' de l'ARN.

1. Régions non codantes

La région 5'NC, très conservée est essentielle pour la traduction et la réplication du génome. Elle est très structurée et contient quatre grands domaines de structure secondaire appelés domaines I, II, III et IV (Figure 4). La région 5'NC contient « l'Internal Ribosome Entry Site » (IRES) qui est constitué des domaines II, III et IV ainsi que des 30 premiers nucléotides du cadre ouvert de lecture. Il assure la traduction du génome du VHC. Outre son rôle

important dans la traduction du génome, de nombreuses études ont démontré que la région 5'NC était également cruciale pour une réplication efficace de l'ARN viral (Appel *et al.*, 2006; Friebe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Il a été suggéré que la liaison du micro-ARN 122 de la cellule hôte (miR-122) à la région 5'NC était essentielle à la réplication virale (Jopling *et al.*, 2005). Les micro-ARN sont des petites séquences nucléotidiques d'environ 22 nucléotides présents dans les cellules eucaryotes ; ce sont d'importants régulateurs post-transcriptionnels de presque toutes les étapes biologiques dans la cellule, et jouent un rôle clé dans la pathogenèse de maladies humaines. Le micro-ARN 122 est spécifique du foie.

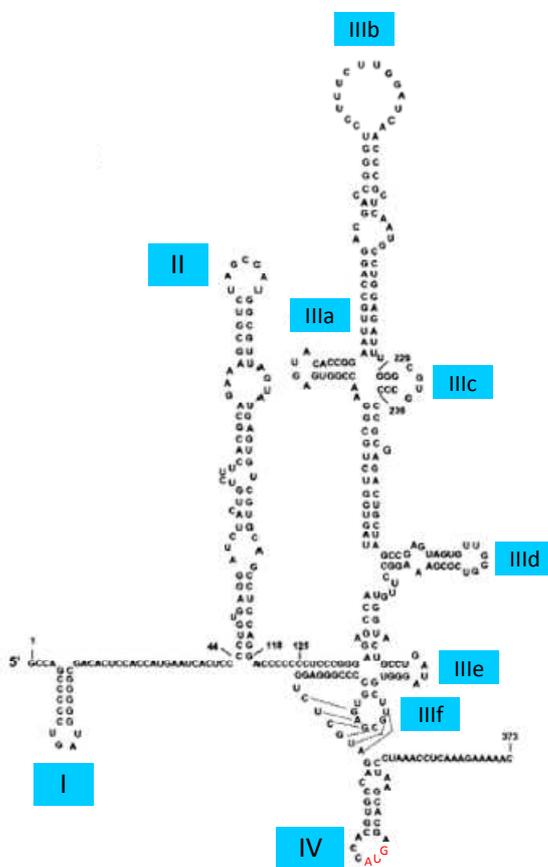


Figure 4 : Représentation de la structure primaire et secondaire de la région 5'NC.

Les domaines structuraux I, II, III et IV sont indiqués. Le domaine III est divisé en 6 sous-domaines numérotés IIIa à IIIf. Les domaines II, III, et IV constituent l'IRES du VHC et le codon AUG initiateur de la traduction situé au sein du domaine IV est indiqué en rouge.

La longueur de la région 3'NC varie en fonction du génotype. Elle a une structure tripartite qui comprend : une région hautement variable de 30-40 nucléotides, une région poly-U/UC de longueur variable et une séquence très conservée de 98 nucléotides, connue sous le nom de région X et repliée en trois tiges-boucles SL1, SL2 et SL3 (Figure 5) (Kolykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1996). La région conservée contenant SL1, SL2 et SL3 a été démontrée comme étant indispensable à la réplication et à l'infectiosité du VHC (Yanagi *et al.*, 1999; Yi & Lemon, 2003).

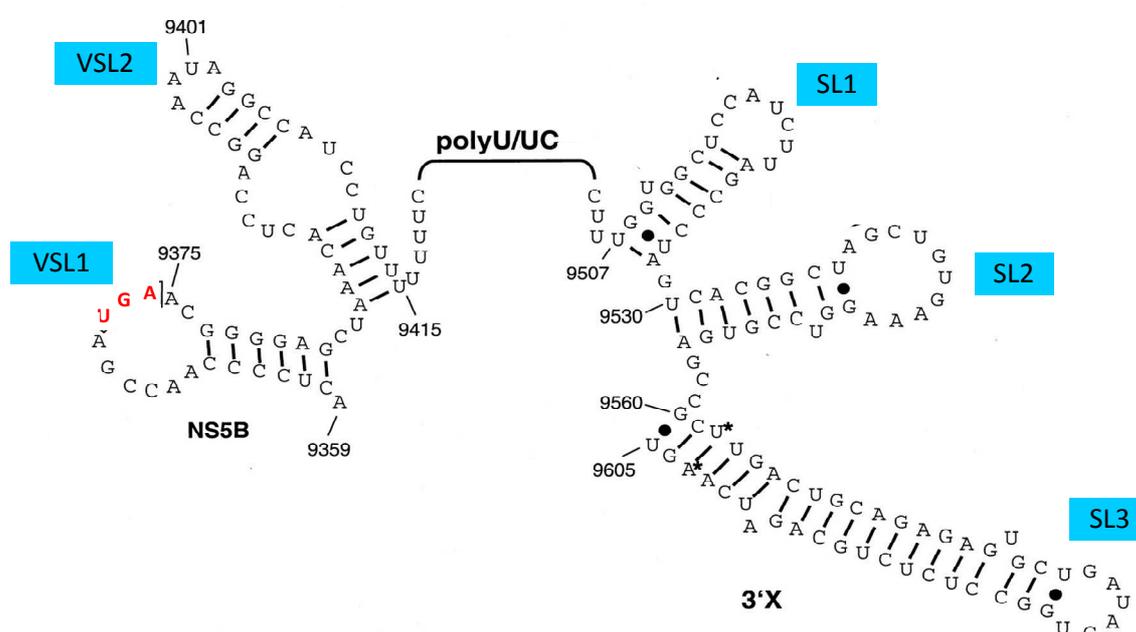


Figure 5 : Représentation de la structure primaire et secondaire de la région 3'NC.

Le codon stop de la traduction est situé au sein de la boucle VSL1 et est indiqué en rouge. D'après (Friebe & Bartenschlager, 2002).

2. Région codante

Le cadre majeur de lecture, de 9024 à 9111 nucléotides en fonction du génotype, débute par un codon AUG initiateur de la traduction, situé dans le domaine IV de la région 5'NC. La traduction de ce cadre de lecture produit une polyprotéine virale unique dont la maturation co- et post-traductionnelle conduit à au moins 10 protéines (Suzuki *et al.*, 1999) (Figure 6). Ces protéines sont classées en protéines structurales (C, E1, E2) et non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), représentées sur la Figure 6. La classification de la protéine p7 au sein des protéines structurales ou non structurales est encore mal définie. Le clivage de la

polyprotéine nécessite dans un premier temps l'intervention de peptidases cellulaires afin de libérer les protéines structurales et la protéine p7. Les protéases virales assurent ensuite le clivage de la polyprotéine dans la région non structurale. La synthèse d'une onzième protéine, dite protéine F est issue d'un décalage du cadre de lecture au moment de la traduction. Sa séquence chevauche celle de la protéine de capsid.

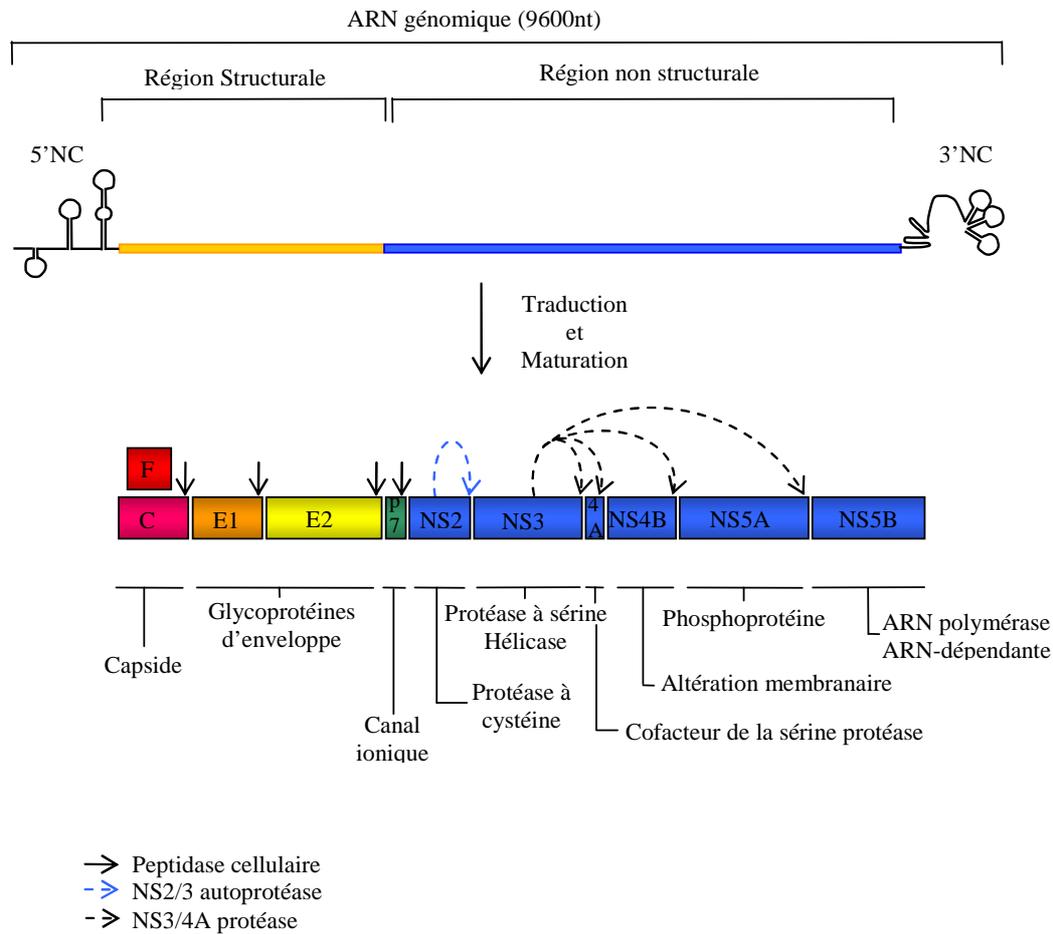


Figure 6 : Organisation génétique du VHC et maturation des protéines virales.

La structure du génome viral est représentée avec les régions 5' et 3' non codantes, et le cadre ouvert de lecture codant pour les protéines structurales et non structurales. La traduction du génome et la maturation de la polyprotéine est schématisée et génère des protéines. D'après (Régeard *et al.*, 2007).

La Figure 7 ci-dessous présente la topologie hypothétique des protéines virales et leur association à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte. De façon remarquable, chaque protéine virale est ancrée aux membranes intracellulaires via des déterminants spécifiques qui sont essentiels pour la fonction de la protéine dans la cellule.

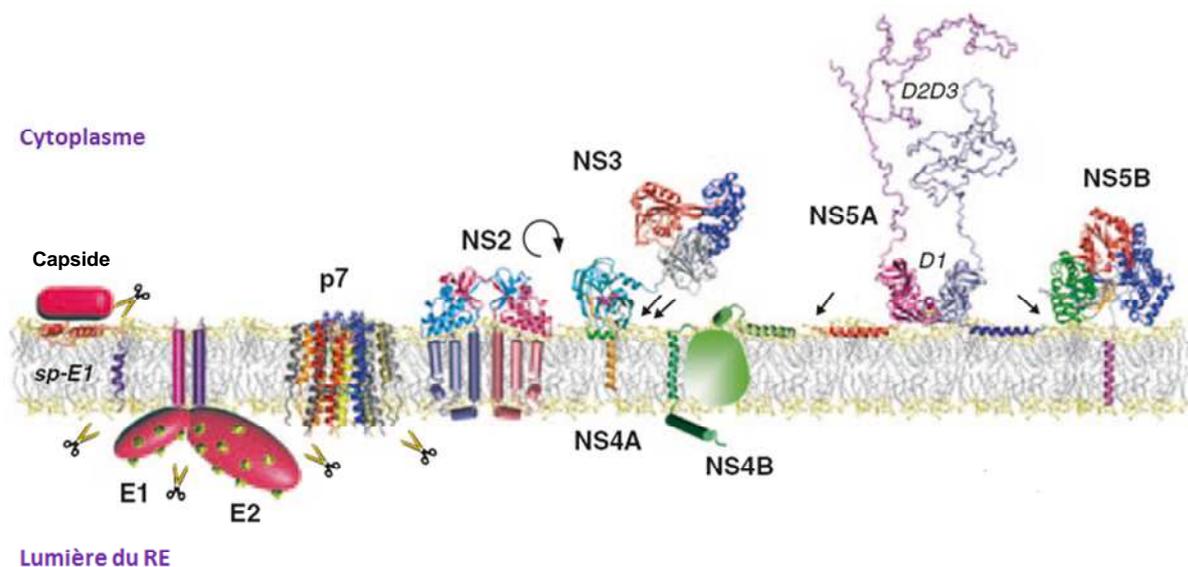


Figure 7 : Structure et association à la membrane des protéines du VHC.

Les ciseaux indiquent les clivages par la peptidase signal du RE (côté luminal), et la peptidase peptide-signal (côté cytosolique). La flèche cyclique montre le clivage par la protéase NS2. Les flèches obliques indiquent les clivages par la protéase NS3/4A. D'après (Moradpour & Penin, 2013).

a) Protéines structurales

➤ Protéine de capsid C

La présence d'une séquence signal entre la protéine de capsid C et la glycoprotéine d'enveloppe E1 induit la translocation de la polyprotéine en cours de synthèse dans la lumière du RE (Santolini *et al.*, 1994). Le clivage de la séquence signal entre la protéine de capsid C et E1 par une peptidase peptide-signal produit une protéine de capsid immature de 191 acides aminés. Le clivage ultérieur par une peptidase cellulaire conduit à la forme mature de 21 kDa de la protéine de capsid, qui compte 177 acides aminés (McLauchlan *et al.*, 2002; Oehler *et al.*, 2012; Okamoto *et al.*, 2008). Cette forme mature est organisée en deux domaines appelés D1 et D2. Le domaine D1 est hydrophile et contient une forte proportion d'acides aminés basiques ; il interagit avec l'extrémité 5'NC du génome viral pour initier son encapsidation (Boulant *et al.*, 2005). Ce domaine est aussi impliqué dans les interactions avec

plusieurs facteurs cellulaires (de Chassey *et al.*, 2008) et pourrait ainsi contribuer aux modifications de fonctions de la cellule hôte après l'infection par le VHC. Le domaine hydrophobe D2 est essentiel pour la localisation à la membrane du RE de la protéine de capsid, ainsi que son trafic vers les gouttelettes lipidiques (Hope & McLauchlan, 2000; Suzuki *et al.*, 2005).

La protéine de capsid est importante pour l'assemblage des particules virales. Les mutations qui perturbent son trafic vers les gouttelettes lipidiques résultent en une réduction importante de la production de particules virales infectieuses (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2007). Plus récemment, des études de mutagenèse et de trans-complémentation suggèrent que les 177 résidus de la protéine de capsid mature sont nécessaires pour la production de particules virales infectieuses (Kopp *et al.*, 2010). Bien que n'étant pas absolument indispensable pour la réplication de l'ARN du VHC, il a été suggéré que la protéine de capsid jouerait un rôle important dans le recrutement des complexes de réplication virale vers les membranes associées aux gouttelettes lipidiques (Miyanari *et al.*, 2007).

Au sein de la particule virale en formation, les protéines de capsid interagiraient avec la glycoprotéine E1, mais les résidus de la capsid impliqués dans cette interaction restent controversés (Ma *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 2006). De nombreuses autres fonctions potentielles ont été attribuées à la protéine de capsid : la perturbation du métabolisme lipidique (Barba *et al.*, 1997; Lerat *et al.*, 2002; McLauchlan, 2000; Moriya *et al.*, 1998), la participation aux mécanismes de persistance virale, la modification de la prolifération cellulaire (McLauchlan, 2000; Ray & Ray, 2001) ou encore la modulation transcriptionnelle de certains gènes (Shih *et al.*, 1993, 1995).

➤ **Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2**

Selon le génotype, E1 et E2 ont un poids moléculaire de 33-35 kDa et 70-72 kDa, respectivement (Nielsen *et al.*, 2006). Ces glycoprotéines forment des hétérodimères non-covalents stables, ancrés dans la membrane du RE (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994). E1 et E2 sont des protéines transmembranaires de type I avec un ectodomaine en N-terminal d'environ 160 et 360 acides aminés pour E1 et E2, respectivement et un court domaine transmembranaire C-terminal d'environ 30 acides aminés. Au cours de leur

synthèse, les ectodomaines de E1 et E2 sont transloqués à la lumière du RE tandis que les domaines transmembranaires sont insérées dans la membrane du RE. Avant le clivage de la séquence signal, les domaines transmembranaires de E1 et E2 forment une structure en épingle à cheveux. Le clivage des protéines par la peptidase signal cellulaire induirait un changement dynamique permettant une réorientation du deuxième domaine hydrophobe pour ne former qu'un domaine transmembranaire unique en hélice α (Cocquerel *et al.*, 2002). La biogenèse de ces protéines est étroitement liée et est fortement influencée par leur co-expression (Lavie *et al.*, 2007).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 jouent un rôle essentiel à différentes étapes du cycle du VHC. Tout d'abord, elles sont impliquées dans la reconnaissance de la cellule cible et dans l'interaction des particules virales avec des facteurs cellulaires. Elles interviennent ainsi dans l'entrée du virus, dans la fusion avec la membrane de l'endosome et dans l'assemblage de la particule infectieuse. E1 serait impliquée dans des interactions spécifiques avec la protéine de capsid (Lo *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2002; Migliaccio *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2006). Ainsi, l'interaction de E1 avec la protéine de capsid permettrait le recrutement des hétérodimères E1E2 autour des particules virales en bourgeonnement. E2 quant à elle serait capable de se lier à plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans l'attachement et/ou l'entrée du VHC. En ce qui concerne la fusion, à l'heure actuelle, il reste difficile de définir précisément quelle est la protéine de fusion du VHC. La région de E1 composée des résidus 264 à 290 montre des similarités avec les peptides de fusion portés par les glycoprotéines des Flavivirus et Paramyxovirus (Drummer *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 1999). La protéine E2 pour sa part aurait une structure proche de la protéine E du virus de l'encéphalite à tiques et pourrait correspondre à une protéine de fusion de classe II (Yagnik *et al.*, 2000). De plus, il n'est pas exclu que E1 et E2 puissent être impliquées toutes deux dans le processus de fusion. L'utilisation d'un système de fusion entre des particules rétrovirales pseudotypées avec E1E2 et des liposomes a par ailleurs permis d'identifier des régions, dans E1 (résidus 270 à 284) et E2 (résidus 416 à 430 et 600 à 620), qui participeraient au mécanisme de fusion (Lavillette *et al.*, 2007). Ces deux glycoprotéines contiennent également des régions hyper-variables qui sont hautement immunogènes et seraient responsables de l'échappement au système immunitaire de l'hôte (Guan *et al.*, 2012; Weiner *et al.*, 1991).

b) Protéine p7

La protéine p7 se situe à la frontière de la séquence codant pour les protéines structurales et celle codant pour les protéines non structurales. A l'heure actuelle, on ne sait toujours pas si cette protéine est présente au sein de la particule virale. Composée de 63 acides aminés, elle est presque intégralement associée à la membrane du RE et contient deux hélices α hydrophobes séparées par une boucle basique (Carrère-Kremer *et al.*, 2002). Référencée dans la famille des viroporines, la protéine p7 fonctionne comme un canal ionique (Griffin *et al.*, 2003; Steinmann *et al.*, 2007). Bien qu'elle ne soit pas impliquée dans la réplication de l'ARN viral (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999), elle serait essentielle à la production de virus infectieux *in vivo* et *in vitro* (Jones *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2003). Récemment, il a été démontré que la protéine p7 jouait un rôle important dans l'adressage de NS2 aux complexes de réplication, et dans l'interaction de ce dernier avec NS5A (Boson *et al.*, 2011; Tedbury *et al.*, 2011).

c) Protéines non structurales

➤ **Protéine NS2**

NS2 est une protéine transmembranaire non glycosylée de 23 kDa (Santolini *et al.*, 1995). Elle est clivée à partir de la polyprotéine par une peptidase cellulaire à son extrémité N-terminale, tandis que son extrémité C-terminale subit une auto-protéolyse par la métalloprotéase NS2/NS3 (Lin *et al.*, 1994). NS2 a une demi-vie très courte et est dégradée par le protéasome après son clivage (Franck *et al.*, 2005). NS2 n'est pas nécessaire à la réplication de l'ARN viral. Toutefois, le clivage à la jonction NS2/NS3 est essentiel pour libérer une protéine NS3 complètement fonctionnelle ; par conséquent, NS2 promeut la réplication de l'ARN viral. Il a aussi été démontré que NS2 joue un rôle important dans l'assemblage du virion (Jones *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2009). NS2 est également indispensable pour la production de particules infectieuses ; elle pourrait intervenir dans les étapes tardives de l'assemblage comme la sécrétion virale, et mettre en jeu 29 résidus de sa région N-terminale (de la Fuente *et al.*, 2013). Ce rôle dans l'assemblage serait indépendant de son activité protéasique, mais pourrait impliquer un réseau complexe d'interactions avec les protéines virales structurales et d'autres protéines non structurales (E1, E2, p7, NS3, NS5A) (Boson *et al.*, 2011; Jirasko *et al.*, 2010).

➤ **Protéines NS3 et NS4A**

NS3 est une protéine hydrophile et multifonctionnelle de 70 kDa, avec un domaine sérine-protéase situé dans le tiers de l'extrémité N-terminale (acides aminés 1 à 180) et un domaine NTPase et ARN hélicase dans les deux tiers de l'extrémité C-terminale (acides aminés 181 à 631) (Morikawa *et al.*, 2011). Le domaine protéasique de NS3 a été décrit comme contenant 3 résidus actifs (Ser 139, His 57 et Asp 81) rejetés à la surface, entre deux feuillets β parallèles (Kim *et al.*, 1996; Tomei *et al.*, 1993). Bien que peu comprises, les activités NTPase et hélicase de NS3 permettraient de dénouer les structures secondaires de l'ARN viral et particulièrement celles de la région 3'NC lors de la réplication. L'activité hélicase pourrait également intervenir dans la séparation du brin d'ARN en cours de synthèse de sa matrice ou encore favoriser le déplacement de divers facteurs le long de l'ARN viral (Lindenbach *et al.*, 2005). L'activité protéase assure le clivage protéolytique des jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B. Cette fonction n'est assurée qu'en association avec son cofacteur, la protéine NS4A (Failla *et al.*, 1995).

NS4A est une petite protéine de 8 kDa possédant une extrémité N-terminale hydrophobe ancrée dans la membrane du RE. L'interaction de NS3 avec son cofacteur permettrait ainsi sa localisation au niveau de la membrane du RE. L'extrémité C-terminale de NS4A contient une hélice α négativement chargée qui contribuerait à la réplication de l'ARN viral et à l'assemblage de la particule virale (Phan *et al.*, 2011).

De par son rôle essentiel au cours de la réplication virale et de la persistance virale, la sérine-protéase NS3 est aujourd'hui une cible de choix pour le développement de nouveaux traitements antiviraux (De Francesco & Migliaccio, 2005).

➤ **Protéine NS4B**

NS4B est une petite protéine de 27 kDa (Hügler *et al.*, 2001). Sa topologie reste encore mal définie. Des analyses prédictives suggèrent que la partie centrale de la protéine présenterait quatre domaines transmembranaires. Initialement, il était supposé que ses deux extrémités N- et C-terminales étaient exposées à la face cytosolique du RE. Cependant, une hélice α amphiphile présente en amont du segment central hydrophobe de la protéine pourrait traverser la bicouche lipidique lorsque NS4B est sous une forme homo- ou hétéro-oligomérique (Gouttenoire *et al.*, 2009). Quant à la région C-terminale de NS4B, elle comporterait 2 hélices α qui seraient importantes pour maintenir son rôle dans la réplication virale (Jones *et al.*, 2007). En outre, l'expression de NS4B induit la formation d'un « réseau membranaire »,

environnement important lors du processus de réplication (Egger *et al.*, 2002). De plus, elle posséderait une activité NTPase ainsi que la capacité d'interagir avec l'ARN viral (Einav *et al.*, 2004, 2008; Thompson *et al.*, 2009).

➤ **Protéine NS5A**

La protéine NS5A est retrouvée sous deux formes, l'une hypophosphorylée de 56 kDa et l'autre hyperphosphorylée de 58 kDa. Elle est principalement localisée du côté cytosolique, mais est associée au RE par la présence en N-terminal d'une hélice α amphipathique (Brass *et al.*, 2002). NS5A est composée de 3 domaines, mais les données structurales ne sont disponibles que pour le domaine I situé en N-terminal (Tellinghuisen *et al.*, 2004). Les acides aminés 1 à 213 forment ce premier domaine, qui est capable de se dimériser. Les quatre résidus cystéine en position 39, 57, 59 et 80 sont importants pour cette dimérisation, également facilitée par le recrutement d'un ion Zn^{2+} (Lim *et al.*, 2012). En outre, le dimère présente en surface des acides aminés très conservés intervenant vraisemblablement dans des interactions protéiques ; il renferme aussi une cavité plutôt basique susceptible d'interagir avec l'ARN viral. Les structures des domaines II et III sont très peu connus malgré leur implication certaine dans la réplication virale. Une étude a montré que la Serine 457 de NS5A était essentielle pour le maintien de cette réplication (Tellinghuisen *et al.*, 2008). Une autre étude très récente suggère que le domaine II de NS5A soit un déterminant clé pour la réplication du génome viral, mais ne serait pas requis dans l'assemblage et la sécrétion des virions (Ross-Thriepand *et al.*, 2013). La partie C-terminale du domaine III serait quant à elle responsable de l'hyperphosphorylation et serait requise pour l'assemblage (Appel *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008). NS5A est le siège de plusieurs mutations adaptatives dans le modèle de réplicons (Blight *et al.*, 2000; Pietschmann *et al.*, 2009). Ces mutations peuvent, d'une part augmenter de plus de 10 000 fois l'efficacité de la réplication (Blight *et al.*, 2002). L'occurrence de ces mutations adaptatives ne semble pourtant pas avoir de signification *in vivo*, car l'inoculation chez des chimpanzés avec des génomes fonctionnels contenant certaines de ces mutations n'est pas productive (Bukh *et al.*, 2002). D'autre part, l'apparition de ces mutations semble favoriser l'expression de la forme hypophosphorylée de NS5A (Blight *et al.*, 2000, 2003; Lohmann *et al.*, 2003). Parallèlement, une forte phosphorylation de la protéine NS5A est associée à une diminution de l'efficacité de réplication dans des modèles de réplicons (Appel *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2004; Neddermann *et al.*, 2004). Il a également été montré que l'état de phosphorylation de NS5A pouvait être régulé par les protéines NS3, NS4A et NS4B (Koch & Bartenschlager, 1999; Neddermann *et al.*, 1999). L'ensemble de ces

données laisse penser que la protéine NS5A pourrait intervenir dans la balance réplication/assemblage par modulation de son état de phosphorylation.

➤ **Protéine NS5B**

NS5B est l'enzyme clé du complexe de réplication puisqu'elle permet la synthèse des nouveaux ARN viraux de polarité (+) et (-). NS5B est une protéine hydrophile de 68 kDa ancrée dans la membrane du RE, en C-terminal. Elle présente un motif peptidique Gly-Asp-Asp (ou motif GDD) analogue à celui rencontré dans la séquence des ARN polymérases ARN dépendantes de nombreux virus (Miller & Purcell, 1990). Plusieurs études ont démontré *in vitro* cette activité d'ARN polymérase ARN dépendante (Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 1998). L'activité de polymérisation est cependant dépourvue de toute action correctrice, générant ainsi une grande variabilité génétique au sein des transcrits. La structure tridimensionnelle de NS5B a été résolue et présente une structure en main droite classique où les domaines correspondant aux doigts, à la paume et au pouce encerclent le site actif (Lesburg *et al.*, 1999). Le domaine catalytique se retrouve ainsi dans la paume ; les doigts et le pouce interviennent eux dans la régulation de l'interaction de NS5B avec l'ARN viral (Biswal *et al.*, 2005). Très récemment, une équipe a montré que NS5B était enrichie en éléments de régulation agissant *in cis*, comme amplificateurs de la réplication virale (Chu *et al.*, 2013).

III. Modèles d'étude *in vitro* de la biologie du VHC

La découverte du VHC a permis de diagnostiquer et prévenir de nouvelles infections, en particulier chez les receveurs de sang grâce à la détection d'anticorps spécifiques du VHC dans le sérum des donneurs de sang potentiellement infectés. Au départ, le manque de modèles robustes de cultures cellulaires et de modèles de petits animaux a rendu très difficile l'étude du cycle de vie du virus, ainsi que les interactions hôte-pathogène. Cependant, au cours des quinze dernières années, plusieurs modèles ont été développés et utilisés avec succès pour étudier les différentes étapes du cycle viral et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Certains des modèles les plus courants seront présentés dans les sections suivantes.

A. Modèle des pseudoparticules du VHC

Les pseudoparticules du VHC (VHCpp) sont des particules virales chimériques produites par la co-transfection de cellules de la lignée rénale embryonnaire humaine HEK 293T, avec des vecteurs d'expression codant pour les glycoprotéines non modifiées E1 et E2 du VHC, les protéines gag-pol du virus de leucémie murine (MLV) ou celui du VIH et un génome rétroviral codant pour un gène rapporteur de la GFP ou de la luciférase (Figure 8) (Bartosch *et al.*, 2003a; Hsu *et al.*, 2003). L'internalisation de ces particules conduit à la libération de la capsidie rétrovirale dans le cytoplasme de la cellule cible, suivie d'une transcription inverse et une intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte. L'infection peut être quantifiée par la mesure de l'expression du gène rapporteur.

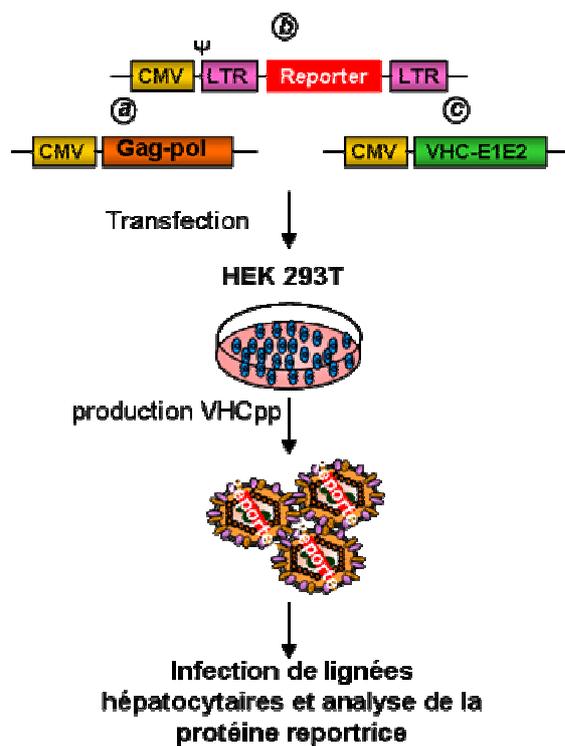


Figure 8 : Production des pseudoparticules du VHC (VHCpp).

Les cellules de la lignée HEK (Human Embryonic Kidney) 293T sont transfectées avec trois vecteurs d'expression. Le premier (a) est le vecteur d'empaquetage qui code pour les protéines rétrovirales Gag et Pol. Le deuxième vecteur (b) contient la séquence du gène rapporteur qui peut être encapsidé dans des particules grâce à la présence de la séquence d'encapsidation (Ψ). Le troisième vecteur (c) code pour les glycoprotéines E1 et E2 du VHC. Les virus recombinants collectés à partir du surnageant sont alors constitués d'une capsidie rétrovirale contenant un génome ARN avec les glycoprotéines du VHC à leur surface. D'après (Régeard *et al.*, 2007).

Les VHCpp infectent préférentiellement les cultures primaires d'hépatocytes humains et des lignées cellulaires humaines d'origine hépatique. Il a cependant été montré que ces pseudoparticules pouvaient infecter, avec une moindre efficacité, des lignées non hépatiques (Caco-2, MCF-7...) et non humaines (Vero) (Bartosch *et al.*, 2003a). En l'absence de système de culture cellulaire du VHC, les VHCpp ont représenté l'outil le plus proche des particules natives du VHC ; cependant elles ne reflètent pas complètement le virus produit chez les patients. En effet, contrairement au virus natif, les VHCpp ne sont pas associées à des lipoprotéines, sachant qu'elles sont produites dans les cellules HEK293T, qui ne synthétisent pas de lipoprotéines. Toutefois, ce modèle a permis l'identification de plusieurs récepteurs cellulaires essentiels à l'entrée du VHC dans les cellules, comme le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDL-R), les protéines de jonctions serrées : Claudines-1,-6 et -9 et plus récemment l'Occludine.

Ce modèle est limité à l'étude de l'entrée du VHC dans les cellules ou à l'étude des anticorps dirigés contre les protéines d'enveloppe du VHC et ne permet de mimer que les étapes précoces, de l'attachement de la particule à la libération de la capsid virale (Bartosch *et al.*, 2005; Lavillette *et al.*, 2005).

B. Modèle du réplicon du VHC

En 1999, Lohmann *et al.* ont réalisé une avancée importante dans la recherche sur le VHC quand ils ont rapporté la mise au point d'un système de culture cellulaire basé sur la sélection de cellules permettant une réplication stable de l'ARN génomique du VHC (Lohmann *et al.*, 1999). Ils ont travaillé sur un génome consensus de génotype 1b provenant d'un patient chroniquement infecté. La région allant de la protéine de capsid à la protéine p7 a été remplacée par la séquence codant pour le gène de résistance à la néomycine et l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (ECMV). Le réplicon sub-génomique résultant est donc bicistronique, dont la traduction du premier cistron (gène de résistance à la néomycine) est assurée par l'IRES du VHC et celle du second cistron (NS2-NS5B) par l'IRES de l'ECMV. D'autres constructions sub-génomiques sont composées d'un second cistron codant pour les protéines NS3 à NS5B (Figure 9A). Après transfection de cellules de la lignée Huh7 avec ce réplicon, la sélection de la très faible proportion de cellules supportant une réplication autonome a été obtenue par traitement avec la néomycine (Figure 9B1). Plusieurs mutations (désignées sous le terme de mutations adaptatives de culture cellulaire) ont été identifiées

dans ces ARNs à réplication autonome et il a été démontré que ces mutations amélioraient considérablement la réplication dans les réplicons. Un pôle majeur de ces mutations a été retrouvé dans NS5A, NS3 et NS5B, et elles augmentent la réplication de l'ARN de près de 10.000 fois (Blight *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001). En 2002, Pietschmann *et al.* ont généré un réplicon génomique, contenant l'ensemble du génome du VHC de génotype 1b (Pietschmann *et al.*, 2002). Plus récemment, des réplicons de génotype 4a et 3a ont été décrits (Peng *et al.*, 2013; Saeed *et al.*, 2013). Ils contiennent des mutations adaptatives qui amplifient la réplication de l'ARN.

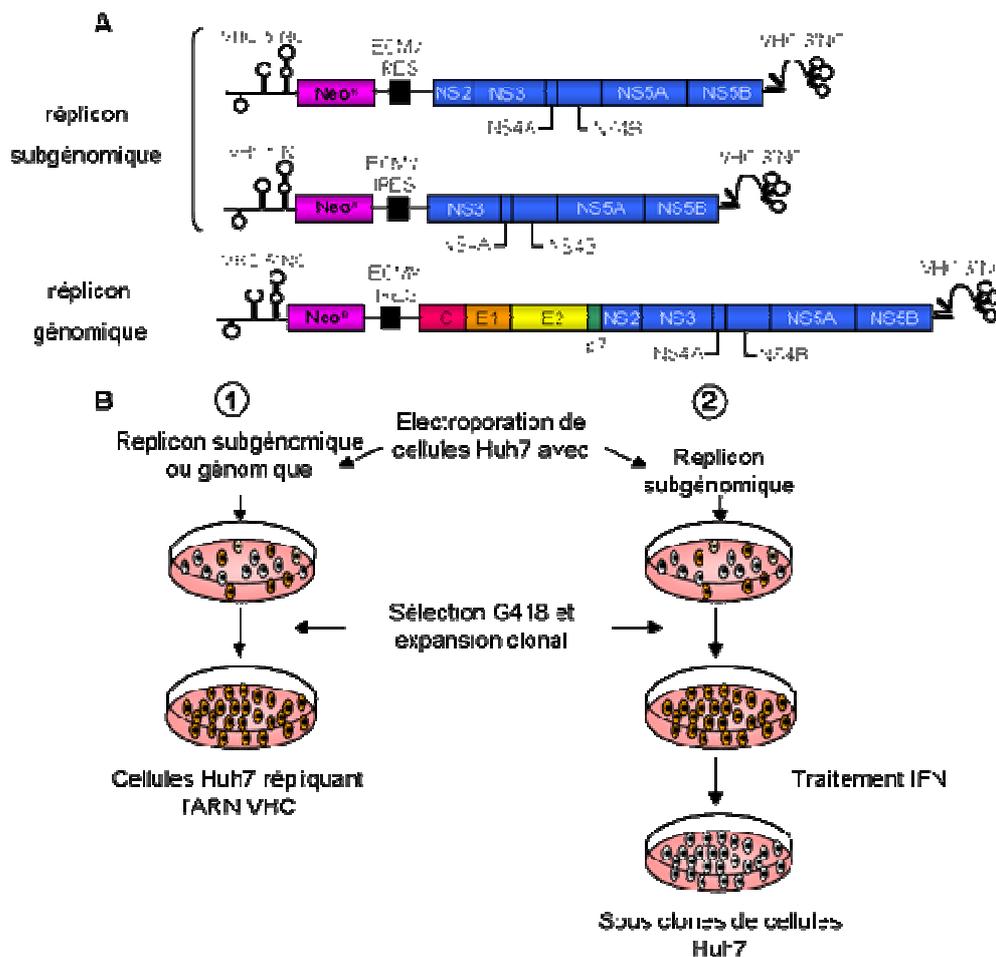


Figure 9 : Représentation schématique du système de réplicon.

Les réplicons subgénomique et génomique sont composés de la région 5'NC du VHC, du gène codant la néomycine phosphotransférase (NéoR), de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite, de la région codant pour les protéines du VHC et de la région 3'NC (A). Les cellules Huh7 sont électroporées avec l'ARN du réplicon. Les colonies répliquant efficacement le réplicon du VHC sont choisies en raison de leur résistance à la G418 (B1). En parallèle, des sous-clones de Huh7 hautement permissifs à la réplication du VHC peuvent être obtenus par traitement à la G418 des cellules transfectées. Les cellules sont ensuite traitées par l'IFN pour éliminer le réplicon (B2). D'après (Régeard *et al.*, 2007).

Le développement des réplicons sub-génomiques a permis de définir l'unité minimale de réplication : en effet, l'insertion de la séquence codant pour les protéines non structurales NS3 à NS5B est nécessaire à leur réplication autonome. Cependant, l'utilisation des réplicons génomiques est complémentaire car il n'est pas exclu que l'expression des protéines structurales modifie certains aspects de l'étape de réplication.

C. Modèle du clone cellulaire du VHC

Un inconvénient majeur du modèle de réplicon était son incapacité à produire des particules virales. Une avancée importante est survenue quand un réplicon génomique a été construit en utilisant le clone JFH-1, de génotype 2a du VHC et isolé d'un patient japonais souffrant d'une hépatite fulminante. Ce réplicon se répliquait efficacement en culture cellulaire, sans avoir besoin de mutations adaptatives et produisait des particules virales infectieuses (Wakita *et al.*, 2005). Grâce à ce modèle, il a été possible pour la première fois de caractériser les particules virales produites *in vitro*. D'un point de vue morphologique, les particules virales ont été observées par microscopie électronique, et elles présentaient un diamètre de 55 nm (Wakita *et al.*, 2005). D'un point de vue biochimique, des analyses par gradient de densité ont permis de montrer que ces particules virales du VHC dérivées de clone cellulaire (nommées VHCcc) produites *in vitro* étaient associées à des lipoprotéines (Gastaminza *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Cependant, cette association initiale ne semble pas être optimale puisque les virus récupérés après un passage *in vivo*, aussi bien chez le chimpanzé que chez des souris humanisées, présentent une association plus stable avec les lipoprotéines, conduisant à une meilleure infectiosité *in vitro* (Lindenbach *et al.* 2006).

Les capacités de réplication et de production de virions du réplicon JFH-1 ont été améliorées par la construction d'un réplicon chimérique de JFH-1 qui contenait les protéines structurales d'un autre isolat 2a appelé J6 (Pietschmann *et al.*, 2006). Très récemment, un nouveau clone infectieux dérivé de culture cellulaire a été généré. Il est également issu d'un génome 2a d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante (appelé JFH-2). Cette fois, des mutations ont été retrouvées et elles permettent d'augmenter la réplication du clone JFH-2. Ce génome se réplique dans des lignées hépatiques et produit des virus infectieux (Date *et al.*, 2012). Dans le même temps, Li *et al.* ont développé un clone infectieux de génotype 1a dérivé de culture cellulaire appelé TN, qui réplique efficacement et produit également des particules infectieuses (Li *et al.*, 2012).

Les particules VHCcc (Figure 10) ont la capacité d'infecter les mêmes cultures cellulaires que les pseudoparticules VHCpp. Cependant, peu d'équipes ont rapporté l'infection d'hépatocytes humains en culture primaire par les particules VHCcc. Cette infection dans les hépatocytes humains primaires serait dépendante de la présence de CD81 (Molina *et al.*, 2008) et les cellules supporteraient un cycle infectieux complet, incluant la production de nouvelles particules infectieuses. Toutefois, ces nouvelles particules infectieuses ont une densité de flottaison plus faible et une infectiosité plus forte, caractéristiques similaires aux particules associées aux VLDL produites durant l'infection *in vivo* (Podevin *et al.*, 2010).

Le développement du modèle VHCcc a permis l'étude *in vitro* du cycle de vie complet du virus, y compris les étapes qui étaient auparavant inaccessibles tels que l'assemblage des particules virales et la sécrétion des particules infectieuses.

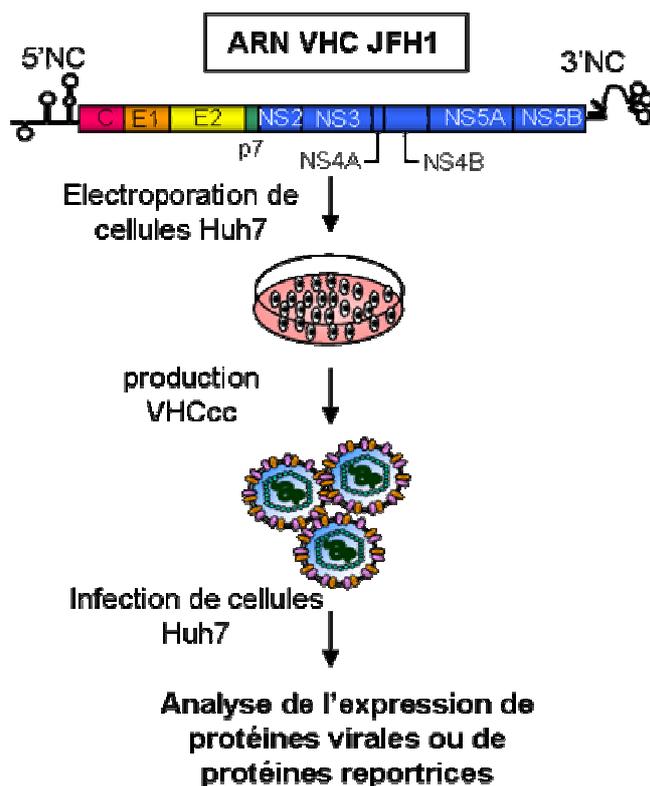


Figure 10 : Représentation schématique du modèle VHCcc.

Les lignées cellulaires Huh7 sont électroporées avec les transcrits d'ARN du génome JFH1. Deux jours après la transfection, les virus sont sécrétés dans le surnageant des cellules répliquant le génome JFH1 du VHC. D'après (Régeard *et al.*, 2007).

IV. Cycle viral du VHC

Les virus sont des particules inertes qui exploitent la machinerie de la cellule hôte pour réaliser leur cycle biologique. Ainsi, durant chaque étape du cycle viral du VHC, le virus interagit avec de nombreux partenaires cellulaires. La première étape constitue l'entrée du virus dans sa cellule hôte suivant un tropisme qui lui est propre. L'entrée du virus nécessite la reconnaissance de partenaires cellulaires exprimés à la membrane plasmique, permettant son attachement à la surface de la cellule. Une succession d'évènements permet ensuite la pénétration du virus dans la cellule et le relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme. La suite du cycle permet la traduction du génome viral et la maturation des protéines virales nécessaires au bon déroulement de l'étape suivante, la réplication virale. A ce stade, le complexe de réplication se forme, aboutissant à la synthèse de l'ARN viral de polarité négative et l'amplification de l'ARN de polarité positive. Le cycle s'achève par une dernière étape qui consiste en l'assemblage de nouvelles particules virales et leur sécrétion dans le domaine extracellulaire. Nous développerons ces différentes étapes dans la suite de cette section.

A. Tropisme cellulaire

Le tropisme d'un virus est déterminé non seulement par la reconnaissance de partenaires cellulaires présents à la membrane plasmique mais également par la susceptibilité des cellules à supporter l'intégralité du cycle viral. Le tropisme du VHC est particulièrement restreint puisqu'il n'est infectieux que sur trois espèces : l'Homme, le chimpanzé et la musaraigne des arbres. De plus, le tropisme est limité au sein de l'individu infecté et se traduit par un faible nombre de types cellulaires permissifs.

Bien que le foie soit le site principal de la réplication du VHC, des études récentes ont suggéré qu'il ne serait pas le seul site de réplication du virus et que des sites extra-hépatiques existeraient. En effet, de l'ARN viral a été détecté dans les cellules mononucléées du sang périphérique, dans le cerveau et dans le système nerveux central (Fishman *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008). Cependant, la détection d'ARN viral de brin positif en l'absence de tout brin négatif dans le tissu n'indique pas une réplication du VHC. Plusieurs études ont détecté l'ARN du VHC dans les tissus du système nerveux central et dans le fluide cébrospinal (Fishman *et al.*, 2008; Forton *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2008; Wilkinson *et al.*, 2010).

Toutefois, une variation génétique a été observée dans les séquences virales du cerveau par rapport à celles du foie, chez un même patient (Fishman *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008). Pour le moment, il existe peu d'études *in vitro* ayant identifié les cellules du système nerveux central comme étant permissives à l'infection par le VHC. Récemment, des lignées endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ont été identifiées comme supportant l'entrée et la réplication du VHC (Fletcher *et al.*, 2012). Ces lignées endothéliales exprimaient tous les récepteurs requis pour l'entrée du VHC. Ces résultats démontrent que l'entrée du VHC ne se limite pas aux hépatocytes et suggèrent que le système nerveux central pourrait être une cible pour l'infection *in vivo* du virus.

Ces différents sites extra-hépatiques pourraient constituer des « réservoirs du virus », et seraient notamment responsables des ré-infections hépatiques après une greffe de foie.

B. Mécanismes d'entrée

1. Interaction avec des partenaires cellulaires de surface

De par leur exposition à la surface des particules virales, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont très probablement impliquées dans l'entrée du virus dans la cellule. En effet, E1 et E2 participent à la plupart des étapes de l'entrée virale : attachement à la membrane des cellules, endocytose et fusion aux endosomes précoces dans un environnement à faible pH (Blanchard *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Meertens *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006). L'infection est initiée par l'interaction de la particule virale avec des protéines spécifiques, à la surface cellulaire. Ces protéines appartiennent à deux catégories, classées en fonction des conséquences fonctionnelles de leur interaction : les facteurs d'attachement et les récepteurs. Les facteurs d'attachement servent à lier et concentrer les particules virales à la surface cellulaire, avec toutefois une spécificité assez faible. D'autre part, les récepteurs ont pour rôle de promouvoir activement l'entrée du virus en induisant des changements conformationnels des glycoprotéines virales et/ou en activant les voies de signalisation requises pour l'internalisation du virion. L'entrée du VHC est donc un processus complexe et multi-étapes, impliquant des facteurs d'attachement (glycosaminoglycanes, récepteur des LDL, lectines de type C) et des récepteurs (SRBI, CD81, Claudine-1 et Occludine).

a) Les facteurs d'attachement

➤ **Glycosaminoglycanes**

Les Glycosaminoglycanes (GAGs) sont présents à la surface des cellules et semblent être le site initial pour la fixation du VHC et d'autres virus de la famille des Flaviviridae (Barth *et al.*, 2003). Les GAGs sont des polysaccharides à longues chaînes non ramifiées, exprimés à la surface de toutes les cellules mais dont la composition varie en fonction du type cellulaire. Il existe plusieurs types de GAGs, incluant les kératanes-sulfates et les héparanes-sulfates. Dans le cas du VHC, l'intervention des GAGs dans les processus d'entrée a été initialement mise en évidence à l'aide de particules virus-like, provenant de l'auto-assemblage des protéines structurales du VHC. Dans ce modèle, seuls certains GAGs, dérivés de l'héparine, étaient susceptibles d'intervenir dans l'attachement des particules virales aux cellules de la lignée HepG2 (Barth *et al.*, 2003, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus à l'aide du modèle VHCcc, alors qu'aucune interaction avec l'héparine n'a pu être démontrée avec les VHCpp (Callens *et al.*, 2005; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Morikawa *et al.*, 2007).

➤ **Lectines de type C**

DC-SIGN et L-SIGN appartiennent à la famille des lectines de type C, connues pour fonctionner en tant que facteurs d'attachement pour plusieurs virus dans leur étape d'entrée, y compris le VIH de type I (Geijtenbeek *et al.*, 2000). DC-SIGN est exprimée à la surface des cellules dendritiques, des cellules de Kupffer et des lymphocytes, tandis que L-SIGN est exprimée dans les cellules endothéliales sinusoidales du foie. DC-SIGN et L-SIGN se lient spécifiquement à la forme soluble de la glycoprotéine E2 du VHC (Gardner *et al.*, 2003). Ces molécules seraient capables de transmettre le virus à des cellules permissives et pourraient également jouer un rôle dans le tropisme tissulaire (Gardner *et al.*, 2003).

➤ **Récepteur des LDL**

Le récepteur des LDL (LDL-R) (Figure 11) est une glycoprotéine membranaire qui contrôle la voie principale par laquelle le cholestérol pénètre dans les cellules. Son ligand physiologique, le LDL, contient l'apolipoprotéine B et transporte 65 à 70% du cholestérol plasmatique. Le LDL-R se lie également à des lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine E, tels que les VLDL (Molina *et al.*, 2007).

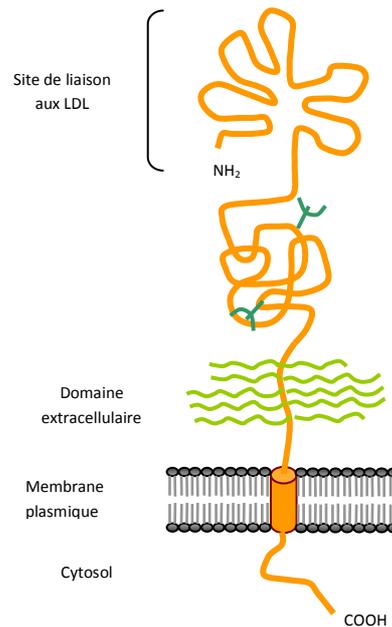


Figure 11 : Représentation schématique du LDL-R.

LDL-R possède un domaine transmembranaire. Son domaine N-terminal, dirigé vers le milieu extracellulaire est fortement glycosylé. Les O-glycosylations et les N-glycosylations sont représentées en vert clair et vert foncé, respectivement.

Etant donné que les virions circulants sont associés à des lipoprotéines enrichies en triglycérides incluant les VLDL et les LDL (André *et al.*, 2002; Kanto *et al.*, 1995), le LDL-R a été proposé comme un potentiel facteur d'entrée du VHC. De plus, plusieurs études ont montré que d'autres membres de la famille des Flaviviridae utilisaient également le LDL-R pour l'entrée virale (Beglova & Blacklow, 2005). La mise en évidence de l'importance du LDL-R dans l'infection par le VHC a été apportée par une étude réalisée sur des cultures primaires d'hépatocytes humains. Pour cela, des infections ont été réalisées sur les cellules, avec du VHC sérique. En combinaison avec l'utilisation d'anticorps dirigés contre le LDL-R, l'équipe a observé une inhibition de l'infection par le VHC. Elle a alors suggéré que le LDL-R jouait un rôle dans les étapes précoces de l'infection (Molina *et al.*, 2007).

Le rôle de LDL-R dans l'infection virale a été confirmé plus récemment, grâce à la lipoprotéine lipase. Cette enzyme possède la particularité de pouvoir hydrolyser les lipoprotéines riches en triglycérides associées aux particules virales infectieuses, en VLDL et en chylomicrons. Mais indépendamment de cette activité catalytique, la lipoprotéine lipase a

également une activité de pontage, en participant à l'absorption hépatique des chylomicrons et des VLDL. L'ajout exogène de cette enzyme a permis d'inhiber de plus de 90% l'infection dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5 (Maillard *et al.*, 2011). Cette inhibition passerait par l'action de la lipoprotéine lipase sur les lipoprotéines enrichies en triglycérides associées aux particules virales, à travers des mécanismes impliquant son activité lipolytique, mais aussi sa fonction de pontage (Maillard *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Récemment, Albecka *et al.* ont mis en lumière l'importance du LDL-R pour une réplication optimale du VHC. L'utilisation de l'ARN interférence en ciblant le LDL-R a permis de réduire l'infectivité du VHCcc dans les cellules Huh7, confirmant ainsi un rôle de ce récepteur dans le cycle de vie du VHC. De plus, l'utilisation d'un anticorps spécifique contre le LDL-R a conduit à une baisse de la réplication de l'ARN viral. Par contre, lors de cette étude, l'équipe n'a pas observé un réel impact sur l'entrée virale après l'inhibition du LDL-R. Elle a donc proposé que le LDL-R n'était pas essentiel à une entrée des particules infectieuses du VHC, mais que sa fonction physiologique était importante pour une réplication optimale du génome (Albecka *et al.*, 2012).

b) Les récepteurs

➤ CD81

CD81 est une tétraspanine de 25 kDa exprimée dans tous les tissus, à l'exception des hématies et des plaquettes. Elle est impliquée dans divers mécanismes dont l'adhérence cellulaire, la motilité et la signalisation (Figure 12). Au niveau de la membrane plasmique, les tétraspanines interagissent entre elles et avec d'autres protéines cellulaires pour former des domaines riches en tétraspanines (TEM : tetraspanin enriched microdomains). La composition de ces TEM semble dépendante du type cellulaire, permettant ainsi l'accomplissement de fonctions spécifiques à chaque type cellulaire. CD81 a été le premier facteur identifié comme nécessaire à l'entrée du VHC dans la cellule. Ce rôle a été suggéré après la démonstration que CD81 interagit avec une forme soluble de la glycoprotéine E2 (Pileri *et al.*, 1998), ce qui implique que CD81 pourrait être un facteur de liaison. Par la suite, ce rôle a été largement confirmé grâce aux modèles VHCpp, VHCcc, de VHC isolé du patient et au modèle de souris humanisées (Bartosch *et al.*, 2003b; Lavillette *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). L'étape d'entrée du VHC pendant laquelle CD81 intervient demeure incertaine. Plusieurs équipes ont montré que des anticorps anti-CD81 pouvaient

inhiber l'infection de façon similaire, qu'ils soient ajoutés avant, pendant ou après l'incubation des cellules avec le VHC. Cela suggère soit, que le rôle primaire de CD81 n'est pas de participer à la liaison du virus à la surface cellulaire (Koutsoudakis *et al.*, 2006; Zeisel *et al.*, 2007), soit que son rôle s'étend au-delà. Une possible implication de CD81 au cours de la réplication a même été suggérée après observation que la réplication du VHC était efficace dans des cellules présentant des niveaux élevés de CD81 (Zhang *et al.*, 2010).

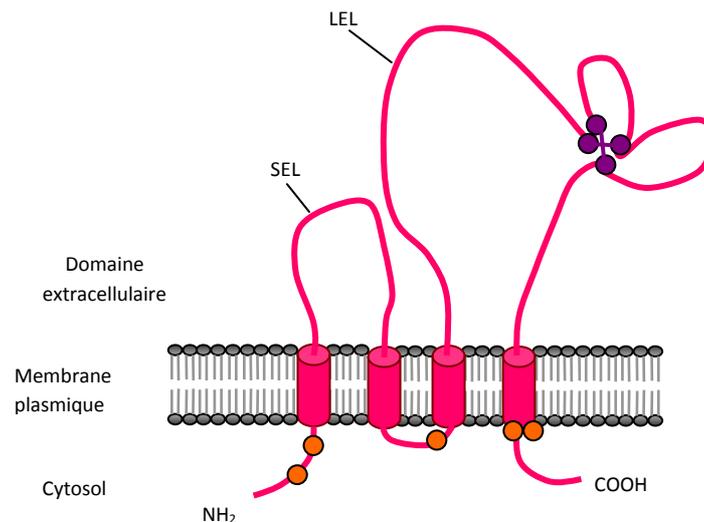


Figure 12 : Représentation schématique de CD81.

La tétraspanine CD81 est composée de quatre domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires (SEL et LEL) et d'une courte boucle cytosolique. Au sein de LEL se situent quatre résidus cystéines conservés, impliqués dans la formation de ponts disulfures et indiqués en violet sur le schéma. En orange sont représentés les résidus cystéines localisés dans le cytosol et possédant potentiellement un groupement palmytoyl.

➤ SRBI

SRBI est une glycoprotéine de 82 kDa, fortement exprimée dans les tissus hépatiques et stéroïdogéniques (Figure 13), particulièrement dans les régions adjacentes au flux sanguin, où elle participe à l'absorption sélective du cholestérol à partir des lipoprotéines de haute densité (HDL). Elle agit également comme un récepteur endocytaire, pour maintenir l'homéostasie lipidique dans les cellules hépatiques (Acton *et al.*, 1996; Connelly *et al.*, 1999). Cette protéine est exprimée dans la majorité des cellules mammaliennes, mais son expression est particulièrement forte dans le foie (Bartosch *et al.*, 2003b). SRBI a été initialement identifiée comme un facteur putatif de liaison à E2 via son domaine hypervariable 1 (HVR1) (Bartosch *et al.*, 2005). L'implication de SRBI dans l'entrée du VHC a été suggérée par sa capacité à se

lier à une forme soluble de E2 (Scarselli *et al.*, 2002). Ce rôle a été confirmé plus tard par l'inhibition de l'infection par le VHC avec des anticorps anti-SRBI et en inhibant l'expression de la protéine dans des lignées cellulaires ou des cultures primaires d'hépatocytes humains (Bartosch & Dubuisson, 2010; Dubuisson *et al.*, 2008; Helle & Dubuisson, 2008; Régeard *et al.*, 2008). Les résidus de SRBI potentiellement impliqués dans la liaison avec E2 ont récemment été identifiés dans son ectodomaine (Catanese *et al.*, 2010). En effet, les acides aminés 70-87 et le résidu E210 sont requis pour la reconnaissance de E2. L'épissage alternatif du transcrit conduit à la production de SRBII qui diffère de SRBI seulement dans son domaine C-terminal. Le domaine C-terminal de SRBII participerait à l'internalisation rapide et à la localisation intracellulaire de la protéine. L'extrémité C-terminale de SRBI a été montrée comme jouant un rôle dans l'entrée du VHC (Dreux *et al.*, 2009a). En plus de la liaison directe de la forme soluble de E2 avec SRBI, il a également été suggéré que le virus pouvait se lier à SRBI via sa composition lipoprotéique (Maillard *et al.*, 2006). De plus, l'effet activateur des HDL sur l'infection du VHC, et l'observation que des mutations dans SBRI (conduisant à l'inhibition de la fixation des HDL et du transfert lipidique) perturbaient également l'infection par le VHCpp (Dreux *et al.*, 2009a), confortent ce rôle fonctionnel de SRBI lié aux lipoprotéines, dans l'infection par le VHC.

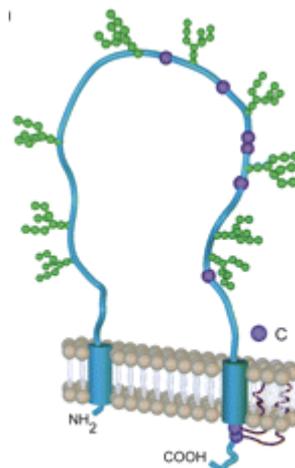


Figure 13 : Représentation schématique de SBRI.

SBRI est une protéine membranaire contenant deux domaines transmembranaires et une boucle extracellulaire. Elle présente 6 cystéines au sein de la boucle extracellulaire et 2 autres localisées au niveau de la queue C-terminale, pouvant être palmytoylées ou myristylées. Ces résidus cystéines sont indiqués en violet. Les acides aminés pouvant être modifiés par N-glycosylation sont représentés en vert. D'après (Cocquerel *et al.*, 2006).

Bien qu'il ait été suggéré que E2 puisse se lier à CD81 et SRBI (Heo *et al.*, 2006), la nature de cette interaction tripartite n'est pas claire, et les expériences sont compliquées par la

présence d'agrégats de ponts di-sulfures au niveau de E2. Une hypothèse serait que l'association du virus avec SRBI pourrait déclencher un réarrangement membranaire ou cytoplasmique qui apporterait le complexe VHC-SRBI à proximité des autres facteurs cellulaires.

➤ **Claudine-1**

La Claudine-1 est une protéine de 23 kDa (Figure 14) et appartient à la famille des claudines, qui compte 24 membres. Les claudines jouent un rôle essentiel dans la formation et le maintien des jonctions serrées dans les cellules épithéliales et endothéliales. La première étude à faire cas de l'implication de la Claudine-1 dans l'entrée du VHC a été réalisée en 2007 par Evans et ses collaborateurs. Grâce à une approche d'expression de gènes par clonage itératif et à l'utilisation d'un anticorps anti-Claudine-1, l'équipe a montré que la Claudine-1 était importante pour l'entrée virale, probablement dans les étapes tardives de l'entrée, après l'attachement du virus et l'interaction avec CD81 (Evans *et al.*, 2007). Par la suite, plusieurs équipes ont également mis en évidence des interactions directes entre les tétraspanines et les claudines, soutenant ainsi un modèle où les complexes CD81-Claudine-1 participent à l'internalisation du VHC (Brazzoli *et al.*, 2008; Cukierman *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2010). Cette implication dans l'internalisation semble confirmée car l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-Claudine-1 permet de neutraliser l'étape de post-attachement de l'infection virale (Fofana *et al.*, 2010; Krieger *et al.*, 2010).

Les Claudines-6 et -9 ont également été impliquées dans l'entrée du VHC (Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007) ; cependant, leurs niveaux d'expression dans le foie et dans des hépatocytes humains primaires sont faibles et leur pertinence physiologique pour l'entrée *in vivo* du VHC n'est pas encore clairement établie.

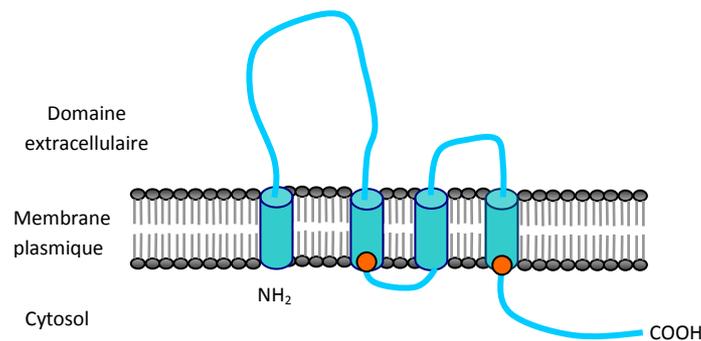


Figure 14 : Représentation schématique de la Claudine-1.

La Claudine-1 possède 4 domaines transmembranaires, une courte séquence N-terminale cytosolique, deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire et un domaine C-terminal cytosolique. Les sites de palmytoylation sont représentés en orange. D'après (Van Itallie & Anderson, 2006).

➤ Occludine

L'Occludine est une protéine transmembranaire de 65 kDa et un constituant majeur des jonctions serrées hépatiques (Figure 15). Bien que la présence de SRBI, CD81 et la Claudine-1 soit essentielle pour l'infection, ces protéines sont insuffisantes pour permettre une infection par le VHC dans des cellules non permissives. En 2009, l'Occludine a été identifiée comme la quatrième molécule de la cellule hôte requise pour l'entrée du VHC (Benedicto *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Ploss *et al.*, 2009). Plus récemment, Dorner et ses collègues ont rapporté que l'expression de l'Occludine, de SRBI, de la Claudine-1 et de CD81 humaines dans du foie murin confèrent la susceptibilité à l'entrée du VHC dans les hépatocytes (Dorner *et al.*, 2011). Michta *et al.* ont identifié la seconde moitié du domaine extracellulaire 2 de l'Occludine comme étant importante pour l'infectivité du VHC (Michta *et al.*, 2010).

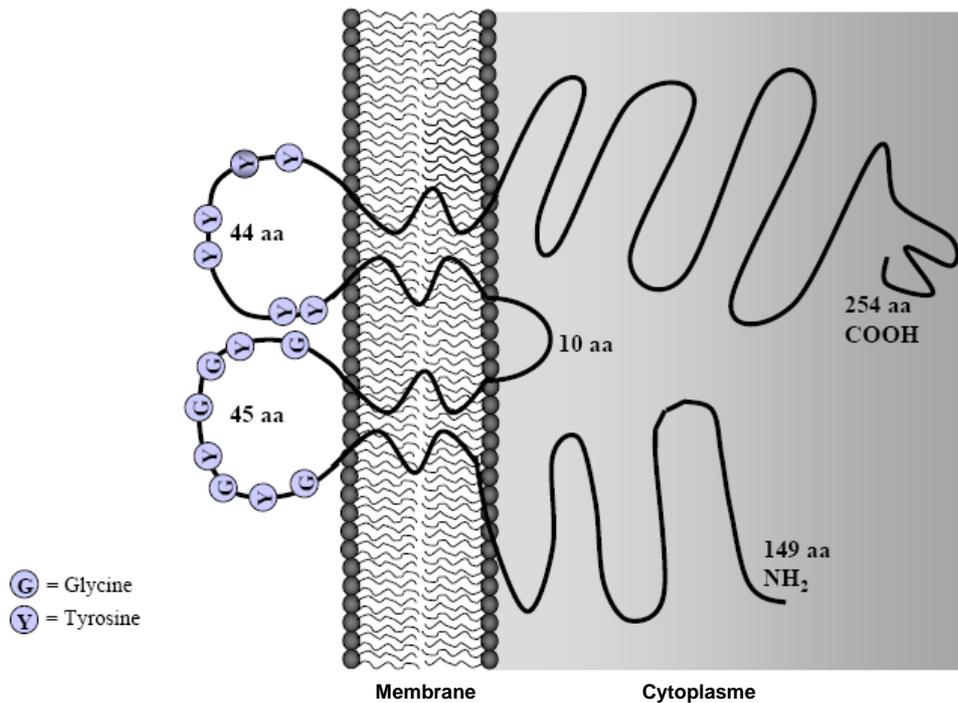


Figure 15 : Représentation schématique de l'Occludine.

L'Occludine possède 4 domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire. Ses régions en N- et C-terminale sont cytoplasmiques. aa : acide aminé. D'après (Feldman *et al.*, 2005).

L'Occludine est essentiellement exprimée à la membrane apicale des hépatocytes dans un foie normal, et contrairement à la Claudine-1, l'expression est minimale à la surface basolatérale (Mee *et al.*, 2008). L'expression de l'Occludine dans les hépatocytes, de même que l'entrée du VHC sont augmentées lors d'un traitement aux glucocorticoïdes (Ciesek *et al.*, 2010) ; tandis que l'expression de l'Occludine est régulée à la baisse lors de l'infection par le VHC, afin de prévenir une surinfection (Liu *et al.*, 2009).

➤ **D'autres récepteurs candidats : EGF-R EphA2 et NPC1L1**

En 2011, l'équipe dirigée par Thomas Baumert a mis en évidence le rôle de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) dans l'entrée du VHC. Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGF-R : Epidermal Growth Factor Receptor) et celui de l'Ephrine A2 (EphA2 : Ephrin receptor A2) sont des RTKs fortement exprimés dans le foie. Leur inhibition par l'ARN interférence ou par des inhibiteurs de protéines kinases cliniquement approuvés (Erlotinib et Dasatinib, respectivement) induit une diminution de l'entrée et de l'infection virales. Ces deux récepteurs réguleraient la formation des complexes CD81-Claudine-1, complexes nécessaires à l'entrée virale (Lupberger *et al.*, 2011). Plus récemment, Diao *et al.*

ont proposé que CD81 co-internalise avec l'EGF-R et que ce soit cette étape qui soit bloquée par les inhibiteurs d'EGF-R. La liaison directe de la particule virale avec CD81 induirait l'activation et l'internalisation de l'EGF-R, sans implication apparente de la Claudine-1. Cette internalisation serait critique pour l'entrée virale (Diao *et al.*, 2012). Plus récemment, Kim *et al.* ont suggéré que la MAP kinase MKNK1 agirait en aval de EGF-R, pour faciliter l'entrée virale (Kim *et al.*, 2013). Une autre étude a identifié la GTPase HRas comme étant nécessaire à l'entrée du VHC. Elle serait activée en aval de la signalisation d'EGF-R et serait un transducteur de signal clé chez l'hôte dans l'entrée virale induite par l'EGF-R. Cette protéine HRas s'associerait avec CD81 et la Claudine-1, et sa signalisation serait requise pour la diffusion latérale de CD81 à la membrane, ce qui permettrait l'assemblage de cette dernière avec la Claudine-1 (Zona *et al.*, 2013).

En 2012, Sainz *et al.* ont identifié le récepteur d'absorption du cholestérol, Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) comme un nouveau facteur impliqué dans l'entrée du VHC (Sainz *et al.*, 2012). NPC1L1 est un récepteur du cholestérol, exprimé à la surface des cellules intestinales et des hépatocytes humains. Il est responsable de l'absorption cellulaire du cholestérol et de l'homéostasie du cholestérol dans tout l'organisme (Altmann *et al.*, 2004). Sainz *et al.* ont démontré que l'expression de NPC1L1 était nécessaire pour l'initiation de l'infection. Ils ont également montré le rôle de ce récepteur dans l'infection *in vivo* du VHC. En utilisant l'ézétimibe, un inhibiteur de la fonction de NPC1L1, sur des souris immunodéficientes dont le foie a été repeuplé avec des hépatocytes humains, ils ont constaté que cette molécule retardait l'établissement de l'infection par le VHC. L'implication de NPC1L1 dans l'entrée du VHC pourrait intervenir dans une étape de post-fixation (Sainz *et al.*, 2012).

En résumé, les protéines d'enveloppe du VHC peuvent interagir avec de nombreux partenaires cellulaires à la surface de la cellule hôte. Les particules virales sont sous la forme de lipovirions, issues de la liaison entre les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC et les lipoprotéines cellulaires enrichies en triglycérides, cholestérol, et plusieurs apolipoprotéines (Aizaki *et al.*, 2008; André *et al.*, 2002). La circulation des lipovirions et leur capacité à servir de médiateur à l'infection implique que les voies de transport des lipides peuvent être engagées dans le ciblage du foie par le VHC.

En conclusion, dans un procédé coordonné comportant plusieurs étapes, le VHC s'attacherait d'abord aux GAGs. Ensuite, il se lierait au LDL-R, SRB1 et CD81 à la surface des hépatocytes, puis il interagirait avec la Claudine-1 et l'Occludine dans les jonctions serrées,

avant d'être endocyté. EGF-R et EphA2 favoriseraient alors l'association CD81-Claudine-1, ainsi que la fusion membranaire. NPC1L1 pourrait quant à lui favoriser l'entrée du VHC, soit directement par l'interaction avec le cholestérol des lipoviriparticules, soit indirectement par modulation de l'homéostasie du cholestérol (Figure 16). Avec une telle diversité de facteurs cellulaires impliqués, la poursuite du décryptage de l'entrée virale est donc nécessaire, afin d'étudier avec plus de précisions l'implication de chacun des récepteurs candidats et de déterminer les cascades d'évènements permettant une infection productive.

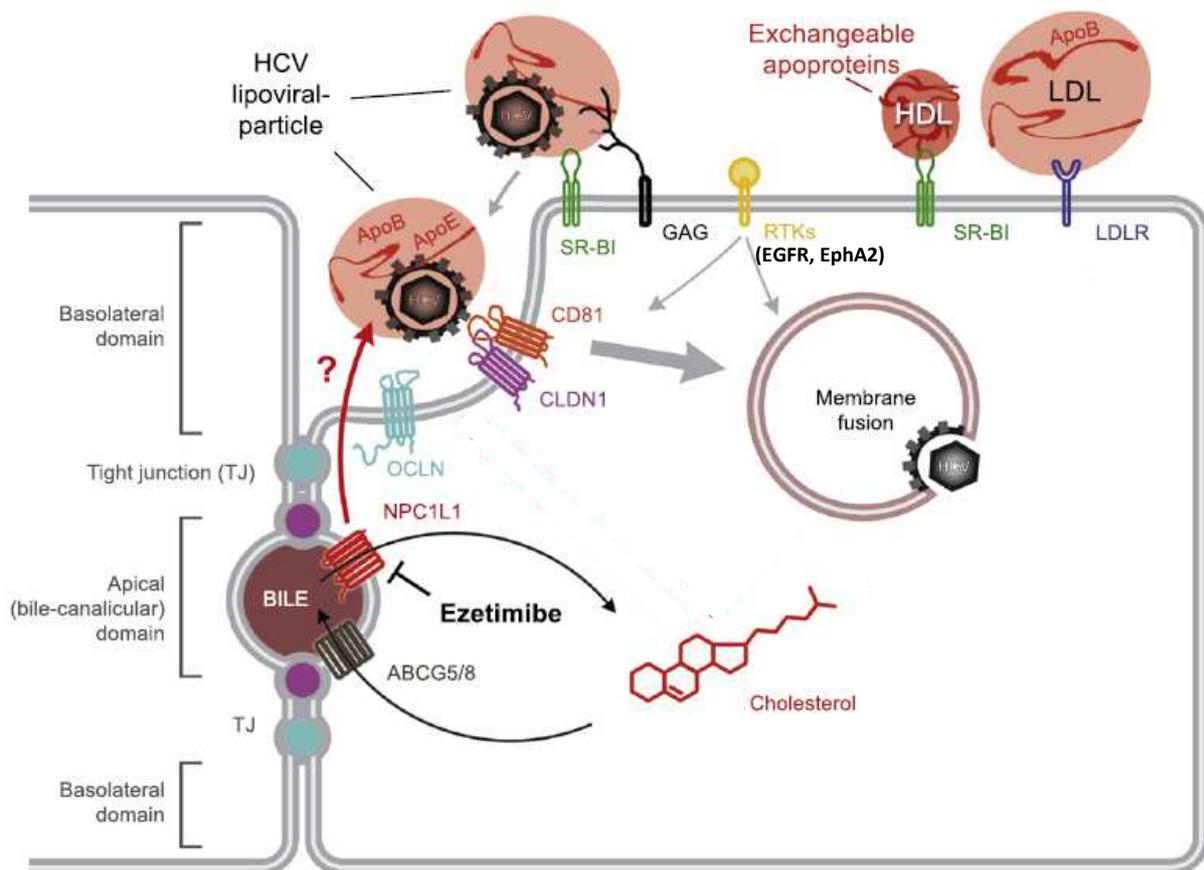


Figure 16 : Potentiels rôles fonctionnels de NPC1L1, de l'EGF-R et de l'EphA2 dans l'entrée du VHC.

La majorité des NPC1L1 est localisée à la surface apicale (canalicules biliaires). Le VHC se lierait aux glycosaminoglycanes, et l'entrée virale serait induite par SRBI, CD81, la Claudine-1, l'Occludine, ainsi que les récepteurs à activité tyrosine kinase (EGF-R et EphA2) qui favoriseraient l'association CD81- Claudine-1 et la fusion membranaire. NPC1L1 pourrait favoriser l'entrée du VHC, soit directement par l'interaction avec le cholestérol des lipoviriparticules, soit indirectement par modulation de l'homéostasie du cholestérol. Modifiée de (Lupberger *et al.*, 2012).

2. Internalisation du virus et fusion entre membranes virales et cellulaires

L'utilisation d'inhibiteurs de l'acidification des endosomes tels que la bafilomycine A1, la concanamycine A ou le chlorure d'ammonium, a permis de montrer que l'entrée des VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003b; Hsu *et al.*, 2003) et des VHCcc (Blanchard *et al.*, 2006; Koutsoudakis *et al.*, 2006) était dépendante du pH. Ceci suggère que le VHC entre dans ses cellules cibles par endocytose. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou de l'ARN interférence a permis de montrer que l'entrée du VHC se déroule via une voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006). Plus récemment, il a été montré un rôle des microtubules dans le trafic intracellulaire du VHC, suite à son internalisation par endocytose (Roohvand *et al.*, 2009). Un système de fusion entre les VHCpp et des liposomes a permis de montrer que la fusion est dépendante de la température (Lavillette *et al.*, 2006). Elle ne nécessite pas la présence de protéines à la surface des liposomes mais pourrait être facilitée par la présence de cholestérol (Haid *et al.*, 2009). Ce modèle de fusion a permis de montrer la participation d'une région de E1 correspondant aux résidus 270 à 284 et deux régions de E2 correspondant aux résidus 416 à 430 et 600 à 620 dans le mécanisme de fusion du VHC (Lavillette *et al.*, 2007). D'autre part, il a été montré que la mutation de certains résidus des domaines transmembranaires de E1 et E2 altère la propriété de fusion de ces glycoprotéines d'enveloppe (Ciczora *et al.*, 2007).

C. Traduction du génome viral et clivage de la polyprotéine

Comme d'autres virus à ARN simple brin positif, le génome du VHC est directement traduit lors de la libération du génome viral dans le cytoplasme. La machinerie ribosomale de la cellule hôte est utilisée à cet effet. Contrairement à l'ARNm cellulaire, la traduction de l'ARN du VHC n'est pas dépendante de la coiffe. Au lieu de cela, la traduction se produit après la liaison de la sous-unité ribosomique 40S au domaine II de l'IRES, permettant le recrutement du facteur d'initiation eucaryote eIF3 et l'assemblage ultérieur d'un complexe ribosomal complet qui traduit alors le génome viral en polyprotéine (Figure 17) (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992). La polyprotéine, ancrée dans le RE est ensuite clivée en au moins 10 protéines virales par une peptidase cellulaire et deux protéases virales. La plupart de ces clivages ont lieu de manière concomitante à la traduction, à l'exception des clivages entre E2 et p7 et entre p7 et NS2 qui sont retardés, conduisant parfois à des clivages incomplets (Santolini *et al.*, 1994).

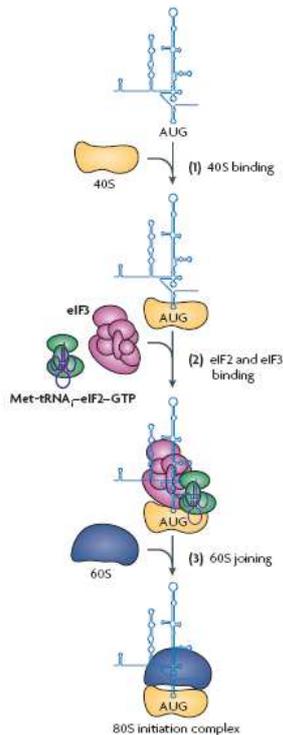


Figure 17 : Représentation schématique du rôle de l'IRES du VHC dans l'assemblage des complexes ribosomiques et l'initiation de la traduction. Adaptée de (Fraser & Doudna, 2007).

D. Réplication de l'ARN viral, assemblage et sécrétion des néovirions

La traduction du génome du VHC et le clivage de la polyprotéine entraîne la libération des protéines virales et l'initiation de la formation du complexe de réplication virale. Ce complexe de réplication serait formé dans les structures membranaires modifiées du RE, appelé réseau membranaire (Gosert *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003). La formation de ce réseau membranaire pourrait être médiée par la protéine NS4B (Egger *et al.*, 2002). Le complexe de réplication contient la machinerie cellulaire complète nécessaire à la réplication de l'ARN viral (Egger *et al.*, 2002; WARIS *et al.*, 2004). De façon similaire à d'autres virus à ARN simple brin positif, le génome du VHC est transcrit en un ARN intermédiaire de polarité négative qui servira de matrice pour la synthèse d'ARN de polarité positive (Fong *et al.*, 1991; Lohmann *et al.*, 1999). Récemment, il a été démontré que les ARN négatifs et positifs formaient un ARN double brin intermédiaire qui subit un déplacement de brin pour produire des brins naissants (Targett-Adams *et al.*, 2008). La synthèse de l'ARN de polarité négative ainsi que l'ARN de polarité positive est catalysée par la polymérase virale ARN dépendante NS5B, qui a le

potentiel de synthétiser de longues molécules d'ARN sans qu'il n'y ait besoin d'autres facteurs cellulaires ou viraux (Lohmann *et al.*, 1997).

Plusieurs études ont rapporté que le VHC pouvait perturber la voie autophagique afin d'induire l'accumulation d'autophagosomes dans les cellules hépatiques. En effet, plusieurs laboratoires indépendants ont rapporté que les protéines d'autophagie comme Atg4, Atg5, Atg7 et Atg12, sont nécessaires pour une infection virale productive (Dreux *et al.*, 2009b; Guevin *et al.*, 2010; Ke & Chen, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011). L'étude de chaque étape du cycle de vie du VHC suggère que ces protéines modulent spécifiquement l'initiation de la traduction de l'ARN du VHC et par conséquent, la mise en place de la réplication du VHC (Dreux *et al.*, 2009b). Cette observation a été confirmée plus tard par d'autres études indépendantes (Guevin *et al.*, 2010; Ke & Chen, 2011). Une autre étude suggère que la réplication de l'ARN viral prendrait initialement place dans les membranes autophagosomales de cellules contenant un réplicon VHC de génotype 1b (Sir *et al.*, 2012).

Les mécanismes entourant les étapes ultérieures de la production des particules virales demeurent mal connus. Il a été démontré que la protéine de capsid était présente à la surface des gouttelettes lipidiques qui colocalisent avec les complexes de réplication (Miyanari *et al.*, 2007). La perturbation de l'interaction entre les gouttelettes lipidiques et la protéine de capsid réduit la production de particules virales infectieuses (Boulant *et al.*, 2007). Les ARN viraux nouvellement synthétisés et destinés à servir de génomes aux nouveaux virions interagissent avec la protéine de capsid associée aux gouttelettes lipidiques, induisant ainsi son oligomérisation et conduisant à la formation de nucléocapsides. Ces nucléocapsides acquièrent alors une enveloppe dérivée de membranes cellulaires portant les glycoprotéines virales (Nakai *et al.*, 2006; Suzuki, 2011; Tanaka *et al.*, 2000) (Figure 18). Outre les protéines structurales, les protéines non structurales jouent également un rôle important dans l'assemblage viral. Il a été démontré que certaines mutations dans NS5A, abolissant son interaction avec les gouttelettes lipidiques réduisaient la production de particules infectieuses (Miyanari *et al.*, 2007). D'autres études ont démontré d'importantes interactions entre NS5A et la protéine de capsid, interactions essentielles pour l'assemblage (Appel *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008). De même, plusieurs publications ont rapporté l'implication de NS2 et NS3 dans l'assemblage (Dentzer *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2008).

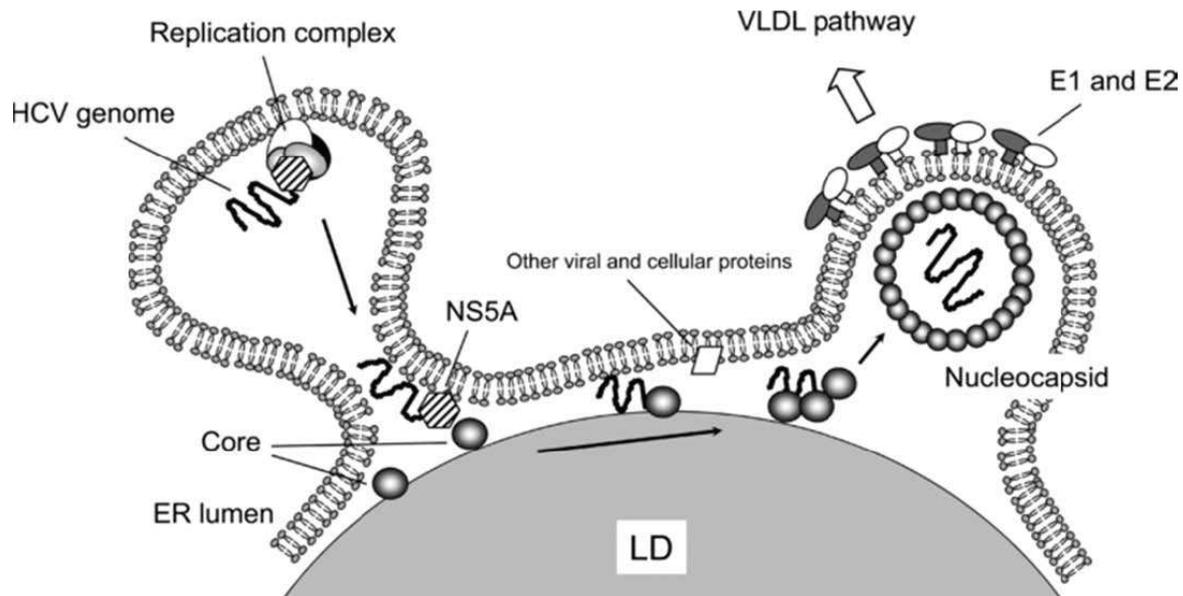


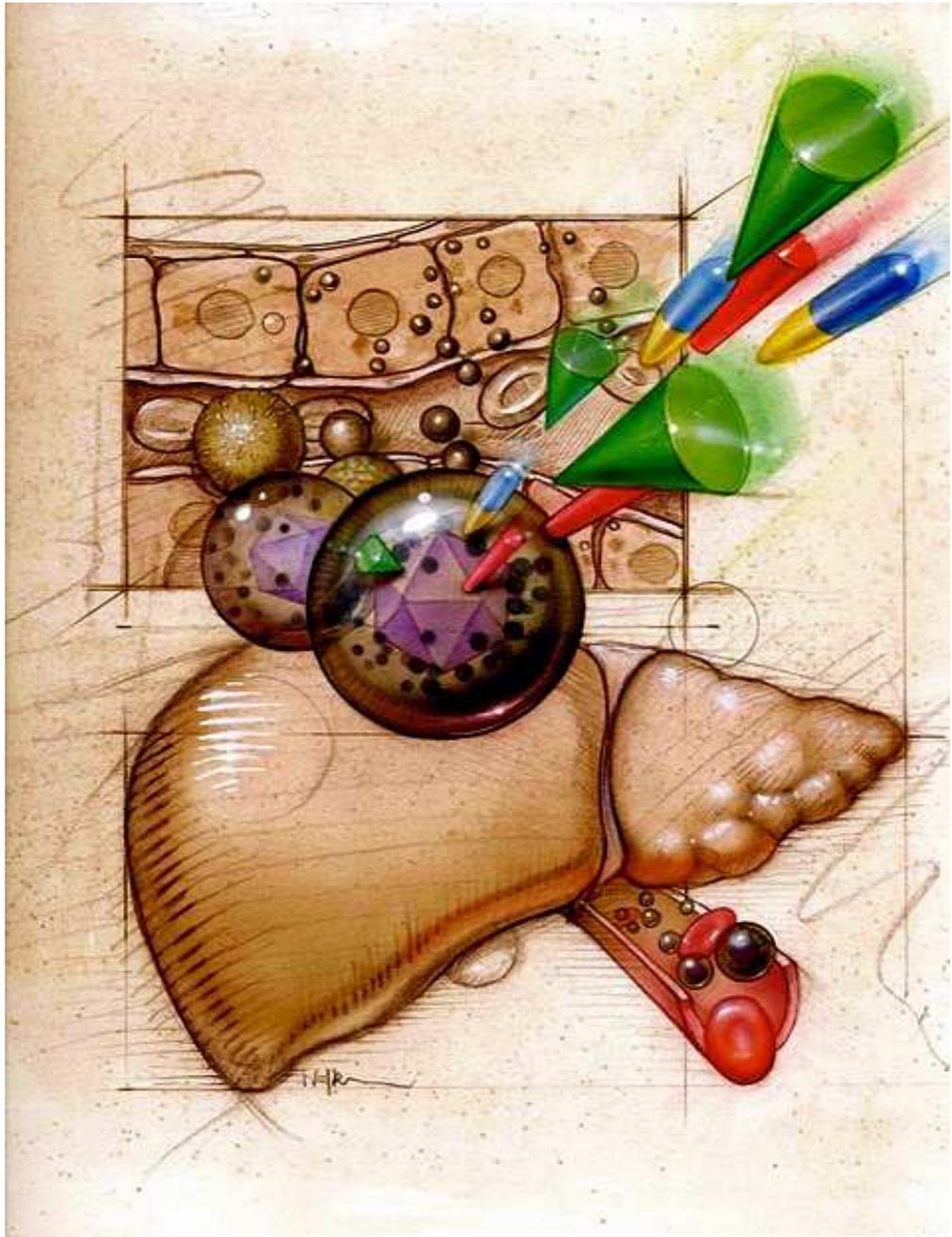
Figure 18 : Assemblage des particules virales.

Les ARN génomiques nouvellement synthétisés entrent en contact avec la protéine de capsid associée aux gouttelettes lipidiques, probablement par l'intermédiaire d'une interaction entre la protéine de capsid et NS5A. Cette interaction de l'ARN génomique avec la protéine de capsid conduit à son encapsidation et la formation de la nucléocapsid. Puis, par des mécanismes encore inconnus, E1 et E2 sont ajoutés à la nucléocapsid et les virions sont ensuite exportés vers la surface cellulaire.

Les virions nouvellement synthétisés sont ensuite exportés vers la surface cellulaire via un mécanisme encore inconnu et libérés dans le milieu extracellulaire. Peu de choses sont connues sur la maturation et l'export des virions après l'assemblage de la nucléocapsid et l'acquisition de leur enveloppe. Certaines études ont suggéré que le VHC pourrait exploiter la voie de synthèse et de sécrétion des LDL/VLDL afin de transporter les virions dans le milieu extracellulaire (Chang *et al.*, 2007).

Chapitre 2 :

Les stratégies thérapeutiques



Bonnie Hofkin, pour l'American Association for the Study of Liver Diseases

Le rapport 2010 de l'OMS a établi qu'environ 2,7 % de l'ensemble des décès dans le monde sont imputables à des cirrhoses et des hépatocarcinomes, ce qui représente environ 1,4 millions de personnes. Les infections par les virus hépatotropes du VHB et du VHC contribuent pour une large part à ces pathologies hépatiques. Plus particulièrement, 27% des cirrhoses et 25% des hépatocarcinomes se sont développés à la suite d'une infection par le VHC (Perz *et al.*, 2006). Ces données alarmantes, ainsi que l'absence d'un vaccin thérapeutique expliquent les efforts fournis pour mettre au point des traitements efficaces contre l'Hépatite C.

I. Traitements actuels

Le traitement standard contre l'infection par le VHC est basé sur l'association de l'interféron α (IFN- α) avec la ribavirine. C'est en 1991 que l'utilisation en monothérapie de l'IFN- α a été approuvée pour le traitement de l'hépatite C. Cependant, le taux de réponse virologique soutenue (RVS) était inférieur à 20%. En 1998, l'ajout de la ribavirine a permis d'améliorer ce taux, qui passe alors à 34-42%. La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine et possède des propriétés antivirales sur les virus à ARN et ADN. En 2001, le développement d'une forme stabilisée de l'IFN (IFN pégylé) a augmenté le taux de RVS à 50%. Bien que la thérapie combinée permette d'obtenir des taux de RVS d'environ 80% chez les patients infectés avec du VHC de génotype 2 ou 3 et de 40-50% chez ceux infectés avec du génotype 1 ou 4 (Fried *et al.*, 2002; Manns *et al.*, 2001), ces chiffres sont en deçà des attentes, et sont affectés entre autres par les nombreux effets secondaires, qui contraignent souvent à l'arrêt du traitement.

Les récents progrès dans la compréhension du cycle de vie du VHC, couplés au développement de systèmes de culture ont radicalement changé le paysage du traitement de l'hépatite chronique C. En effet, en Mai 2011, les 2 premiers antiviraux à action directe, le télaprévir et le bocéprévir ont été approuvés aux Etats-Unis et en Europe. Ils sont alors utilisés en combinaison avec l'IFN- α pégylé et la ribavirine pour le traitement de l'infection par le VHC de génotype 1, génotype le plus répandu en Europe et en Amérique du Nord, mais aussi le moins répondeur au traitement standard. Ces deux antiviraux sont des inhibiteurs de la protéase virale NS3/4A, une protéine clé dans le cycle du VHC. Leur association au précédent

traitement standard permet d'augmenter significativement le taux de RVS. Cependant, ils ne sont pas appropriés pour la monothérapie en raison de la sélection rapide de variants viraux résistants (Flint *et al.*, 2009; Reesink *et al.*, 2006; Susser *et al.*, 2009). Par conséquent, l'effet antiviral de la thérapie standard (IFN- α pégylé et ribavirine) demeure essentiel pour l'obtention d'une RVS. De plus, ces deux molécules présentent aussi des effets secondaires : le télaprévir est associé au développement d'une éruption cutanée, et le bocéprévir à une agueusie. Les deux antiviraux conduisent chacun à une anémie prononcée et ce, en plus des effets indésirables couramment associés à l'IFN (syndrome pseudo-grippal, dépression, leucopénie et thrombopénie, dysthyroïdie) et la ribavirine (anémie hémolytique).

II. Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

Les avancées les plus intéressantes dans le champ de l'hépatite virale sont sans doute liées au développement des médicaments anti-VHC. En effet, les infections par le VHC sont les seuls exemples d'infections virales chroniques qui puissent être totalement éliminées par traitement chez un patient. Depuis quelques années donc, d'importants efforts sont déployés afin de fournir des thérapies efficaces, complémentaires au traitement actuellement proposé. Les prototypes antiviraux sont alors testés pour leur capacité à contrôler la réplication virale, pour leur biodisponibilité et enfin pour leur non-toxicité.

A. Les nouveaux interférons

De nouvelles molécules d'IFN- α sont aujourd'hui en cours de développement pré-clinique et clinique. La molécule la plus prometteuse semble être l'IFN- α lié à l'albumine : l'albuféron. Administré toutes les deux semaines en association avec la ribavirine, l'albuféron fait au moins aussi bien et peut-être mieux que l'IFN- α pégylé, à 12 ou 24 semaines de traitement (Nelson *et al.*, 2010; Zeuzem *et al.*, 2010) chez des patients infectés par du VHC de génotype 1, 2, ou 3 (patients VHC-1, VHC-2 ou VHC-3). Il est cependant nécessaire d'attendre les résultats en termes de réponse virologique prolongée des études de phase II en cours et des

études de phase III en projet pour identifier quelle sera la place de cette molécule en pratique clinique.

B. Les alternatives à la ribavirine

Nombreuses il y a quelques années, les alternatives à la ribavirine se sont réduites à la seule viramidine (ou taribavirine), pro-drogue de la ribavirine, transformée en ribavirine préférentiellement dans les hépatocytes du fait de leur richesse en désaminases. En phase III d'étude clinique, elle a montré une efficacité significativement supérieure à celle de la ribavirine en termes de réponse virologique prolongée en association avec l'IFN- α pégylé. L'incidence de l'anémie hémolytique était significativement inférieure à celle observée avec la ribavirine. En effet, la drogue se concentre dans le foie et cible les hépatocytes, tout en minimisant sa distribution dans les globules rouges et par conséquent le développement d'une anémie hémolytique (Benhamou *et al.*, 2009; Deming & Arora, 2011; Marcellin *et al.*, 2010). Il sera indispensable d'évaluer l'efficacité de la viramidine à de plus fortes doses, en combinaison avec l'IFN- α pégylé. Une tolérance équivalente à celle de la ribavirine, c'est-à-dire une même incidence d'anémie hémolytique, serait acceptable si l'utilisation de plus fortes doses de viramidine permettait d'augmenter significativement les taux de guérison.

C. Les inhibiteurs spécifiques du VHC

Ces molécules inhibent une des étapes du cycle viral et empêchent la production de particules virales par les hépatocytes infectés. En principe, chaque étape du cycle de vie du VHC incluant l'attachement aux récepteurs, l'endocytose, la traduction, le clivage de la polyprotéine, la réplication virale, ou encore la maturation et le relargage des particules virales peut être une cible pour de nouvelles molécules antivirales. Jusque-là, seules des molécules ciblant les deux étapes majeures du cycle du VHC ont atteint la phase de développement clinique. Il s'agit des inhibiteurs de la protéase virale NS3/4A et ceux de réplication virale. Ces derniers comprennent les inhibiteurs nucléot(s)idiques et non nucléot(s)idiques de la polymérase NS5B, ainsi que les inhibiteurs de NS5A, protéine jouant un rôle régulateur dans la réplication. A ce jour, les molécules les plus puissantes chez l'Homme sont les inhibiteurs de la protéase NS3/4A.

1. Les inhibiteurs de la protéase virale NS3/4A

NS3, associée à son cofacteur NS4A, présente une activité sérine-protéase dans son tiers N-terminal qui va cliver la polyprotéine virale en 4 protéines non structurales. Bloquer ce clivage inhibe par conséquent la réplication virale. Il existe deux catégories d'inhibiteurs de la protéase : les alpha-cétoamines comme le télaprévir et le bocéprévir, et les composés macrocycliques comme le danoprévir, le vaniprévir et le siméprévir. Tous ces composés sont actifs contre le VHC de génotype 1. Ils ont une efficacité similaire contre les génotypes 2a, 5a et 6a, mais ont comparativement une faible efficacité contre les isolats de génotype 3a.

Parmi les molécules dirigées contre NS3/4A, BILN-2061 a été le premier inhibiteur évalué dans des essais cliniques. Ce tripeptide a été sélectionné pour ses caractéristiques pharmaceutiques (administration par voie orale, pharmacocinétique) et son efficacité sur un système de réplication *in vitro* (le réplicon) de génotype 1b (Llinàs-Brunet *et al.*, 2004). Une étude pilote très encourageante a montré une réduction de 2 à 3 log du titre viral chez des patients après 2 jours de traitement (Lamarre *et al.*, 2003). Cependant, cet antiviral s'est avéré avoir une toxicité cardiaque après administration chez des animaux et son développement n'a pas été poursuivi.

Le vaniprévir est actif contre les génotypes 1 et 2 (McCauley *et al.*, 2010) et a été sélectionné pour un développement clinique chez les patients (Liverton *et al.*, 2010). En phase II d'essai clinique, sa combinaison avec le traitement standard pendant 4 semaines a permis d'augmenter le taux de réponse virologique rapide (Manns *et al.*, 2012).

Le danoprévir est un inhibiteur puissant et sélectif de NS3/4A du VHC. Les données précliniques ont montré que cette drogue se liait avec une forte affinité à NS3 et ne s'en dissociait que lentement, permettant ainsi une plus grande exposition au foie. Dans un essai clinique de phase II, la combinaison pendant 14 jours du danoprévir avec l'IFN- α pégylé et la ribavirine chez des sujets VHC-1 et n'ayant reçu aucun traitement préalable a conduit à une activité antivirale accrue, sans effets secondaires majeurs (Forestier *et al.*, 2011).

Le siméprévir a quant à lui une puissante activité *in vitro* contre les génotypes 1a et 1b et l'effet additif et synergique qu'il dispense avec d'autres agents anti-VHC (Lenz *et al.*, 2010) ouvre des perspectives pour de futures stratégies de combinaison. En association avec le traitement standard chez des patients VHC-1, une activité antivirale puissante et dose-dépendante est observée après 28 jours de traitement (Manns *et al.*, 2011) et une étude

clinique en phase II a démontré qu'une monothérapie avec cette molécule était efficace sur tous les génotypes du VHC, excepté le génotype 3 (Moreno *et al.*, 2012).

Le narlaprévir est une molécule structurellement apparentée au bocéprévir et au télaprévir, mais est intrinsèquement plus puissant dans l'inhibition de la protéase virale NS3/4A. Il conduit à une forte réduction de l'ARN viral et à un fort taux RVS quand il est associé au traitement standard chez des patients VHC-1 (de Bruijne *et al.*, 2010).

2. Les inhibiteurs de la phosphoprotéine NS5A

Le daclatasvir est le premier parmi les inhibiteurs de NS5A à avoir été testé. Il a une efficacité de l'ordre du picomolaire au nanomolaire contre les génotypes 1 à 5 du VHC et présente des effets additifs et synergiques avec des inhibiteurs de la protéase et de la polymérase virale (Gao *et al.*, 2010). En combinaison avec le traitement standard, il permet d'atteindre une RVS après 12 semaines de traitement (Pol *et al.*, 2011). Très récemment, Guedj *et al.* ont élucidé le mode d'action de cette molécule : à l'aide d'un modèle mathématique, les auteurs ont montré que le daclatasvir bloque la synthèse du virus et son assemblage hors de la cellule (Guedj *et al.*, 2013)

Le GS-5885, un autre inhibiteur de NS5A a montré une efficacité en phase I chez des patients infectés avec le génotype 1a et 1b, au cours de 3 jours de monothérapie (Lawitz *et al.*, 2012). La période de traitement a été étendue à 12 et 24 semaines dans une étude de phase II, en cours (Sulkowski *et al.*, 2012b).

3. Les inhibiteurs de la polymérase virale NS5B

Les données actuelles indiquent que les inhibiteurs de la polymérase ont une efficacité plus faible durant les monothérapies, comparés aux inhibiteurs de NS3/4A, mais montrent une efficacité plus large contre plusieurs génotypes et présentent une forte barrière de résistance virale. Les inhibiteurs nucléos(t)idiques ciblent la région catalytique hautement conservée. Après maturation par la machinerie cellulaire, les analogues de nucléosides entrent en compétition avec les nucléotides cellulaires et sont incorporés par la polymérase virale dans l'ARN en cours de synthèse. L'incorporation de ces nucléotides « terminateurs » induit l'arrêt de la synthèse de l'ARN viral. Ce système s'avère donc plus puissant et a des plus faibles taux de résistances que les inhibiteurs non nucléos(t)idiques. Ces derniers quant à eux interagissent avec la polymérase en dehors de son site catalytique, induisant ainsi des changements allostériques qui compromettent alors la formation du complexe NS5B, ainsi que sa fonction.

L'inhibiteur nucléos(t)idique le plus remarquable est le sofosbuvir. C'est l'inhibiteur le plus actif sur la réplication du VHC et a une activité pangénotypique (Murakami *et al.*, 2010). En 2012, un essai clinique de phase II a été réalisé avec le sofosbuvir en combinaison avec la ribavirine chez des patients VHC-2 ou VHC-3, n'ayant préalablement reçu aucun traitement. Vingt quatre semaines après la fin du traitement, le taux de RVS était de 100%. Utilisé en monothérapie, ce taux passait à 60%. Le même traitement a été réalisé chez des patients VHC-1 et conduit à des taux de RVS de 84%, 12 semaines seulement après l'arrêt du traitement (Gane *et al.*, 2013). Cette molécule présente donc un espoir pour le traitement futur contre le VHC-1, 2, et 3.

Deux autres inhibiteurs nucléos(t)idiques sont en phase de développement clinique : il s'agit de la méricitabine et de l'IDX184. En combinaison avec l'INF- α pegylé et la ribavirine, la méricitabine permet une réduction significative de l'ARN viral par rapport au traitement standard seul, résultant en une réponse virologique rapide d'environ 88% (Rodriguez-Torres *et al.*, 2008). Une étude très récente a confirmé ces résultats en montrant que, combiné au traitement standard, la méricitabine permettait d'atteindre des RVS de 56,8% au bout de 24 semaines de traitement chez des patients VHC-1 ou VHC-4, n'ayant préalablement reçu aucun traitement. Cette étude a aussi montré qu'un traitement de 24 semaines avec la méricitabine et le traitement standard était mieux toléré et plus efficace que 48 semaines de traitement standard seul (Pockros *et al.*, 2013).

La pharmacocinétique et la sécurité de l'IDX184 chez des sujets sains ont été récemment décrites : la bonne tolérance de la molécule, ainsi que des effets secondaires mineurs militent en faveur de la poursuite de futures évaluations cliniques sur des patients atteints d'hépatite C (Zhou *et al.*, 2011). Un an après ces premiers tests, la même équipe a évalué l'innocuité, l'activité antivirale et la pharmacocinétique de IDX184 en monothérapie pendant 3 jours chez des patients VHC-1 ; elle a observé une baisse significative de l'ARN viral (Lalezari *et al.*, 2012).

Plusieurs inhibiteurs non nucléos(t)idiques ont également entamé leur phase II de développement clinique. Le VX-222 a été le premier inhibiteur non nucléos(t)idique reporté. Au 4^{ème} jour de traitement, cette molécule était bien tolérée et conduisait à une réduction de l'ordre de 3 log de l'ARN viral, encourageant ainsi sa future évaluation en combinaison avec le traitement standard (Rodriguez-Torres *et al.*, 2010). Le filibuvir, un autre inhibiteur non nucléos(t)idique permet une réduction de l'ARN viral de l'ordre de 4 log, en combinaison

avec le traitement standard pendant 28 jours. Le pourcentage de patients arrivant à une réponse virologique rapide est de 75% environ (Jacobson *et al.*, 2009). Le tégobuvir montre un effet inhibiteur plus élevé sur les répliquons de génotype 1 que sur ceux de génotype 2 (Shih *et al.*, 2007). L'association de cette molécule avec l'IFN- α ou d'autres inhibiteurs de NS3/4A ou NS5B conduit à une activité antivirale additive (Vliegen *et al.*, 2007).

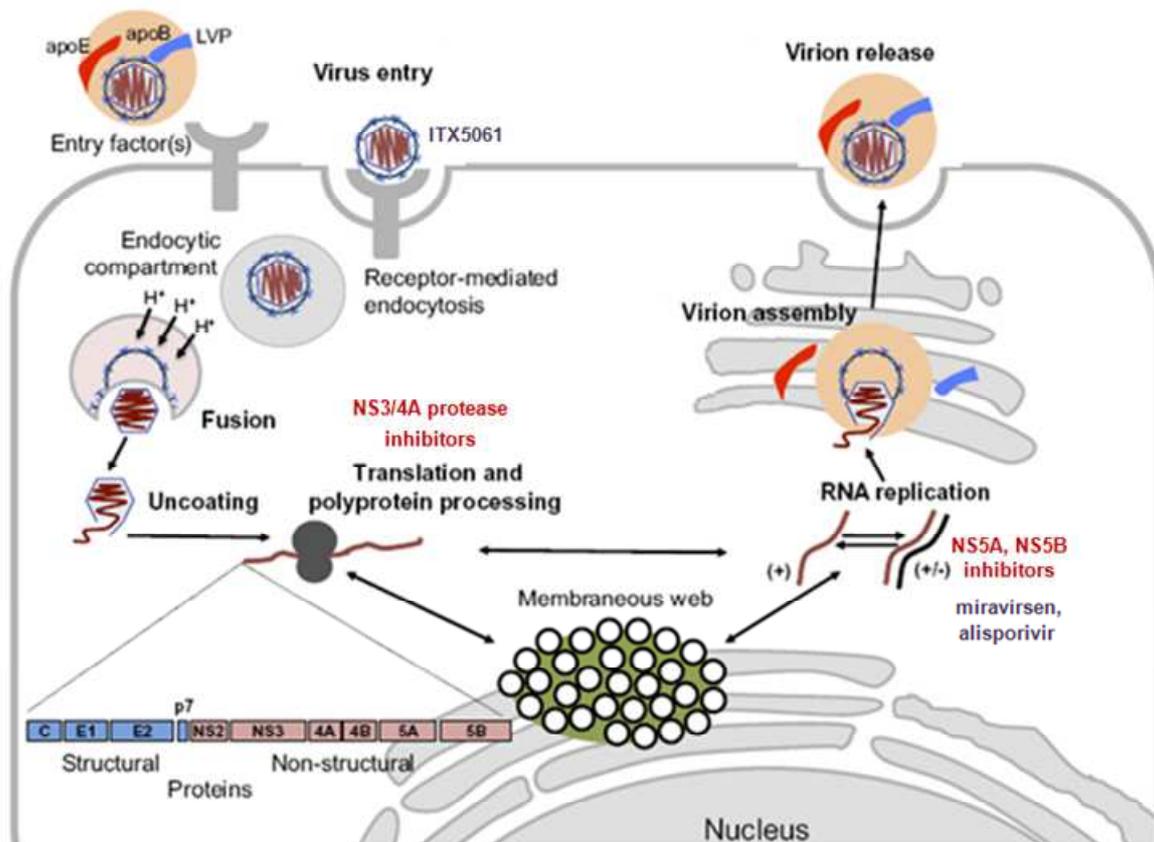


Figure 19 : Cycle biologique du VHC, zone d'intervention et classes d'inhibiteurs.

En rouge: antiviraux à action directe; en mauve: antiviraux ciblant l'hôte. Adaptée de (Ploss & Dubuisson, 2012).

III. Les combinaisons thérapeutiques

Le mode d'administration de l'IFN (injection) et ses nombreux effets secondaires associés font de l'élimination de l'IFN- α la prochaine étape majeure dans la thérapeutique anti-VHC. Cela pourrait passer par l'utilisation par voie orale, d'un ou plusieurs antiviraux à action directe (AAD). Les patients non répondeurs au traitement standard ou intolérants à l'interféron seraient les premiers bénéficiaires. Les stratégies dans les essais cliniques actuels se focalisent sur l'évaluation de différentes combinaisons d'AAD, avec ou sans ribavirine, car il devient de plus en plus clair qu'une monothérapie d'AAD ne pourrait pas suffire à éliminer le virus. La disponibilité de nombreuses drogues (environ 50) appartenant à des classes différentes stimulent ces différents essais, avec un seul espoir : une thérapie orale anti-VHC, et sans interféron! Le développement de multi-thérapies basées sur l'action synergique de divers antiviraux serait alors nécessaire, comme pour le traitement du VIH.

Cet objectif ambitieux semble réalisable car plusieurs essais cliniques en phase II et III, combinant plusieurs classes d'AAD sont actuellement en développement (Pawlotsky, 2011). La 1^{ère} étude de validation de ce concept de combinaison d'AAD a été réalisée en 2010. L'association de la méricitabine (inhibiteur nucléos(t)idique de NS5B) avec le danoprévir (inhibiteur de NS3/4A) réduisait efficacement le niveau d'ARN viral chez une large proportion de sujets VHC-1 sans traitement préalable. De plus, 25% des patients VHC-1 précédemment non-répondeurs présentaient des niveaux indétectables de l'ARN viral au 14^{ème} jour de traitement. En outre, aucune rechute n'a été observée au cours du traitement, suggérant que la méricitabine, qui possède une forte barrière de résistance pourrait avoir empêché l'émergence d'une résistance au danoprévir (Gane *et al.*, 2010).

Les premiers articles à rapporter des RVS suite à une combinaison d'AAD sans interféron ont associé le daclatasvir (inhibiteur de NS5A) et l'asunaprévir (inhibiteur de NS3/4A) (Chayama *et al.*, 2012; Lok *et al.*, 2012). Ces deux études incluaient des patients VHC-1 précédemment non répondeurs au traitement standard. La première équipe a comparé pendant 24 semaines un régime bithérapie (daclatasvir + asunaprévir) à un régime quadrithérapie (daclatasvir + asunaprévir + IFN- α pégylé + ribavirine). Le taux de RVS à 24 semaines était de 90% dans le cas de la quadrithérapie. Le taux de RVS de 36% obtenu dans le cadre de la bithérapie marque la validation de concept qu'une thérapie combinant des AAD pouvait effectivement traiter l'hépatite C, sans interféron, ni ribavirine (Lok *et al.*, 2012). Dans la 2^{ème} étude, seule la bithérapie a été utilisée chez des patients VHC-1b, avec 100% de RVS 24 semaines après

l'arrêt du traitement (Chayama *et al.*, 2012). Les données préliminaires d'une autre étude sur cette bithérapie chez des sujets VHC-1b ont conduit à des taux de RVS de 90% à 12 semaines, chez des patients précédemment non répondeurs (Suzuki *et al.*, 2012).

Contrairement à l'IFN- α pégylé et à la ribavirine, la sélection de variants viraux résistants aux AAD reste un problème majeur. En effet, bien que ces molécules permettent d'améliorer les taux de RVS et de diminuer la durée des traitements, leur utilisation soulève aussi des préoccupations au regard du développement de variants viraux résistants. La nature hautement répliquative du VHC avec environ 10^{12} nouvelles particules virales produites chaque jour chez un patient, couplé au manque d'activité correctrice de la polymérase virale résulte en la génération de tous les variants possibles, chaque jour. Ainsi, chaque patient est infecté par un « nuage » de quasi-espèces virales, composé de génomes viraux génétiquement distincts, mais étroitement liés (Pawlotsky, 2011). Des variants amino-acidiques associés à une résistance existent donc à des fréquences détectables chez une minorité de patients, avant même l'initiation d'un traitement avec les AAD. Toutefois, ces variants sont généralement moins performants en termes de répliquon et/ou de production de particules virales infectieuses et sont par conséquent présents en plus faibles quantités que le virus sauvage (Shimakami *et al.*, 2011).

En absence d'un traitement concomitant avec l'IFN- α et la ribavirine, ces variants viraux résistants aux drogues pourraient rapidement être sélectionnés et causer l'échec du traitement. D'ailleurs, l'apparition de ces variants résistants corrèle avec de faibles taux de réponse antivirale rapide, mettant une fois de plus en lumière l'importance de l'IFN- α et de la ribavirine pour prévenir l'émergence de résistances et l'apparition de rechutes dans les thérapies combinant les AAD. Récemment, Shi *et al.* ont en effet remarqué le développement d'une forte prévalence de variants résistants aux drogues dans des sera de souris traitées avec le BMS-605339 (inhibiteur de NS3/4A) et le BMS-788329 (inhibiteur de NS5A). Les auteurs ont également noté un enrichissement en variants pré-existants chez les souris traitées avec le BMS-821095 (inhibiteur non nucléos(t)idique de NS5B). Ces observations ont été faites 4 semaines après le début du traitement. En combinant le BMS-788329 et le BMS-605339 ou le BMS-821095, l'équipe a réussi à éradiquer le virus chez les souris infectées avec du génotype 1b, 8 et 7 semaines après l'arrêt du traitement, respectivement (Shi *et al.*, 2013).

Tableau 1 : Principales combinaisons thérapeutiques actuellement en cours

Combinaisons thérapeutiques	Génome viral	Traitement préalable	Durée	Nombre de patients	RVS 4 (%)	RVS 12 (%)	RVS 24 (%)	Références
<i>Sofosbuvir + Daclatasvir</i>	1a/1b	Non	24	15	100			(Sulkowski <i>et al.</i> , 2012a)
<i>Sofosbuvir + Daclatasvir</i>	2/3	Non	24	16	88	88		(Sulkowski <i>et al.</i> , 2012a)
<i>Sofosbuvir + Ribavirine</i>	1	Non	12	25	88			(Gane <i>et al.</i> , 2012)
<i>Daclatasvir + Asunaprévir + BMS-791325</i>	1	Non	12	16	94			(Everson <i>et al.</i> , 2012)
<i>Daclatasvir + Asunaprévir</i>	1a	Non répondeurs	24	21	91	91	91	(Suzuki <i>et al.</i> , 2012)
	1b	Intolérants/ inéligibles	24	22	86	64	64	(Suzuki <i>et al.</i> , 2012)
<i>Mélicitabine + Danoprévir + Ribavirine</i>	1a	Non	24	43		26		(Field J, <i>et al.</i> , 2012; Gane E, <i>et al.</i> , 2012)
	1b	Non	24	21		71		idem
		Répondeurs partiels	24	23	44			idem
		Non répondeurs	24	29	72			idem

RVS 4, 12, 24 : Réponse Virologique Soutenue à 4, 12 ou 24 semaines.

La principale leçon à tirer de toutes les données rapportées dans les différents essais utilisant les AAD est la suivante : la haute efficacité antivirale et une forte barrière de résistance sont des conditions indispensables pour tout éventuel traitement oral sans interféron, afin d'éviter l'échec thérapeutique précoce. Un obstacle majeur sur la voie d'une thérapie orale anti-VHC est l'activité antivirale génotype-dépendant des AAD (à l'exception des inhibiteurs nucléos(t)idiques de NS5B). La plupart de ces AAD ciblent le VHC de génotype 1, avec des implications pour les combinaisons d'AAD chez les patients infectés par les autres génotypes. Une façon de contourner ce problème serait d'utiliser des inhibiteurs ciblant des constituants de la cellule hôte, pertinents pour la réplication du VHC dans les hépatocytes.

Parmi les antiviraux ciblant l'hôte, le plus avancé et prometteur pour un traitement sans interféron et en association avec les AAD est l'alisporivir, molécule se liant à la cyclophiline A, une isomérase cellulaire requise pour la réplication et probablement l'assemblage du VHC (Watashi *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). L'alisporivir possède un mécanisme d'action avec une couverture large des génotypes 1 à 4 et une puissante activité anti-VHC. De plus, la sélection des variants résistants à l'alisporivir dans des réplicons de génotype 1b serait difficile : en moyenne 20 semaines nécessaires, contre moins de 2 semaines pour les inhibiteurs de la protéase NS3/4A et de la polymérase NS5B (Coelmont *et al.*, 2010). Une trithérapie constituée d'IFN- α pégylé, de ribavirine et de l'alisporivir pendant 48 semaines conduit à une RVS chez 76% des patients, contre 55% chez ceux ayant reçu le traitement standard (von Hahn *et al.*, 2011). Tous les patients étaient VHC-1 et n'avaient jamais été préalablement traités. Même si un essai de phase III de l'alisporivir combiné avec l'IFN- α pégylé et la ribavirine est actuellement en cours chez des patients VHC-1, il serait plus intéressant de se demander si cette molécule pourrait réduire les taux de résistance virale aux AAD en l'absence d'IFN- α et de ribavirine. Si c'est le cas, ce serait une avancée significative vers l'objectif d'un schéma thérapeutique sans interféron, pour le traitement du VHC. Une autre question clinique importante est de savoir si l'alisporivir, en association avec l'IFN- α pégylé et la ribavirine peut améliorer les taux de RVS chez les patients VHC-2 ou VHC-3 précédemment non répondeurs à la thérapie standard IFN- α pégylé-ribavirine. La question se pose en effet, étant donné que les inhibiteurs de la protéase NS3/4A actuellement utilisés ne sont pas appropriés pour le traitement de l'infection par d'autres génotypes que le génotype 1.

Un autre antiviral prometteur ciblant l'hôte est le miravirsén, un oligonucléotide ciblant le miR-122, un microARN spécifique du foie et indispensable à la réplication de l'ARN du VHC (Esau *et al.*, 2006). Cette molécule reconnaît spécifiquement le miR-122, qui est ensuite séquestré et donc indisponible pour le VHC, entraînant ainsi une suppression de longue durée de la virémie VHC (Janssen *et al.*, 2011). *In vitro*, la molécule est active contre les génotypes 1 à 6 (Li *et al.*, 2011). Le miravirsén semble fournir une extraordinaire haute barrière de résistance, avec aucune preuve faite de l'apparition de variants amino-acidiques résistants ou d'effets secondaires dans les études animales avec des chimpanzés (Lanford *et al.*, 2010) et dans les premières études menées chez l'Homme.

L'entrée virale est également une alternative attrayante pour d'autres cibles thérapeutiques. Cependant, les mécanismes complexes et la variété des facteurs impliqués dans ce processus ne sont que partiellement élucidés. ITX-5061 est la première molécule inhibitrice de l'entrée

ciblant SRBI, qui soit en phase clinique de développement. Ce composé présente une forte activité à des doses de l'ordre du picomolaire, en inhibant à la fois les génotypes 1 et 2 du VHC. Elle bloquerait probablement l'interaction entre SRBI et la glycoprotéine E2 du VHC (Syder *et al.*, 2011). À l'heure actuelle, la biosécurité de l'ITX 5061 est en cours d'évaluation dans le traitement de patients VHC-1 n'ayant reçu aucun traitement préalable. Les inhibiteurs de l'entrée virale seront particulièrement intéressants dans le cadre d'une greffe de foie, où un blocage efficace de l'entrée pourrait aider à prévenir la réinfection du greffon après une transplantation hépatique.

En résumé, une thérapie orale anti-VHC, sans IFN est un objectif ambitieux pour le futur traitement des patients atteints d'hépatite chronique C. Les données récentes apportent la preuve que cet objectif est réalisable et que l'interféron a seulement une fonction de transition et n'est pas une solution ultime. S'il y a un besoin de l'IFN dans le traitement futur des hépatites chroniques C, l'étude « EMERGE » a montré que l'utilisation de l'IFN- λ pégylé conduit à une réponse anti-virale supérieure contre les génotypes 1 à 4 et à une meilleure tolérance, par rapport à l'IFN- α (Zeuzem *et al.*, 2011). L'IFN- α et la ribavirine devront être remplacés par un autre schéma standard, avec le plus faible risque de développement de résistance. De plus, les thérapies devront être applicables à tous les génotypes, étant donné que jusqu'à présent, la plupart des AAD sont réduits au génotype 1 du VHC.

IV. Vers des composés naturels anti-VHC ?

Bien que les tentatives de combinaisons thérapeutiques soient encourageantes pour le traitement futur de l'Hépatite C, cette thérapie reste très coûteuse et ne sera probablement pas accessible à la majeure partie du monde, où les pays en voie de développement comptent le plus grand nombre de patients. Pour cette raison, des efforts constants ont été fournis dans le but d'identifier de nouvelles molécules antivirales, plus abordables. De récents rapports sur des composés naturels ont mis en lumière leur activité antivirale contre le VHC. Plusieurs molécules modernes ont d'ailleurs été initialement isolées à partir d'une source naturelle. La plus populaire est sans doute l'aspirine, extrait de la salicine, composé naturel issu du saule *Salix alba*. De plus, les plantes sont utilisées depuis des siècles par les hommes, dans le

traitement de diverses maladies. Les molécules naturelles contre le VHC peuvent être répertoriées en 2 classes principales : les flavonoïdes et les lignanes.

A. Les flavonoïdes

Quatre principales molécules anti-VHC sont issues de cette famille. La première d'entre elles est la silibinine ou silymarine, extraite du chardon-marie *Silybum marianum*. L'extrait de pépins de chardon-marie est un ancien remède utilisé comme un hépatoprotecteur et pour traiter les maladies du foie. L'inhibition de la réplication du VHC a été attribuée à l'action de la silibinine sur la polymérase NS5B (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2010; Wagoner *et al.*, 2011). Des IC_{50} de l'ordre de 75-100 μ M et 40-85 μ M ont été rapportées dans ces études, avec une forme de la silibinine conjuguée au succinate, plus soluble en milieu aqueux. Une inhibition de l'entrée a également été rapportée (Wagoner *et al.*, 2010). La faible biodisponibilité de la silymarine a rendu infructueuses les études cliniques portant sur l'administration par voie orale de la silymarine chez des patients atteints d'hépatite C (Fried *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 2006; Hawke *et al.*, 2010). Des essais cliniques par injection intraveineuse de la forme conjuguée de la silibinine (plus soluble) a montré un effet antiviral puissant chez les patients atteints d'hépatite C chronique et précédemment non répondeurs au traitement standard IFN- α pégylé-ribavirine (Ferenci *et al.*, 2008; Rutter *et al.*, 2011). La formulation intraveineuse silibinine peut donc représenter une option thérapeutique potentielle.

Un deuxième composé de la famille des flavonoïdes est l'Epigallocatechine-3-gallate (EGCG), présente dans le thé vert. Très récemment, trois équipes ont identifié l'EGCG comme un nouvel inhibiteur de l'entrée du VHC. Des IC_{50} de l'ordre de 5 à 21 μ M ont été obtenues. Cette molécule inhiberait l'entrée du VHC indépendamment du génotype dans les lignées hépatiques (Calland *et al.*, 2012a; Chen *et al.*, 2012; Ciesek *et al.*, 2011), mais aussi dans les cultures primaires d'hépatocytes humains (Ciesek *et al.*, 2011). Le mécanisme d'action de l'EGCG sur l'entrée du VHC est encore à l'étude, mais il serait très probable qu'elle agisse directement sur la particule virale, en inhibant l'attachement du virus à la surface cellulaire, ainsi que la transmission cellule à cellule (Calland *et al.*, 2012a; Chen *et al.*, 2012; Ciesek *et al.*, 2011). L'EGCG est donc une molécule anti-VHC avec des propriétés intéressantes : elle inactive de façon directe les particules virales, indépendamment du génotype et empêche la transmission cellule à cellule. Les futurs essais cliniques devront examiner si cette molécule peut empêcher la réinfection chez des patients ayant subi une

transplantation hépatique, et si elle peut être utilisée en combinaison avec des AAD pour traiter les patients souffrant d'hépatite chronique C.

La ladanéine, extraite du Marrube voyageur *Marrubium peregrinum* inhibe l'entrée du VHC à des IC_{50} de 2,5 μ M et indépendamment du génotype. Contrairement à l'EGCG, la ladanéine ne semble pas inhiber la liaison de la particule virale à la cellule, mais inhiberait plutôt une étape ultérieure de l'entrée virale, non encore caractérisée. Lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec la cyclosporine A, un inhibiteur de la réplication du VHC, la ladanéine agit en synergie sur l'infection par le VHC. Elle montre également une activité antivirale sur les hépatocytes humains primaires, mais avec une IC_{50} plus forte de 10 μ M. De plus, la bonne biodisponibilité de la molécule, observée chez des souris conforte l'idée d'une possible utilisation de la ladanéine comme une molécule anti-VHC (Haid *et al.*, 2012).

La quercétine est une flavone ubiquitaire présente dans les fruits, les légumes, et les feuilles. Cette molécule a été décrite comme ayant une activité anti-VHC. La quercétine a un fort effet inhibiteur à 50 μ M sur la production des particules virales en culture cellulaire (Bachmetov *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2009). Cependant, les autres résultats de ces deux études sont contradictoires : tandis que la 1^{ère} ne note pas d'inhibition de la réplication virale dans un système de réplicon subgénomique de génotype 1a (Gonzalez *et al.*, 2009), la 2^{ème} quant à elle, a observé une inhibition de la réplication virale dans des réplicons de génotype 1b, en plus d'un effet inhibiteur direct sur la protéine NS3 (Bachmetov *et al.*, 2012). Par conséquent, l'activité anti-VHC de la quercétine reste à préciser.

B. Les lignanes

Les lignanes sont un groupe de composés chimiques présents dans les plantes. Ce sont une des principales classes de phytoestrogènes. Dans cette famille de composés se trouve l'honokiol, molécule présente dans l'écorce et les feuilles du *Magnolia officinalis*. En 2011, Lan *et al.* ont montré qu'elle inhibait l'infection par le VHC. L'effet de l'honokiol sur l'infection, l'entrée, la traduction et la réplication du VHC a été évalué dans des cellules Huh7 en utilisant du VHCcc, VHCpp et des réplicons sub-génomiques. Elle inhibe fortement l'infection par le VHCcc à des EC_{50} de 4,5 μ M. Combiné avec l'IFN- α , son effet inhibiteur sur le VHCcc est plus fort que celle de la ribavirine combinée à l'IFN. L'inhibition de l'infection du VHC médiée par l'honokiol résulterait d'effets multiples sur le cycle du VHC.

L'honokiol inhibe l'entrée de VHCpp de génotype 1a, 1b et 2a ; elle inhibe aussi les niveaux d'expression de NS3, NS5A et NS5B. De plus, elle agit sur la réplication de génotypes 1a et 2a dans des réplicons sub-génomiques. Le fait que cette molécule inhibe à la fois l'entrée et la réplication du VHC fournit des arguments pour explorer pleinement l'utilité clinique de l'honokiol comme un complément potentiel au traitement standard (Lan *et al.*, 2012).

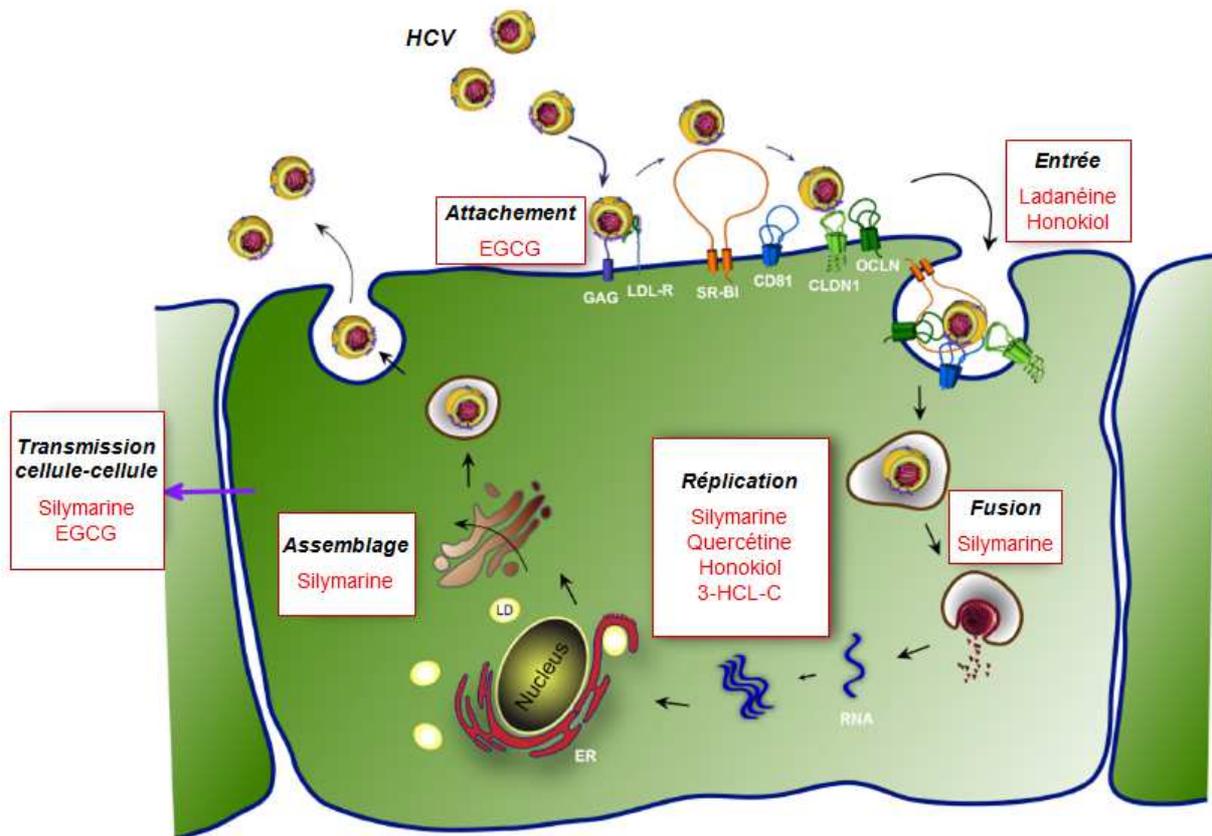


Figure 20 : Cycle biologique du VHC et cibles des plus puissants inhibiteurs naturels.

Epigallocatechine-3-gallate (EGCG), 3-hydroxy Caruilligane C (3-HCL-C). Adaptée de (Calland *et al.*, 2012b).

En 2012, Wu *et al.* signalent l'effet anti-VHC du 3-hydroxy-caruilligane C (3-HCL-C) isolé à partir des tiges du *Swietenia macrophylla*, connu sous le nom d'Acajou des Antilles. Cette molécule réduit à la fois le niveau de la protéine NS3 et les taux d'ARN du VHC à des EC_{50} de 37,5 μ M dans le système de réplicon. De plus, des combinaisons du 3-HCL-C avec l'IFN- α , ou le télaprévir ont augmenté l'inhibition de la réplication de l'ARN du VHC. Le 3-HCL-C interfère avec la réplication du VHC en induisant les éléments de réponse stimulés par l'IFN et l'expression des gènes antiviraux dépendants de l'IFN. Par conséquent, cette molécule pourrait être développée en tant qu'adjuvant puissant dans les thérapies anti-VHC (Wu *et al.*, 2012).

D'autres composés naturels, même s'ils ne ciblent pas directement le virus, pourraient être utilisés pour améliorer la thérapie du VHC. La glycyrrhizine par exemple, un composant de la réglisse empêche le développement du carcinome hépatocellulaire chez les patients atteints d'hépatite chronique (Kumada, 2002). Bien qu'un certain nombre de composés naturels ayant des activités anti-VHC aient été identifiés ces dernières années, de nombreux aspects concernant leurs mécanismes d'action restent inconnus. Souvent, la réplication est la seule étape du cycle du virus qui a été étudiée et dans les anciens rapports, les conclusions ne reposent que sur des modèles *in vitro*.

Il faut aussi garder à l'esprit que l'inhibition *in vitro* de l'activité enzymatique d'une protéine virale par un composé naturel, ne démontre pas de manière définitive que cette protéine virale est la cible du composé. Des études supplémentaires de cristallisation devront prouver ce point. Comme illustré par la silymarine, la biodisponibilité est également un point important à considérer, même pour les molécules extraites d'anciennes plantes médicinales. En conclusion, même s'il n'est pas prévu que les molécules naturelles remplacent le traitement actuel anti-VHC, les traitements pourraient être complétés et peut-être allégés par un régime alimentaire adapté, limitant ainsi leur coût.

Chapitre 3 :
Le métabolisme des
phosphoinositides

Les phosphoinositides (PIs) représentent moins de 15% des phospholipides cellulaires totaux, mais contrôlent des fonctions cellulaires fondamentales. Les PIs sont notamment impliqués dans la régulation de processus cellulaires tels la prolifération, la survie, l'organisation du cytosquelette, le trafic vésiculaire, le transport de glucose, ou encore la fonction plaquettaire (Fruman *et al.*, 1998; Martin, 1997; Paolo & Camilli, 2006; Vicinanza *et al.*, 2008).

Les PIs sont des dérivés du phosphatidylinositol (PtdIns), dans lequel un ou plusieurs des groupements hydroxyl en position 3, 4, et 5 sont estérifiés avec un groupement phosphate, dans toutes les combinaisons possibles. Ils sont insérés dans les membranes, et le groupement inositol est exposé à la surface du feuillet cytosolique des membranes cellulaires. Les réactions de phosphorylation du groupement hydroxyl sont réalisées par des Phosphatidylinositol kinases (PI kinases) et les réactions inverses sont réalisées par des Phosphatidylinositol phosphatases (PI phosphatases) spécifiques de ces PIs. Sept espèces différentes de PIs, aux fonctions uniques ont été identifiées et nommées selon leurs sites de phosphorylation. Il s'agit du : PI-3 Phosphate (PI3P), PI-4 Phosphate (PI4P), PI-5 Phosphate (PI5P), PI (3,4) biphosphate (PI(3,4)P₂), PI (3,5) biphosphate (PI(3,5)P₂), PI (4,5) biphosphate (PI(4,5)P₂), et enfin du PI (3,4,5) triphosphate (PI(3,4,5)P₃) (Figure 21) (Balla & Balla, 2006; D'Angelo *et al.*, 2008; Fruman *et al.*, 1998).

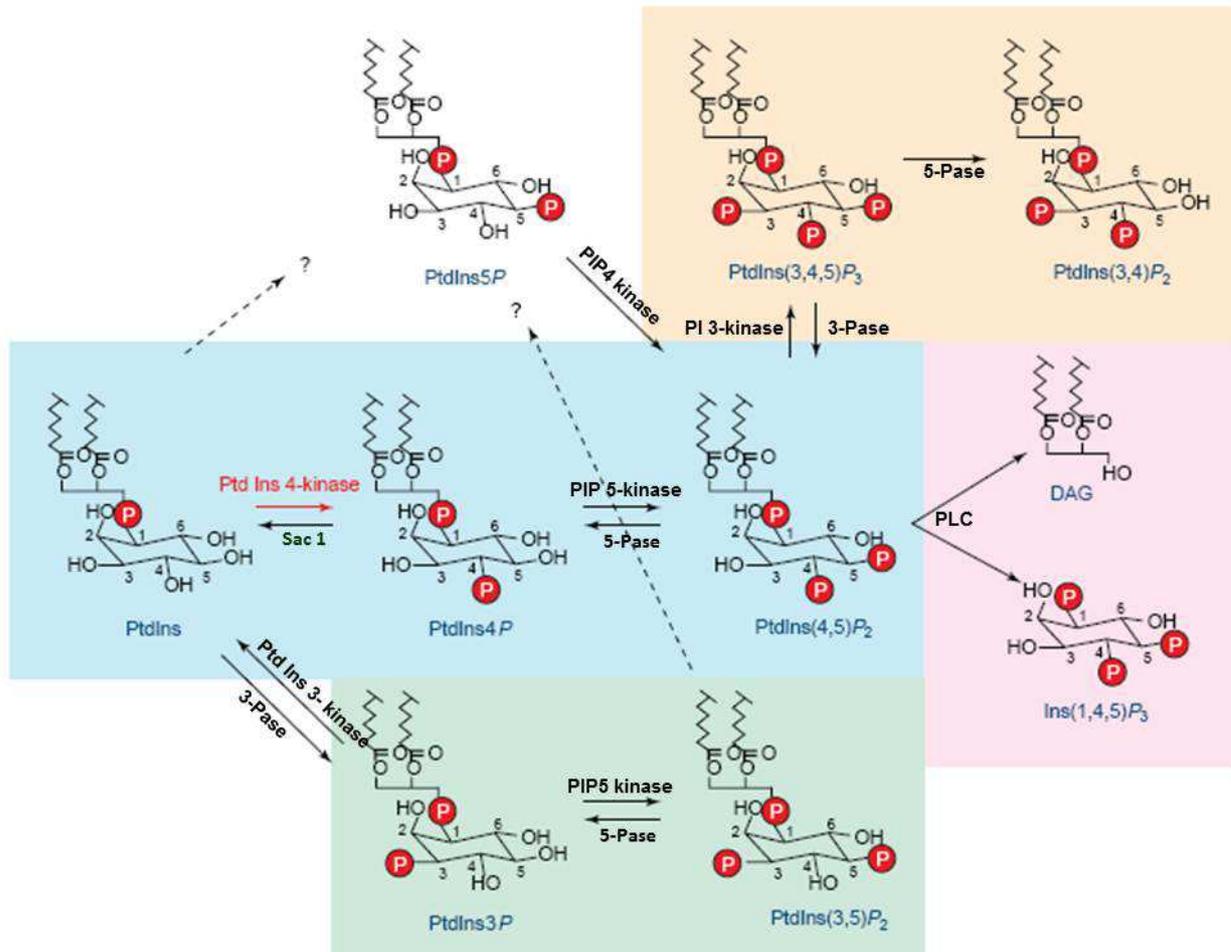


Figure 21 : Voies métaboliques de la production des phosphoinositides.

Les phosphoinositides peuvent être phosphorylés à différentes positions de l'anneau inositol du PtdIns. La voie classique conduisant à la formation de DiAcylGlycérol (DAG) et d'inositol 1,4,5 tri-phosphate est identifiée grâce aux fonds bleu et rose. PLC : Phospholipase C. D'après (Balla & Balla, 2006).

Les fonctions cellulaires spécifiques de chacun de ces PIs ont fait l'objet de nombreuses études (Divecha & Irvine, 1995; Fruman *et al.*, 1998; Toker & Cantley, 1997). Toutefois, trois fonctions générales de ces lipides phosphorylés peuvent être supposées : (i) servir de substrat aux phospholipases dans la génération d'inositol phosphates solubles jouant le rôle de seconds messagers, (ii) interagir directement avec des protéines intracellulaires, affectant ainsi leur activité et/ou leur localisation, et (iii) modifier localement la topologie membranaire grâce à des interactions électrostatiques (Balla & Balla, 2006; D'Angelo *et al.*, 2008; Fruman *et al.*, 1998).

Une des caractéristiques du métabolisme des PIs est sa régulation précise dans le temps et dans l'espace, grâce au strict contrôle de la distribution subcellulaire, de l'association à la membrane et de l'état d'activité de chacune des différentes kinases et phosphatases.

L'équilibre entre l'activité des PI kinases et des PI phosphatases peut alors être différente dans les compartiments cellulaires, générant ainsi des distributions hétérogènes des diverses espèces phosphorylées de PIs dans les organites cellulaires (D'Angelo *et al.*, 2008). En effet, le métabolisme des PIs est fortement compartimenté dans les cellules, et chaque organite est caractérisé par la présence de PI kinases et de PI phosphatases spécifiques qui génèrent et maintiennent leurs pools de PIs caractéristiques (De Matteis & Godi, 2004). Les PI kinases sont relativement bien décrites dans la littérature, en comparaison aux PI phosphatases. Dans la suite de notre exposé, nous nous focaliserons donc sur les PI kinases.

I. Les phosphatidylinositol kinases mammaliennes

Les PI kinases ont été initialement décrites pour leurs activités enzymatiques, capables de transférer un groupement phosphate à une position donnée de l'anneau inositol du PtdIns. La purification de ces enzymes a ensuite permis de les classer en trois familles différentes : les PI 3-kinases (PI3Ks), les PI 4-kinases (PI4Ks) et les PI phosphate kinases (PIPks). Les membres de chacune de ces familles ont été identifiés chez la levure et d'autres eucaryotes inférieurs, et chaque membre partage une forte homologie avec son équivalent chez les mammifères. Ainsi, cette conservation au cours de l'évolution souligne l'importance de ces enzymes dans la physiologie des cellules eucaryotes (Fruman *et al.*, 1998).

A. Les PI 3-kinases

Les PI3Ks sont sans doute les PI Kinases les mieux caractérisées. Différents travaux ont confirmé le rôle des PI3Ks et de leurs produits, non seulement dans la régulation de la prolifération cellulaire, mais aussi dans de nombreuses autres réponses cellulaires. La voie des PI3Ks est ainsi impliquée dans de nombreuses pathologies humaines comme le cancer et le diabète (Cantley, 2002; Vivanco & Sawyers, 2002). Il existe 3 classes de PI3Ks distinguables par la spécificité vis-à-vis de leurs substrats *in vitro*, et leur mode de régulation.

1. Les PI3Ks de la classe I

Les PI3Ks de la classe I sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique de 110-120 kDa et d'une sous-unité régulatrice. *In vitro*, tous les membres de la classe I sont capables de phosphoryler le PtdIns, le PI4P, ou le PI (4,5) P₂ en position 3-OH ; mais *in vivo*, ils utilisent préférentiellement le PI (4,5) P₂. Cependant, l'utilisation d'agonistes stimulant ces enzymes *in vivo* conduit à des augmentations du niveau cellulaire de PI (3,4) P₂ et PI (3,4,5) P₃. De plus, des études cinétiques avec du P³² suggèrent que le PI (3,4) P₂ peut être produit en partie par l'action d'une PI 5-phosphatase sur le PI (3,4,5) P₃. Les PI3Ks de la classe I possèdent une activité protéine kinase intrinsèque, qui est indissociable de leur activité lipide kinase. Les principaux substrats de l'activité protéine kinase des PI3Ks de la classe I sont les résidus sérines contenus dans le domaine catalytique lui-même et/ou dans sa sous-unité régulatrice associée (Fruman *et al.*, 1998; Tolias & Cantley, 1999).

2. Les PI3Ks de la classe II

Les enzymes de la classe II sont des grandes protéines monomériques de 170-210 kDa, contenant un domaine catalytique similaire de 40 à 45% à celui des enzymes de la classe I. *In vitro*, les PI3Ks de la classe II phosphorylent préférentiellement le PtdIns et le PI4P. Cependant, il n'a pas encore été déterminé quels lipides sont produits *in vivo*, et comment l'activité de ces enzymes y est régulée. Basé sur leur activité enzymatique obtenue *in vitro*, les PI3Ks de la classe II produiraient probablement du PI3P *in vivo*. Elles pourraient aussi contribuer à l'accumulation de PI (3,4) P₂ observée dans des cellules stimulées (Fruman *et al.*, 1998; Tolias & Cantley, 1999).

3. Les PI3Ks de la classe III

Contrairement aux enzymes de la classe I et II, les PI3Ks de la classe III phosphorylent uniquement le PtdIns. Ces enzymes pourraient donc induire des augmentations locales de PI3P qui pourraient servir pour le recrutement de protéines requises dans le trafic vésiculaire intracellulaire (Fruman *et al.*, 1998).

B. Les PIP kinases

Deux enzymes distinctes ont été purifiées, du fait de leur capacité à phosphoryler le PIP en PI (4,5) P₂. Ces deux enzymes ont préalablement été nommées PI4P 5-kinases de type I et II, mais des études ultérieures ont révélé que les deux familles d'enzymes phosphorylaient de façon sélective différentes positions sur l'anneau inositol. Pour distinguer ces différents sites de phosphorylation, ces enzymes ont été renommées PIP4Ks et PIP5Ks.

1. Les PIP 4-kinases

Les PIP4Ks phosphorylent le PI3P et le PI5P en position 4-OH. Peu de choses sont connues sur la régulation de leur activité. Etant donné que le PI (3,4) P₂ est un second messager qui participe à l'activation de la protéine kinase Akt et de certaines Protéines Kinases C (PKC), les PIP4Ks pourraient jouer un rôle en amont de ces kinases (Fruman *et al.*, 1998; Tolia & Cantley, 1999). Akt joue un rôle dans la croissance et la survie cellulaire, tandis que les PKC sont impliquées dans différentes fonctions physiologiques cellulaires comme les phénomènes d'apoptose, l'activation des plaquettes, le remodelage du cytosquelette d'actine, la modulation de l'activité des canaux ioniques, ou encore la prolifération cellulaire (Toker, 1998).

2. Les PIP 5-kinases

La réaction la mieux étudiée, catalysée par les PIP5Ks est la conversion du PI4P en PI (4,5) P₂. Les PIP5Ks ont été montrées comme pouvant phosphoryler d'autres PIs *in vitro*. Certaines isoformes de ces enzymes convertissent le PI (3,4) P₂ en PI (3,4,5) P₃. D'autres utilisent aussi le PI3P comme substrat *in vitro* (Fruman *et al.*, 1998; Tolia & Cantley, 1999).

C. Les PI 4-kinases

Les PI4Ks catalysent la production de PI4P à partir du PtdIns, première étape dans la formation de PI (4,5) P₂ et de PI (3,4,5) P₃, deux lipides dont les fonctions de molécules régulatrices sont bien établies (Fruman *et al.*, 1998).

Les PI4Ks sont d'une importance majeure dans l'organisation des cellules eucaryotes. En effet : elles contrôlent les événements de signalisation en régulant la synthèse de PI (4,5) P₂ au niveau de la membrane plasmique et du noyau ; via la génération de PI4P, elles régulent aussi le trafic vésiculaire et la sécrétion de protéines de l'appareil de Golgi. Elles organisent

également le transfert lipidique entre les membranes, affectant ainsi la composition lipidique membranaire. Par conséquent, les PI4Ks apparaissent non plus comme de simples fournisseurs du précurseur de la synthèse de PI (4,5) P₂, mais aussi comme les enzymes générant du PI4P, en tant que molécule signalisatrice (Balla & Balla, 2006; D'Angelo *et al.*, 2008). Dans les cellules, toutes les réactions biochimiques connues pour être influencées par le PI4P requièrent l'action des PI4Ks. Au départ, la recherche sur les PI4Ks a été nourrie par la notion que ces enzymes étaient nécessaires pour la production de pools de PI (4,5) P₂, et par conséquent de DiAcyl Glycérol et PI (1,4,5) P₃ (Balla, 1998).

Quatre PI4Ks ont été identifiées chez les mammifères. Cependant, malgré leur position centrale dans la synthèse de phospholipides, leur régulation est faiblement comprise (Balla & Balla, 2006; D'Angelo *et al.*, 2008; Fruman *et al.*, 1998). A l'origine, les PI4Ks ont été classées en type II et III (le type I s'étant avéré être une PI3K) sur la base de leur poids moléculaire, et de leur sensibilité à des inhibiteurs comme l'adénosine et la Wortmannine ainsi qu'à des détergents non ioniques (ex : triton) (Balla & Balla, 2006; Balla, 1998; Endemann *et al.*, 1987; Graham & Burd, 2011).

1. Les PI 4-kinases de type II

Ces enzymes sont liées de façon étroite à la membrane, du fait de leur palmitoylation sur un motif riche en sérine localisé dans le domaine catalytique (Barylko *et al.*, 2001). Il a été montré que cette palmitoylation était essentielle à l'adressage des PI4Ks de type II au réseau trans-golgien (Barylko *et al.*, 2009).

Les PI4Ks de type II ont un poids moléculaire d'environ 55 kDa (Carpenter & Cantley, 1990). Deux formes de ces enzymes, II α et II β sont exprimées chez les vertébrés. Les premières études ont identifié l'activité des PI4Ks de type II au niveau de la membrane plasmique. Il a été supposé que ces kinases participaient à la formation du pool membranaire de PI (4,5) P₂. Il était donc surprenant de constater que la majorité des PI4K de type II α et II β était localisée dans les membranes intracellulaires, en particulier dans le réseau trans-golgien et les endosomes. En accord avec leur localisation endosomale, des données suggèrent que les PI4Ks de type II régulent le trafic intracellulaire (Balla & Balla, 2006). De plus, d'autres études proposent que ces enzymes ont un rôle dans le trafic du réseau trans-golgien (Wang *et al.*, 2007, 2003) et dans le processus d'endocytose de l'EGF-R (Minogue *et al.*, 2006).

La phosphorylation des PI4Ks de type II par la protéine kinase D a été rapportée ; toutefois, les conséquences en termes d'activité de ces enzymes ne sont pas encore élucidées. La régulation des PI4Ks de type II n'est pas très bien connue (Balla & Balla, 2006).

2. Les PI 4-kinases de type III

Moins abondantes que les PI4Ks de type II dans les cellules, les PI4Ks de type III (PI4KIIIs) sont structurellement apparentées aux PI3Ks, avec un fort degré de conservation de leurs domaines catalytiques ; cela explique aussi la sensibilité des PI4KIIIs à la Wortmannine, un des inhibiteurs les plus puissants des PI3Ks (Wymann *et al.*, 1996). De plus, les PI4KIIIs et les PI3Ks contiennent un domaine « Lipid Kinase Unique » (LKU) prédit comme ayant une structure hélicoïdale (Balla & Balla, 2006; Heilmeyer *et al.*, 2003). Ce domaine serait nécessaire pour l'activité kinase des PI4KIIIs, en interagissant avec, et en activant le domaine C-terminal de ces kinases (Minogue & Waugh, 2012; Strahl *et al.*, 2007).

Comme pour les PI4KIIIs, il existe deux formes de PI4KIIIs, α et β . Les PI4KIIIs ont été clonées après purification de ces enzymes à partir de la glande surrénale et de cerveau bovins. L'analyse de la distribution des PI4KIIIs mammaliennes a révélé qu'elles sont exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus, bien que PI4KIII α soit exprimée de façon prédominante dans le cerveau, et que PI4KIII β soit répartie de manière plus large (Balla, 1998). Au niveau cellulaire, PI4KIII α est principalement localisée dans le RE (Wong *et al.*, 1997), mais aussi dans l'espace péricentriolaire qui contient probablement le compartiment golgien (Nakagawa *et al.*, 1996), ainsi que dans le nucléole (Kakuk *et al.*, 2006). PI4KIII β quant à elle est principalement associée aux membranes golgiennes (Wong *et al.*, 1997), mais est également retrouvée dans le noyau (Balla & Balla, 2006; de Graaf *et al.*, 2002) (Figure 22).

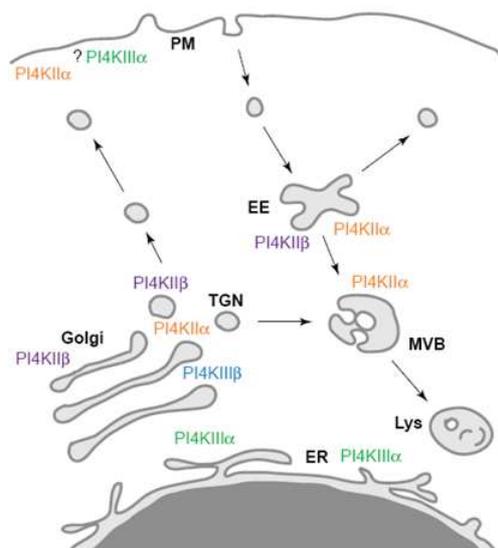


Figure 22 : Distribution cellulaire des PI4Ks.

EE, Endosome précoce ; PM, membrane plasmique ; Lys, lysosome ; MVB, corps multivésiculaire ; ER, réticulum endoplasmique ; TGN, réseau trans-golgien. D'après (Balla & Balla, 2006).

En plus de l'expression ubiquitaire de PI4KIII α et β , le fort degré de conservation de ces kinases, aussi bien chez la levure que chez les mammifères porte à croire qu'elles exercent des fonctions spécifiques et jouent un rôle essentiel dans les cellules (Gehrmann & Heilmeyer, 1998).

a) PI4KIII α .

Deux isoformes de PI4KIII α ont été décrites chez les mammifères et annotées dans la base de données NCBI : une grande isoforme de 230 kDa (isoforme 1) et une variante plus courte d'environ 97 kDa, comprenant seulement la partie C-terminale qui contient le domaine catalytique (isoforme 2) (Figure 23). C'est l'isoforme 2 qui a été clonée la première chez les mammifères mais a été d'abord classée par erreur comme étant une PI4K de type II (Wong & Cantley, 1994). Des études ultérieures ont permis de conclure que cette isoforme était en réalité un variant épissé de l'enzyme de 230 kDa (Balla, 1998; Nakagawa *et al.*, 1996). Mais récemment, l'équipe de Tamas Balla a montré que la petite isoforme, en plus d'être faiblement représentée dans les cellules, serait aussi catalytiquement inactive (Szentpetery *et al.*, 2011).

En 2010, l'équipe de Lefrancois a proposé une cascade d'évènements impliquant PI4KIII α dans la formation des vésicules de transport au niveau de l'appareil de Golgi (Dumaresq-Doiron *et al.*, 2010). Le recrutement de diverses protéines vers des membranes cellulaires

incluant le Golgi, les endosomes et la membrane plasmique nécessite l'activation de la petite GTPase Arf1 (Cohen *et al.*, 2007; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Ooi *et al.*, 1998). Cette activation est conditionnée par le recrutement et la liaison au Golgi de GBF1, un membre de la famille des Guanidine nucleotide Exchange Factor (GEF) (Jackson & Casanova, 2000). Lefrancois et ses collaborateurs ont donc montré que PI4KIII α recrutait GBF1, vers les membranes de l'appareil de Golgi (Dumaresq-Doiron *et al.*, 2010). En formulant l'hypothèse de départ que le recrutement de GBF1 vers le Golgi nécessitait la présence du PI4P, l'équipe a alors démontré que c'est PI4KIII α , et non PI4KIII β qui était responsable de la production des PI4Ps impliqués dans le recrutement de GBF1. Le schéma de la cascade est le suivant : la protéine Rab1 active PI4KIII α , ce qui conduit à une production accrue de PI4P. Ces PI4Ps permettent à GBF1 de se lier d'abord aux membranes de l'appareil de Golgi, puis d'activer Arf1, ce qui a alors pour conséquence la formation des vésicules de transport (Dumaresq-Doiron *et al.*, 2010).

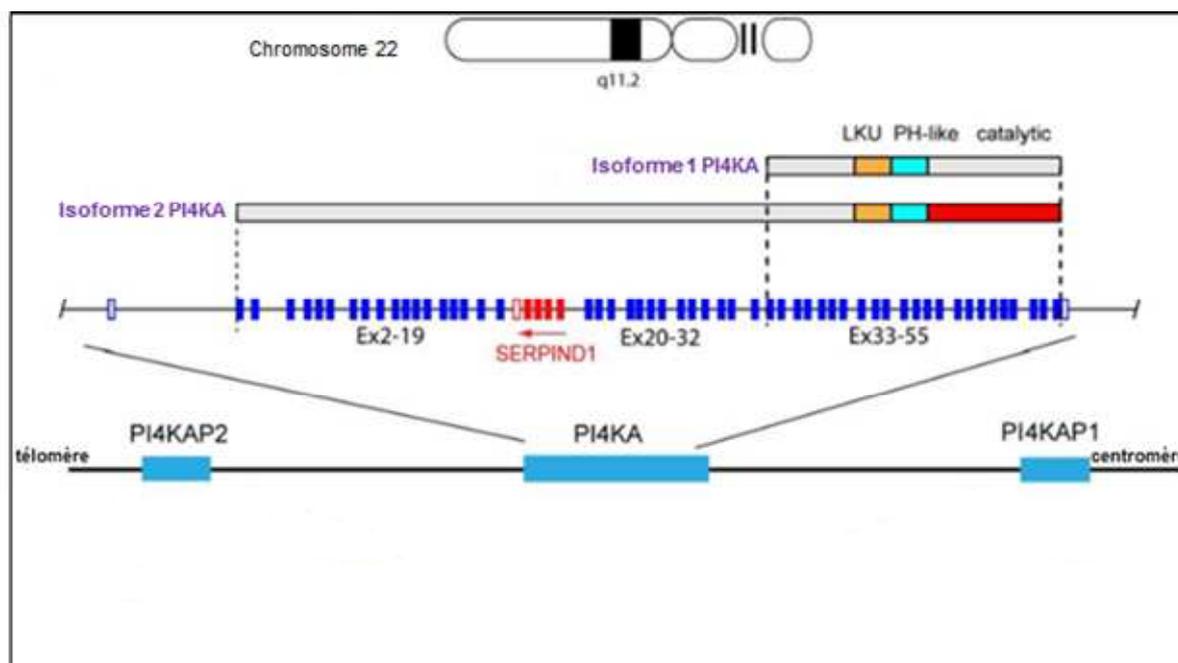


Figure 23 : Représentation schématique des deux isoformes de PI4KIII α .

La relation structurale entre les deux isoformes au niveau protéique est montrée en indiquant la localisation des domaines fonctionnels. L'organisation exon-intron du gène est également figurée. En plus du gène *pi4kIIIa*, la région chromosomique comprend deux pseudogènes, *pi4kIIIap1* et *pi4kIIIap2*, localisés de part et d'autre de *pi4kIIIa*. D'après (Szentpetery *et al.*, 2011).

b) PI4KIII β

PI4KIII β est une enzyme d'environ 92 kDa. Elle contient un domaine de liaison à la protéine Rab11, situé entre le site catalytique et le domaine LKU. L'association PI4KIII β -Rab11 pourrait réguler le transport membranaire du Golgi vers la membrane plasmique. En effet, PI4KIII β se lie à Rab11, et il apparaît que cette interaction est nécessaire pour recruter Rab11 au Golgi, et permettre la régulation du transport membranaire (de Graaf, 2004).

Le recrutement de PI4KIII β au Golgi est facilité par Arf1 (Godi *et al.*, 1999, 2004). L'activité enzymatique de PI4KIII β peut aussi être modulée par la phosphorylation d'un ou plusieurs de ses sites de phosphorylation. Par exemple, la phosphorylation de PI4KIII β à la position Ser268 par la Protéine kinase D (PKD) est essentielle pour son activité kinase et pour sa capacité à soutenir le transport post-golgien, mais n'est pas nécessaire au recrutement vers le Golgi (Hausser *et al.*, 2005). Cette phosphorylation par la PKD intervient après que cette dernière ait été dirigée vers le Golgi, suite à sa liaison avec Arf1 (Graham & Burd, 2011). La phosphorylation des sérines Ser258 et Ser266 a été montrée comme importante pour le recrutement de PI4KIII β vers le Golgi (Balla & Balla, 2006; Heilmeyer *et al.*, 2003).

Dès 1999, le rôle de PI4KIII β au niveau de l'appareil de Golgi a été mis en lumière. En effet, Godi *et al.* ont montré que PI4KIII β contrôlait l'intégrité structurelle de cet organite. En présence d'un dominant négatif de PI4KIII β avec une mutation permettant d'inactiver l'activité kinase de l'enzyme, l'équipe a observé une désorganisation totale de la structure de l'appareil de Golgi (Godi *et al.*, 1999). En 2006, Tóth *et al.* ont établi que PI4KIII β est une enzyme clé qui contribue à la régulation du transport de céramides entre le RE et le Golgi. Ces céramides sont des molécules lipidiques retrouvées en abondance dans les membranes cellulaires, où elles entrent notamment dans la constitution des sphingomyélines, constituants fondamentaux de la myéline des nerfs. Les céramides peuvent également revêtir des fonctions de signalisation lipidique. Leurs actions les mieux comprises vont de la différenciation cellulaire à l'apoptose, en passant par la prolifération cellulaire. Le rôle de PI4KIII β dans le maintien de la structure du Golgi et dans le transport des céramides conforte l'hypothèse d'un rôle central de cette enzyme dans la régulation des fonctions golgiennes, notamment le trafic vésiculaire du Golgi vers la membrane plasmique (Tóth *et al.*, 2006).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des PI4KIII α

Propriétés	PI4KIII α	PI4KIII β
Autres noms	PI4KIII α , PI4KCA, PI4K230	PI4KB, PI4KCB, PI4K92
Homologue chez la levure	Stt4p	Pik1p
Poids moléculaire apparent	210 kDa	110 kDa
Poids moléculaire calculé	230 kDa	92 kDa
Localisation chromosomique	22q11.2	1q21.3
Wortmannine	IC ₅₀ 50-300 nM	IC ₅₀ 50-300 nM
LY-294002	IC ₅₀ 50-100 μ M	IC ₅₀ 100 μ M
K1 (Adenosine)	Millimolaires	Millimolaires
Triton X-100	Active	Active

Pendant longtemps, la question s'est posée de savoir comment PI4KIII α et PI4KIII β avaient accès au PtdIns, leur substrat localisé à la membrane plasmique, étant donné que ces enzymes sont solubles et qu'elles ne présentent aucun domaine hydrophobe apparent (Balla, 1998). Pour PI4KIII β , la réponse pourrait venir de son interaction avec la protéine Arf1, qui est insérée dans la bicouche lipidique. De plus, il n'avait pas été possible de déterminer laquelle de ces PI4KIII α était responsable de la génération du pool à la membrane plasmique de PI4P, précurseur de PI (4,5) P₂. Cela était principalement dû au manque d'outils appropriés. Cette question était d'autant plus pertinente qu'aucune des PI4KIII α n'avait pu être trouvée dans des proportions détectables au niveau de la membrane plasmique. Jusqu'alors, il avait juste été montré que les PI4KIII α étaient requises pour le maintien d'un pool de PIs, et par conséquent pour un équilibre des concentrations intracellulaires d'Ins (1,4,5) P₃ et de Ca²⁺ (Nakanishi *et al.*, 1995; Willars *et al.*, 1998). La récente découverte de PIK93, un inhibiteur des PI3Ks qui permet de discriminer parmi les deux formes de PI4KIII α , s'est avérée être un outil utile pour répondre à cette question (Balla *et al.*, 2008; Knight *et al.*, 2006; Tóth *et al.*, 2006). Balla et ses collaborateurs ont ainsi pu montrer que PI4KIII α était indispensable à la production de pools à la membrane plasmique de PI4P et de PI (4,5) P₂, ainsi qu'à la signalisation calcique (Balla *et al.*, 2008).

En outre, à la fin de l'année 2012, Nataksu *et al.* ont prouvé la présence de PI4KIII α à la membrane. Ils ont ainsi montré qu'elle co-localisait avec deux protéines, EFR3B et TTC7B. La première a une localisation plasmique, tandis que la seconde est cytosolique. La palmitoylation en N-terminal de EFR3B est une condition essentielle à sa localisation au niveau de la membrane plasmique, ce qui lui permet ensuite de recruter TTC7B ; leur association étant nécessaire au recrutement à la membrane de PI4KIII α . Une fois le lien à la

membrane de PI4KIII α établi, l'équipe a précisé le rôle de PI4KIII α à la membrane, ainsi que son implication dans le métabolisme et la physiologie cellulaire. En réalisant des souris « knockout » (KO) pour PI4KIII α , les auteurs ont fait plusieurs observations : une perte sélective de PI4P au niveau de la membrane plasmique, une baisse modérée du niveau plasmique de PI (4,5) P₂. Il n'y a pas de modification de la structure et la fonction de l'appareil de Golgi, mais une rupture de l'actine corticale, ainsi qu'une modification de l'organisation de la clathrine (taille et distribution anormale). De plus, les niveaux membranaires de cholestérol étaient 20% plus bas que dans les contrôles, alors que les niveaux intracellulaires augmentaient. PI4KIII α apparaît alors comme un déterminant critique de l'identité de la membrane plasmique. En son absence, les cellules régulent à la hausse l'expression des PIP5Ks, qui convertissent PI4P en PI (4,5) P₂, ce qui explique la baisse modérée de PI (4,5) P₂, par rapport à celle de PI4P (Nakatsu *et al.*, 2012). Cette étude est la première à rapporter un recrutement direct de PI4KIII α à la membrane plasmique ; de plus, elle apporte un éclairage sur le rôle de PI4KIII α au niveau de la membrane plasmique.

II. Le Phosphatidylinositol 4-phosphate

Le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P), produit des PI4Ks représente 60% des PIs monophosphorylés dans les cellules de mammifères. Longtemps considéré comme servant uniquement de précurseur au PI(4,5)P₂, le PI4P apparaît depuis quelques années comme un régulateur direct de fonctions cellulaires importantes. La localisation subcellulaire des effecteurs du PI4P a initialement porté à croire que la plus grande partie du PI4P résidait dans les membranes du complexe de Golgi (D'Angelo *et al.*, 2008). Cependant, l'existence d'un pool non golgien physiologiquement relevant commence à être mis à jour. Du fait de la localisation de certaines des enzymes responsables de sa synthèse, le PI4P est retrouvé à la membrane plasmique. A ce niveau, il peut être métabolisé en PI (4,5) P₂ qui servira de substrat pour la production de PI (1,4,5) P₃, la mobilisation du Ca²⁺, et la transduction du signal (D'Angelo *et al.*, 2008; Graham & Burd, 2011).

Le PI4P est également le PI prédominant dans le complexe de Golgi (des quantités moins importantes étant retrouvées dans le RE et les endosomes) (Godi *et al.*, 2004; Graham & Burd, 2011). Une carence de ce lipide affecte la structure et la fonction de l'appareil de Golgi

(Godi *et al.*, 1999). La restriction spatiale du PI4P au niveau du complexe de Golgi est assurée par des phosphatases, dont l'une est probablement Sac1. Cette protéine est associée au complexe golgien et au RE, et pourrait déphosphoryler le PI4P quand un trafic rétrograde intervient du Golgi vers le RE (Graham & Burd, 2011; Paolo & Camilli, 2006).

Dans certains cas, il est raisonnable de supposer que l'importance du PI4P repose sur sa conversion ultérieure en PI (4,5) P₂. Pour d'autres processus cellulaires par contre, comme le trafic membranaire ou le métabolisme des sphingolipides au niveau du complexe de Golgi, il a été spécifiquement montré que cette nécessité du PI4P est également due à son action directe sur ses effecteurs (Figure 24) (D'Angelo *et al.*, 2008). Deux principales classes d'effecteurs des PI4Ps ont été caractérisées à ce jour : les protéines adaptatrices et les protéines de transfert de lipides.

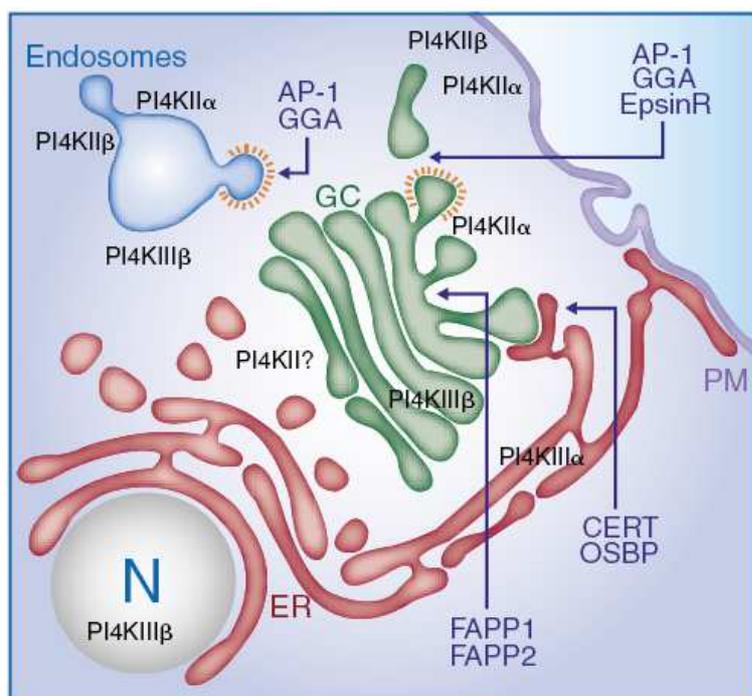


Figure 24 : Distribution intracellulaire des PI4Ks et des effecteurs de PI4P dans les cellules de mammifères.

La localisation intracellulaire des PI4Ks et des effecteurs de PI4P suggèrent un rôle central du complexe de Golgi dans la synthèse et dans la fonction biologique des PI4P. N, noyau; GC, complexe de Golgi; PM, membrane plasmique ; ER, Réticulum Endoplasmique (D'après D'Angelo *et al.*, 2008).

A. Les Protéines adaptatrices

Le premier exemple décrit de régulation spatiale d'une protéine adaptatrice par les PI4Ps a été celui de AP-1 (Adaptor Protein-1). Cette dernière se lie directement au PI4P présent dans le réseau trans-golgien, de manière PI4KII α -dépendante. AP-1 se lie également à Arf1, et la liaison concomitante à PI4P et à Arf1, combinée à la reconnaissance directe du cargo (contenu soluble ou transmembranaire de molécules), représente une stratégie efficace pour la régulation spatio-temporelle du recrutement de AP-1 sur des domaines spécifiques du réseau trans-golgien (D'Angelo *et al.*, 2008).

Une stratégie similaire est adoptée par une autre famille de protéines adaptatrices, les GGAs (Golgi-localised, γ -ear-containing, Arf-binding proteins). Ces GGAs sont des protéines monomériques localisées au niveau du réseau trans-golgien et dans les endosomes, et participent au trafic membranaire entre ces compartiments (D'Angelo *et al.*, 2008).

EpsinR est un membre de la famille des Epsines, une famille de protéines se liant aux PIs et dans laquelle les membres interagissent avec le domaine «oreille» des Adaptor Proteins et de la clathrine et peuvent induire une courbure membranaire (Ford *et al.*, 2002). Contrairement aux autres membres de la famille qui interagissent avec AP-2 et PI (4,5) P₂, EpsinR montre également une affinité pour AP-1 et PI4P. De façon surprenante, l'association de l'EpsinR avec les membranes est indépendante de AP-1, mais dépendante de Arf1, ajoutant ainsi cette protéine à la liste des « clathrin adaptor » qui utilisent un code à double clé pour se localiser dans le compartiment « réseau trans-golgien-endosome ».

B. Les protéines de transfert de lipides de la famille COF (Cert Osbp Fapp)

Cette famille inclut : la protéine de transfert de céramides « ceramide-transfert protein » CERT, l' « OxySterol/cholesterol Binding Protein » OSBP, et les « phosphatidylinositol Four-phosphate-AdaPtor Proteins » FAPP 1 et 2. Ces différentes protéines seront par la suite regroupées sous le nom de famille COF. Les protéines de transfert de lipides de cette famille contiennent un domaine distinct de liaison aux lipides ou domaine de transfert localisé dans la région C-terminale de la protéine, ainsi qu'un domaine d'homologie à la plekstrine (Plekstrin Homology : PH) conservé, en N-terminal (D'Angelo *et al.*, 2008). Le terme Plekstrin Homology vient de l'identification d'une région d'environ 100 acides aminés dans ces

domaines ; cette région apparaît deux fois dans une protéine plaquettaire : la pleckstrine. Les domaines PH sont capables de se lier spécifiquement à un lipide donné. Ils se fixent au PI4P mais aussi à Arf1 (dans le cas de FAPP et OSBP). Cette capacité des COFs à se lier au PI4P et à Arf1 les dote de la propriété de « détecteur-concomitant » de domaines membranaires enrichis en PI4P et en forme active de Arf1. De façon encore plus importante, la survenue de cette combinaison n'est pas due au hasard, car il a été montré que Arf1 interagit avec, et recrute PI4KIII β au Golgi (Godi *et al.*, 1999; De Matteis *et al.*, 2007). Les COFs sont localisées au niveau des membranes golgiennes grâce à leur domaine PH conservé. Chacune des protéines de cette famille interagit avec PI4P dans un but précis.

1. CERT

Les céramides provenant du RE et transportées dans l'appareil de Golgi grâce au CERT servent à la production de sphingomyéline par la sphingomyéline synthase 1 (SGMS1). CERT assure le transport non vésiculaire de céramide du RE, son lieu de synthèse vers le Golgi, où il est converti en sphingomyéline (Hanada *et al.*, 2003; Vicinanza *et al.*, 2008). Bien que localisée au Golgi, CERT peut s'associer avec des protéines liées à la membrane du RE, comme VAP-A. Ces interactions peuvent définir une jonction de transport entre le RE et les membranes de Golgi, ou permettre à CERT de faire la navette entre les deux compartiments (D'Angelo *et al.*, 2008). La localisation et l'activité de CERT sont contrôlées par un cycle de phosphorylation-déphosphorylation. La phosphorylation de CERT, médiée par la PKD réduit sa liaison avec PI4P, son association à la membrane, ainsi que son activité de transfert de céramide (Fugmann *et al.*, 2007). Tóth *et al.* ont d'ailleurs montré que PI4KIII β était l'enzyme clé responsable de la régulation du transport de céramide effectuée par CERT, entre le RE et le Golgi (Tóth *et al.*, 2006). Une fonction majeure de PI4P dans les cellules animales est donc de contrôler la synthèse de sphingolipides à travers le recrutement de protéines liant le PI4P à l'appareil de Golgi (Graham & Burd, 2011).

2. OSBP

OSBP a été initialement isolé comme un récepteur cytosolique des oxystérols, dérivés de l'oxydation enzymatique ou non du cholestérol. OSBP est localisé au niveau du RE et de l'appareil de Golgi, grâce à son domaine PH qui se lie au PI4P et à Arf1, avec un cycle de phosphorylation-déphosphorylation qui régule aussi sa distribution subcellulaire. Plusieurs études ont établi des connections bi-directionnelles entre OSBP et les stérols cellulaires, montrant ainsi des effets des stérols sur OSBP et des effets de OSBP sur le métabolisme des

stérois. Entre autres, la localisation de OSBP dans le Golgi est contrôlée par les oxystérois, et les niveaux cellulaires de cholestérol peuvent être régulés par l'association de OSBP et de phosphatases. OSBP prolonge aussi la synthèse de sphingomyéline dépendante de CERT et stimulée par les oxystérois, même si le mécanisme exact reste à définir (D'Angelo *et al.*, 2008).

3. FAPP2

FAPP2 a été initialement décrit comme un effecteur de Arf1 et de PI4P, impliqué dans le trafic réseau trans-golgien-membrane plasmique. Il a un rôle prédominant dans le transport de molécules vers la membrane apicale des cellules polarisées. A la différence de FAPP1, FAPP2 possède en C-terminal un domaine putatif de transfert de glycolipides (Godi *et al.*, 2004; Lenoir *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2000). Il a été récemment montré que FAPP2 était requis dans la synthèse de glycosphingolipides, synthèse qui dépend de la production de PI4P au niveau du Golgi et de la GTPase Arf1. FAPP2 a également été montré comme nécessaire dans la voie de transport rétrograde des glucosylcéramides du complexe de Golgi vers le RE (D'Angelo *et al.*, 2007).

Aux deux principales classes d'effecteurs des PI4Ps s'ajoute la protéine GOLPH3 (Golgi Phosphoprotein 3) : elle a récemment été identifiée comme protéine de liaison aux PI4P. C'est une protéine abondante, dont la localisation dans le Golgi nécessite le PI4P. Il a été également montré que GOLPH3 interagit avec une myosine, MYO18A qui relie les membranes golgiennes au cytosquelette d'actine (Figure 25). Cette interaction procurerait une force de traction requise pour le trafic vésiculaire et l'architecture du Golgi, démontrant alors un rôle supplémentaire des PI4P dans le Golgi (Dippold *et al.*, 2009).

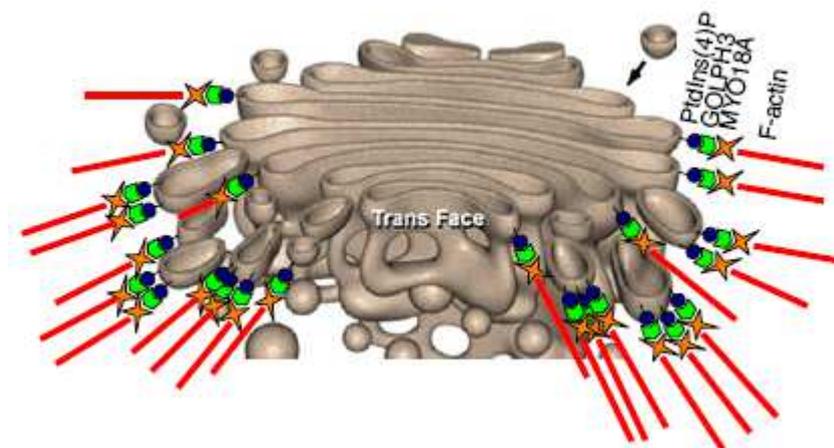


Figure 25 : Diagramme de l'appareil de Golgi.

GOLPH3 se fixe sur PI4P et se lie à MYO18A, traduisant une force de traction nécessaire pour la vésiculation du Golgi, contribuant à sa forme aplatie. D'après (Dippold *et al.*, 2009).

Les protéines ciblées par le PI4P fonctionnent pour réguler la composition des membranes golgiennes et sont de ce fait supposées réguler les propriétés mécaniques de ces membranes. Ainsi, le PI4P a des cibles qui régulent simultanément la force de traction sur les membranes et leurs propriétés mécaniques, incluant probablement leur élasticité, déterminant alors le comportement de ces membranes lorsqu'elles sont soumises à une tension. Il est donc tentant de spéculer que la régulation coordonnée d'une force de traction, ainsi les propriétés mécaniques de la membrane procurent un arrangement idéal pour contrôler la sortie de vésicules provenant de l'appareil de Golgi, et par conséquent pour générer cette morphologie unique caractéristique du Golgi (Dippold *et al.*, 2009).

En résumé, grâce au travail de nombreux laboratoires au cours de la dernière décennie, le PI4P est apparu comme un régulateur important et direct de plusieurs processus cellulaires, dont la plupart sont conservés, des levures aux mammifères. Il a été montré aussi bien dans les cellules de levures que de mammifères, que la reconnaissance du PI4P est cruciale pour au moins deux aspects distincts de la biogénèse des vésicules au niveau du réseau trans-golgien : le tri des chargements dans les vésicules, et les réarrangements membranaires qui dirigent le bourgeonnement vésiculaire (D'Angelo *et al.*, 2008; Graham & Burd, 2011). De plus, le rôle central du PI4P dans le trafic antérograde du complexe Golgien à la membrane plasmique, et dans le métabolisme des sphingomyélines et des glycosphingolipides fait de lui un agent majeur dans le contrôle du flux de protéines et de lipides vers la surface cellulaire, et par conséquent dans la composition de la membrane plasmique elle-même.

La liste des protéines et domaines protéiques ayant une affinité pour le PI4P est en constante expansion. Toutefois, notre connaissance actuelle des régulateurs et des effecteurs de ce lipide est encore réduite, et des recherches supplémentaires seront nécessaires pour fournir un tableau plus complet.

Dans la cellule, les enzymes responsables de la déphosphorylation de ce PI4P en PtdIns sont des PI Phosphatases. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons à l'une d'elles, la phosphatase Sac1.

III. La phosphatase mammalienne Sac1

Chez les mammifères, Sac1 est une protéine membranaire intégrale qui réside de façon primaire dans le RE. Cette rétention dans le RE est contrôlée par l'interaction entre Sac1 et la protéine COP-I, qui capture l'enzyme dans le Golgi et la recycle en retour vers le RE, en vésicules COP-I (Rohde *et al.*, 2003).

Sac1 déphosphoryle le PI4P en PtdIns. La fonction principale de Sac1 serait de prévenir la dispersion arbitraire de PI4P dans les membranes intracellulaires, maintenant ainsi la compartimentalisation du pool (Roy & Levine, 2004). Des études chez la levure et les mammifères ont montré que Sac1 était responsable du renouvellement de PI4P au niveau du RE et du Golgi (Rohde *et al.*, 2003). En revanche, on ne sait toujours pas comment le transport de Sac1 entre le RE et l'appareil de Golgi est effectué. La fonction de Sac1 au niveau du Golgi n'est pas bien définie.

En 2008, l'équipe de Mayinger a émis l'hypothèse que la régulation du niveau de PI4P dans le Golgi pouvait être dépendante de la croissance cellulaire, couplant ainsi la signalisation lipidique et la prolifération cellulaire. Elle a alors analysé le rôle de Sac1 dans le contrôle de la sécrétion stimulée par des mitogènes (Figure 26). Dans les cellules quiescentes, Sac1 s'accumule dans l'appareil de Golgi, où elle « consomme » le pool de PI4P, et ce faisant, elle inhibe le trafic antérograde. La relocalisation de Sac1 du RE vers l'appareil de Golgi nécessite son oligomérisation et le recrutement du complexe COP-II. Après stimulation par des mitogènes, Sac1 est phosphorylée et passe à l'état de monomère. Elle est alors relocalisée au RE grâce à COP-I, ce qui entraîne une augmentation du niveau de PI4P à l'appareil de Golgi,

et par conséquent une stimulation de la sécrétion (trafic antérograde du Golgi vers la membrane plasmique) (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2008).

Cette même équipe a aussi identifié la voie de p38, une Protéine Kinase Activée par les Mitogènes (MAPK) comme impliquée dans la dissociation des oligomères de Sac1 après la stimulation par les mitogènes (Figure 26). L'inhibition de la voie MAPK p38 abolit le passage de Sac1 du Golgi vers le RE et ralentit la sécrétion. Cela suggère des rôles directs de la MAPK p38 et de Sac1 dans la transmission des signaux de croissance à la machinerie sécrétrice. Cela indique aussi que la voie p38 joue un rôle dans la modulation des PIs du RE et du Golgi lors d'une stimulation par des mitogènes. Sac1 ne serait donc plus seulement une enzyme impliquée dans la restriction spatiale des pools de PIs, mais jouerait un rôle important dans les voies de transduction du signal induites par les mitogènes (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2008).

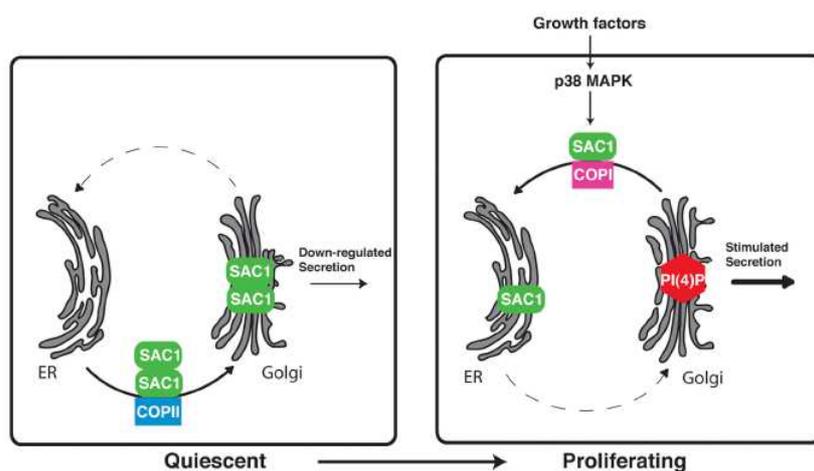


Figure 26 : Régulation-Mitogène dépendante de Sac1 et signalisation de PI4P à l'appareil de Golgi.

Dans les cellules quiescentes, Sac 1 s'oligomérisse et s'accumule dans l'appareil de Golgi, qui à son tour régule négativement le PI4P et la sécrétion constitutive. Après stimulation par un facteur de croissance, l'activité de p38 MAPK est nécessaire pour la dissociation des complexes Sac1, ce qui déclenche le trafic rétrograde et la redistribution de Sac1 au RE. La réduction des niveaux Sac1 au niveau du Golgi permet d'accumuler PI4P dans cet organelle, induisant une sécrétion constitutive (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2008).

Au cours de l'année 2008, Liu *et al.* ont également mis en évidence des rôles importants de Sac1. Les auteurs ont en effet démontré que la réduction du niveau de Sac1 dans les cellules était associée à une désorganisation du complexe Golgien et du fuseau mitotique dans des cellules humaines. Ils ont alors pointé du doigt que cette phosphatase jouait probablement un

rôle essentiel de gène de ménage, nécessaire pour une organisation adéquate de l'appareil de Golgi et du fuseau mitotique (Liu *et al.*, 2008).

IV. PI4KIII β et virus pathogènes

Ces dernières années, le rôle important des PI4KIII β dans le cycle biologique de plusieurs pathogènes a été mis en lumière. En 2003, un nouveau coronavirus a été décrit comme l'agent étiologique responsable du Syndrome Respiratoire Sévère Aigu (SARS, Severe Acute Respiratory Syndrome) (Drosten *et al.*, 2003). En 2012, Yang et ses collègues ont montré que l'activité kinase de PI4KIII β était nécessaire à l'étape d'entrée du SARS-CoV S. Par contre, la manière dont PI4KIII β contrôle l'entrée de ce virus n'a pas été élucidée. Il semblerait cependant que cette kinase ne contrôle, ni le niveau d'expression membranaire du récepteur Angiotensin-1 Converting Enzyme 2 (ACE2), ni l'attachement du virus à la cellule, ni son internalisation, ni l'étape de fusion (Yang *et al.*, 2012).

Récemment, l'importance de PI4KIII β pour la réplication de plusieurs Picornavirus a été bien documentée. Les Picornavirus sont des virus non enveloppés, simple brin de polarité positive. Ils incluent de nombreux pathogènes humains et animaux comme les Entérovirus (rhinovirus, poliovirus, coxackievirus) et les Kobovirus (Aichivirus).

En 2010, Hsu *et al.* ont montré comment les Entérovirus (notamment Poliovirus et Coxackievirus, respectivement responsables de la poliomyélite et de la fièvre aphteuse) remodelent la voie sécrétoire de l'hôte pour générer des organelles de réplication (Hsu *et al.*, 2010). Les Entérovirus stimulent la synthèse de PI4P au niveau de leurs sites de réplication. Une fraction significative de ce PI4P est produite par l'activité de PI4KIII β , qui est aussi un effecteur majeur de la protéine Arf1 et co-localise avec celle-ci lors de l'infection entérovirale. Cette co-localisation est dépendante de la localisation et de l'activité de GBF1/Arf1. De façon étonnante, l'ARN polymérase entérovirale 3D^{pol} se lierait préférentiellement au PI4P, malgré l'absence de région prédite pour l'attachement au PI4P. En se basant sur ces différentes observations, un modèle a été proposé, sur la réorganisation de la voie sécrétoire au cours de l'infection des entérovirus (Figure 27). En se liant au module GBF1/Arf1, la protéine virale 3A amplifie le recrutement de PI4KIII β au niveau de la

membrane, où la synthèse de PI4P s'effectue (Delang *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2010). GBF1 et Arf1 sont des facteurs de l'hôte, connus comme nécessaires à la réplication entérovirale (Belov *et al.*, 2007; Lanke *et al.*, 2009). Par contre, aucune interaction physique n'a été retrouvée entre 3A et PI4KIII β (Teterina *et al.*, 2011). La synthèse accrue de PI4P aboutit à un enrichissement du microenvironnement membranaire. Ce microenvironnement va à son tour augmenter le recrutement de la polymérase 3D^{pol} qui, en tant que membre du complexe de réplication, va initier la synthèse de l'ARN (Arita *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2010).

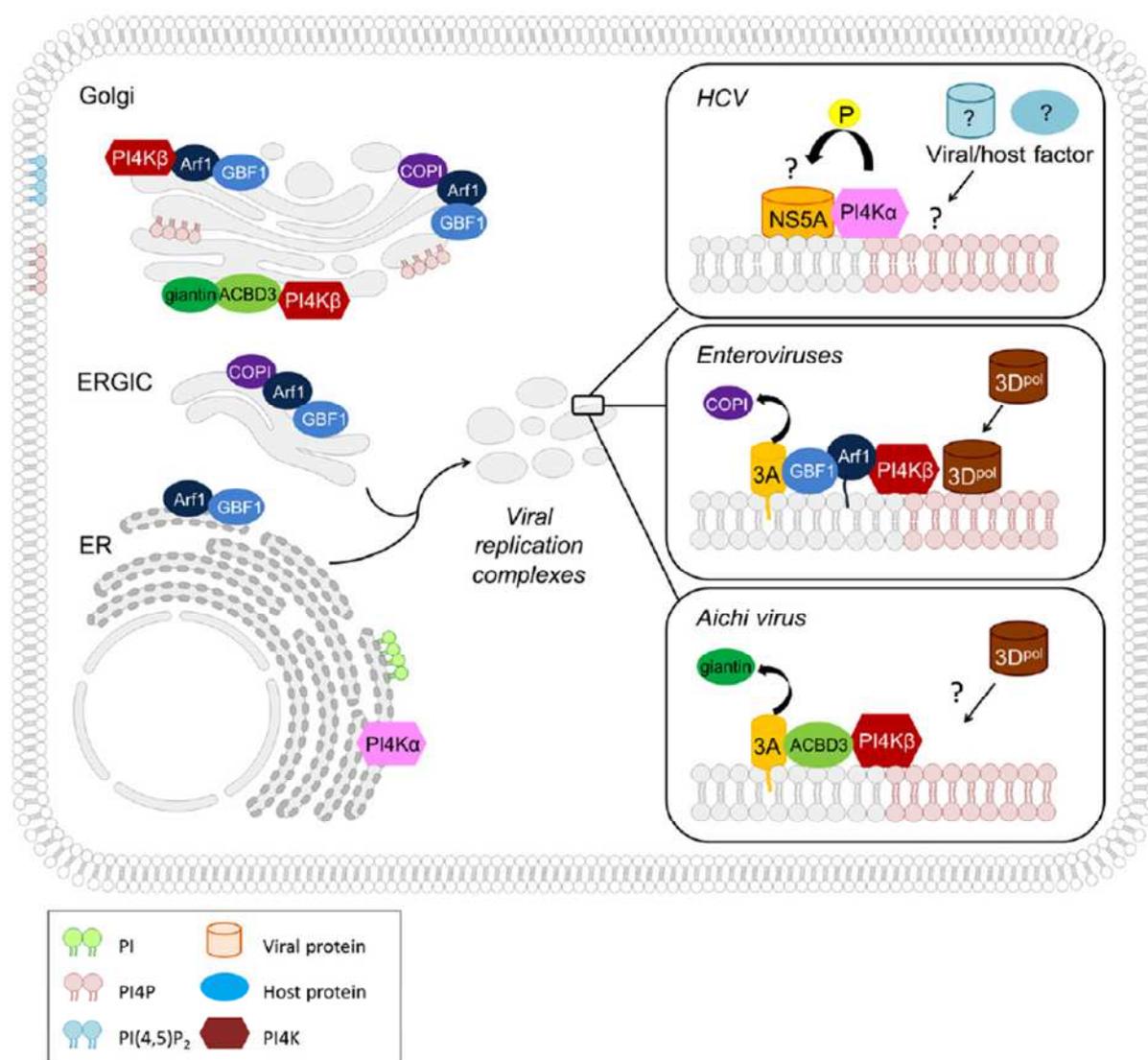


Figure 27 : Vue d'ensemble des différents modes de recrutement des PI4KIII β au niveau des complexes de réplication du VHC, des entérovirus et du Virus Aichi.

PI: Phosphatidyl inositol, ERGIC, compartiment intermédiaire RE-Golgi. D'après (Delang *et al.*, 2012).

Plus récemment, il a été montré que le virus Aichi, un autre Picornavirus appartenant au genre des Kobuvirus nécessitait aussi PI4KIII β pour la réplication de son ARN (Greninger *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2012). Étonnamment, le virus Aichi adopte une stratégie différente des entérovirus pour recruter PI4KIII β au niveau des sites de réplication. En effet, le recrutement de PI4KIII β aux complexes de réplication du virus Aichi est basé sur son interaction avec ACBD3 (Acyl-Coenzyme A Binding Domain protein 3), une protéine du Golgi impliquée dans le maintien de sa structure (Figure 27). Les protéines non structurales 2B, 2BC, 2C, 3A et 3AB du virus Aichi interagissent également avec ACBD3, mais aucune liaison directe entre PI4KIII β et les protéines virales n'a été observée (Sasaki *et al.*, 2012). Comme pour le cas des entérovirus, il y a une accumulation de PI4P au niveau des sites de réplication du virus Aichi. Cependant, il reste à élucider si le PI4P est capable de se lier à la polymérase 3D^{pol} du virus Aichi. Greninger *et al.* ont aussi démontré que la protéine 3A de plusieurs Picornavirus s'associait avec PI4KIII β et ACBD3 (Rhinovirus humain 14, Kobuvirus bovin, Coxsackievirus B3 et Poliovirus) (Greninger *et al.*, 2012).

Au final, deux stratégies de recrutement de PI4KIII β au cours de l'infection des Picornavirus ont été rapportées : (i) liaison et modulation de GBF1/Arf1 pour amplifier le recrutement de PI4KIII β , et (ii) interaction avec ACBD3 pour le recrutement de PI4KIII β . Il sera intéressant d'explorer si tous les Picornavirus requièrent PI4KIII β pour leur réplication et si oui, comment PI4KIII β est recrutée dans les complexes de réplication.

V. PI4KIIs, PI4Ps et VHC

La récente découverte de systèmes de culture permissives à l'infection par le VHC a permis d'élucider le lien étroit entre les lipides de la cellule hôte et le virus, à chaque étape de son cycle. L'entrée du VHC est déclenchée par l'interaction coordonnée dans le temps, entre les particules virales et des récepteurs de surface cellulaire, y compris le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R). La réplication de l'ARN viral dépend des acides gras et de la biosynthèse du cholestérol (Huang *et al.*, 2007; Kapadia *et al.*, 2007). Ce processus de réplication se produit sur des membranes intracellulaires modifiées, formant un « réseau membranaire ». Leur biogenèse est induite par les protéines virales non structurales NS4B et NS5A et exige l'activité des lipides kinases cellulaires appartenant à la famille des PI4KIIs.

Une caractéristique des membranes induites par le VHC est donc la présence de PI4P, synthétisé par ces kinases. Curieusement, certains facteurs cellulaires récemment identifiés comme indispensables au VHC se lient sélectivement à des dérivés de PIs, ce qui suggère un rôle crucial des PIPs dans la réplication virale et l'assemblage. Cet assemblage se produit à la surface des gouttelettes lipidiques et est rattaché de façon étroite à la voie de lipoprotéines de très faible densité conduisant à la formation de lipoviroparticules. Ainsi, le VHC exploite le métabolisme lipidique à bien des égards et peut donc servir de modèle pour mieux comprendre la biogenèse des membranes, la formation de gouttelettes lipidiques et le trafic des lipides (Alvisi *et al.*, 2011; Syed *et al.*, 2010).

Dans ce présent chapitre, nous nous intéressons particulièrement au rôle des PI4KIII α et de leur produit dans le cycle viral du VHC.

Depuis 2009, plusieurs études ont été menées sur l'implication des PI4KIII α dans le cycle biologique du VHC. L'importance de PI4KIII α dans la réplication du VHC est bien établie. En effet, cette kinase a été identifiée dans plusieurs criblages de siRNA, indépendamment du génotype viral et des outils biologiques utilisés (Berger *et al.*, 2009; Borawski *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2009; Trotard *et al.*, 2009; Vaillancourt *et al.*, 2009). En revanche, le rôle de PI4KIII β est encore controversé ; elle semble contribuer à la réplication de réplicons de génotype 1, mais pas à celle de l'isolat JFH1 de génotype 2a (Borawski *et al.*, 2009; Reiss *et al.*, 2011; Trotard *et al.*, 2009). Tai *et al.* ont aussi démontré que l'inhibition de PI4KIII β inhibait la réplication du génotype JFH1, mais que cela n'entraînait pas de modifications au niveau de la morphologie du réseau membranaire (Tai & Salloum, 2011). Néanmoins, ces deux kinases sont supposées effectuer des tâches complémentaires, non redondantes car l'inhibition de chacun des gènes entraîne une diminution de PI4P (Hsu *et al.*, 2010), mais aussi parce que l'effet inhibiteur résultant de l'extinction partielle de PI4KIII α sur la réplication du VHC ne peut être restauré par la surexpression de PI4KIII β (Tai *et al.*, 2009).

Depuis, plusieurs équipes ont proposé un modèle par lequel PI4KIII α interagirait avec le VHC lors de sa réplication. Ainsi, lors de l'infection du VHC, la phosphoprotéine virale NS5A recrute PI4KIII α au « réseau membranaire », pour y augmenter le niveau de PI4P nécessaire à l'intégrité de ce réseau et par conséquent à la réplication virale (Reiss *et al.*, 2011). Cette hypothèse est principalement basée sur trois observations. Tout d'abord, PI4KIII α co-localise à la fois avec NS5A et avec l'ARN viral double-brin au cours de l'infection du génotype 2a JFH1 (Berger *et al.*, 2009; Lim & Hwang, 2011) (Figure 28) et du génotype 1b (Lim &

Hwang, 2011). Ce recrutement est tributaire du domaine DI de NS5A (Reiss *et al.*, 2011). Deuxièmement, NS5A peut stimuler *in vitro* l'activité kinase de PI4KIII α , sans augmenter son expression, conduisant à la production accrue de PI4P (Berger *et al.*, 2011; Reiss *et al.*, 2011). Cela est cohérent avec une étude récente qui indique que NS5A régule l'expression de certains gènes cellulaires requis pour la réplication du VHC, mais pas celle de PI4KIII α , ni PI4KIII β (Maqbool *et al.*, 2013). Troisièmement, l'inhibition de PI4KIII α par le biais de l'ARN interférence, modifie à la fois la localisation subcellulaire de NS5A, et l'architecture du « réseau membranaire » (Reiss *et al.*, 2011; Tai & Salloum, 2011; Tai *et al.*, 2009) et éventuellement aussi sa formation, de même que l'établissement de complexes de réplication du VHC (Berger *et al.*, 2009; Reiss *et al.*, 2011).

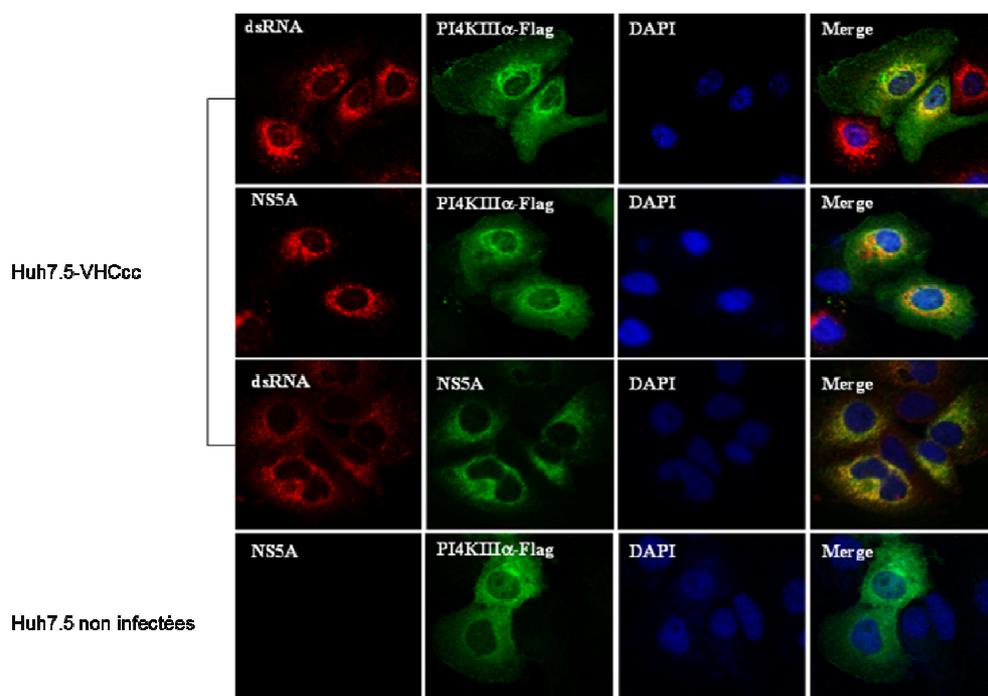


Figure 28 : PI4KIII α est un composant du complexe de réplication de l'ARN du VHC.

Colocalisation de PI4KIII α avec NS5A ou de l'ARN double brin. Des cellules de la lignée Huh7.5 ont été infectées avec du VHCcc, puis transfectées avec un plasmide contenant PI4KIII α . Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-NS5A ou anti-PI4KIII α . Les noyaux sont marqués au DAPI (Lim & Hwang, 2011).

Cependant, l'identité de l'enzyme responsable de la production de PI4P est encore controversée. Alors que certaines équipes mettent en avant PI4KIII α (Berger *et al.*, 2011; Lim & Hwang, 2011; Reiss *et al.*, 2011; Tai & Salloum, 2011), d'autres au contraire pointent PI4KIII β (Hsu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012), en montrant qu'elle co-localise avec les

protéines Arf1 et GBF1 au niveau du Golgi, pour y enrichir la concentration locale en PI4P. D'ailleurs, Goueslain *et al.* ont démontré en 2010 que GBF1 était un facteur cellulaire requis pour la réplication du VHC (Goueslain *et al.*, 2010). Mais Bianco *et al.* ont émis l'hypothèse de l'existence d'un « cross-talk » entre PI4KIII α et PI4KIII β pour le maintien d'un niveau physiologique de PI4P dans le Golgi. En effet, dans leur modèle, ils ont observé que la baisse d'expression de PI4KIII α s'accompagnait d'une augmentation inattendue du pool golgien de PI4P (Bianco *et al.*, 2012).

Reiss *et al.* ont montré que l'activité kinase de PI4KIII α était indispensable à la réplication du VHC (Reiss *et al.*, 2011). Mais une question se pose : comment PI4P contribue-t-il à la réplication du VHC ? La raison pour laquelle le VHC détourne PI4KIII α pour sa réplication reste à clarifier. Une hypothèse serait que le VHC recrute PI4KIII α pour générer un microenvironnement riche en PI4P au niveau du complexe de réplication. Cependant, la fonction de PI4P dans ce complexe de réplication n'est pas claire. En 2005, il a été démontré que PI4P pouvait changer localement la courbure membranaire (McMahon & Gallop, 2005). Les membranes enrichies en PI4P pourraient ainsi générer des poches membranaires de haute courbure, afin de protéger les ARN et les protéines du virus du mécanisme de défense de l'hôte (Stapleford & Miller, 2010). D'un autre côté, PI4P pourrait fournir des sites de liaison pour concentrer des protéines virales et/ou cellulaires au niveau du réseau membranaire, pour une synthèse efficace de l'ARN viral. Pour conforter cet argument, plusieurs protéines cellulaires se liant au PI4P, en l'occurrence OSBP1 et CERT ont déjà été identifiées comme nécessaires à la réplication du VHC (Amako *et al.*, 2009, 2011).

Une autre hypothèse serait que PI4KIII α influe sur la modulation de la phosphorylation de NS5A, en favorisant la synthèse de la forme hypophosphorylée p56 et stimulant ainsi la réplication de l'ARN. Il est supposé que les formes hypophosphorylée p56 et hyperphosphorylée p58 sont impliquées dans la régulation du cycle de réplication virale en favorisant la réplication de l'ARN ou l'assemblage de la particule virale, respectivement. La baisse de l'interaction entre PI4KIII α et NS5A, ainsi que l'inhibition de la réplication de l'ARN du VHC corrélerent avec des niveaux accrus de p58, suggérant que PI4KIII α pourrait être impliquée dans la régulation de la phosphorylation de NS5A (Reiss *et al.*, 2012). Il reste alors à élucider si la phosphorylation de NS5A est directement ou indirectement modulée par PI4KIII α .

Toujours pour tenter de comprendre la contribution de PI4P dans la réplication du VHC, un autre de ses effecteurs, GOLPH3, a été très récemment décrit comme impliqué dans le cycle du VHC. Cependant, l'inhibition de GOLPH3 n'affecterait pas la réplication du VHC, mais réduirait plutôt significativement la quantité d'ARN viral sécrété dans le milieu de culture, suggérant ainsi que GOLPH3 participe ou facilite le processus de sécrétion du virus (Bishé *et al.*, 2012). Toutefois, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse et déterminer si d'autres protéines se liant au PI4P sont requises pour la réplication du VHC. Il sera aussi utile de mieux comprendre l'importance de l'accumulation du PI4P au niveau du complexe de réplication du VHC.

Chapitre 4 :
Carcinome hépatocellulaire,
PI4Ks et cancers

I. Le carcinome hépatocellulaire

Les cancers hépatiques sont de nature variée. On distingue tout d'abord les cancers primitifs du foie, qui peuvent naître des différentes populations cellulaires du foie (hépatocytes, cholangiocytes, cellules associées aux sinusoides...). Ainsi, le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le carcinome fibrolamellaire se développent dans les hépatocytes, tandis que le cholangiocarcinome trouve son origine dans les cholangiocytes, cellules endothéliales des canalicules biliaires. L'angiosarcome quant à lui émerge des cellules des sinusoides hépatiques. A l'inverse, les cancers secondaires du foie ne prennent pas naissance dans le foie, mais correspondent plutôt à l'implantation hépatique de métastases. De façon générale, toutes les tumeurs peuvent métastaser dans le foie. Cependant, en raison de son irrigation, les cancers secondaires du foie sont principalement issus de tumeurs des voies digestives (colon, pancréas et estomac). Dans ce chapitre, nous ne parlerons que du CHC, qui représente à lui seul 85 à 90% des cancers primitifs du foie (Kew, 2002).

A. Epidémiologie et manifestations cliniques du CHC

Le CHC est le cinquième cancer le plus répandu dans le monde, avec environ 750.000 cas diagnostiqués chaque année, et la troisième cause de mortalité par cancer avec 700.000 décès/an (Jemal *et al.*, 2011). Le processus de la carcinogenèse hépatique survient dans 90% des cas sur un foie cirrhotique et les infections par le VHB et le VHC représentent la principale cause de cirrhose (Ikegami *et al.*, 2007).

Chez un patient atteint d'une maladie du foie pouvant être d'origine infectieuse (hépatite virale due au VHB ou au VHC), nutritionnelle (alcool, obésité), toxique (aflatoxine B1) ou génétique (hémochromatose), un tissu cicatriciel remplace les cellules hépatiques endommagées : c'est la fibrose hépatique. Lorsque la fibrose atteint un degré majeur de remaniement tissulaire conduisant à un dépôt important de matrice extracellulaire avec perte de l'architecture hépatique normale et des signes de régénération hépatique, elle est appelée cirrhose. C'est dans un contexte de fibrose/cirrhose que 90% des cancers du foie surviennent (Fattovich *et al.*, 2004; Okuda, 2007; Parkin *et al.*, 2005).

Il existe une grande variabilité géographique dans l'incidence du CHC. Dans les pays en voie de développement de l'Asie ou de l'Afrique sub-saharienne, le principal facteur de risque

reste l'infection par le VHB. Dans ces régions, l'aflatoxine B1 représente un autre facteur de risque aggravant. Cette toxine est produite par les champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, et est majoritairement retrouvée dans les graines stockées dans de mauvaises conditions (atmosphère humide) (Gao *et al.*, 2012). Dans les pays développés où des mesures de prophylaxie ont été prises contre le VHB, le principal facteur de risque est le VHC. Dans ces pays, le développement de la cirrhose est également étroitement corrélé à une forte consommation d'alcool (Morgan *et al.*, 2004). De façon inquiétante, l'augmentation de l'incidence de l'obésité et du diabète dans ces pays développés représente aussi des facteurs de risques supplémentaires.

La recherche de thérapies ciblées efficaces dans le traitement du CHC a conduit à l'élaboration d'une stratégie visant à classer les tumeurs, afin de mieux les cibler. Ainsi, plusieurs études ont permis d'élaborer des classifications standard pour le diagnostic et le pronostic du CHC. Une des classifications les plus utilisées en clinique est celle d'Edmonson-Steiner. Edmonson et Steiner ont défini une classification basée sur le degré de différenciation du CHC, en quatre grades (I-IV). Le Tableau 3 décrit les caractéristiques de chaque grade défini par Edmonson et Steiner en 1954.

Tableau 3 : Classification d'Edmonson-Steiner.

Grade I	CHC bien différencié d'aspect trabéculaire
Grade II	CHC bien différencié, trabéculaire, avec cytoplasmes abondants ; noyaux plus larges, hyperchromatiques, nucléolés ; rares aspects acineux ou glandulaires
Grade III	atypies nucléaires marquées (>grade II) ; cellules géantes multinucléées, bile moins abondante, rares formations acineuses.
Grade IV	CHC peu différencié

La Figure 29 ci-dessous montre les caractéristiques histologiques de différents grades de CHC, selon un mode de classification qui se rapproche de celui utilisé par Edmonson et Steiner.

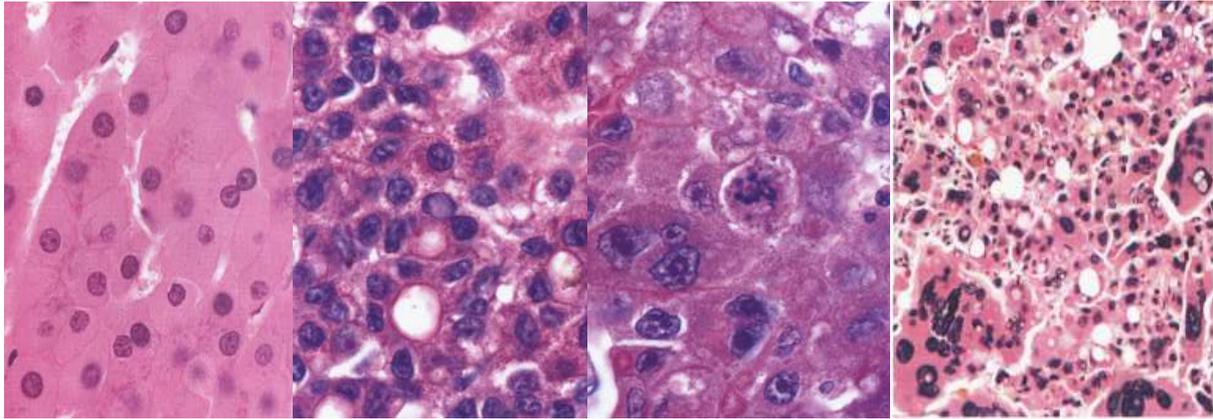


Figure 29 : Carcinome hépatocellulaire de Grade 1 à 4 (respectivement de gauche à droite).

Grade 1 : Les cellules tumorales ont un cytoplasme éosinophile abondant et rond avec un noyau régulier. Histologiquement, ces cellules ne peuvent pas être distinguées de cellules de foie normal. **Grade 2** : Le rapport noyau/cytoplasme est important, un noyau irrégulier, un hyper chromatisme et des nucléoles proéminent.

Grade 3 : Présence d'un nombre plus important de pléomorphisme nucléaire que dans les tumeurs de grade 2.

Grade 4 : Pléomorphisme nucléaire marqué avec des cellules géantes. D'après l'Atlas of tumor pathology, Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts. Kamal G. Ishak; Zachary D. Goldman and J.Thomas Stocker (AFIP).

B. Altérations génétiques dans le CHC

La carcinogénèse hépatique est un processus multi-étapes impliquant des modifications de plusieurs facteurs génétiques qui peuvent être divisées en au moins 4 groupes :

- les gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*, *Rb*, *PTEN*, *RUNX3*),
- les oncogènes (*myc*, *K-Ras*, *B-Raf*),
- les facteurs de croissance et leurs récepteurs (*TGF- α* , *IGF-2*)
- les altérations activant les voies de développement Wnt/ β -caténine (CTNNB1) et la voie Hedgehog (Shiraha *et al.*, 2013).

Nous nous intéresserons à quelques uns de ces facteurs génétiques dans la suite de cette section.

- Le gène *p53* joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire, la régulation transcriptionnelle et l'apoptose (Bourdon, 2007; Vousden & Lane, 2007). C'est aussi le gène le plus largement étudié dans les tumeurs solides, et des mutations de ce gène ont été identifiées dans une variété de cancers humains (Hollstein *et al.*, 1991; Nigro *et al.*, 1989). *p53* est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans le CHC (20% des cas). De façon intéressante, les mutations de *p53* ne sont pas retrouvées

dans les tumeurs hépatocellulaires bénignes. Épidémiologiquement, les mutations de *p53* sont fréquemment retrouvées dans le CHC induit par l'aflatoxine B1 (~ 50%) (Buendia, 2000; Tannapfel *et al.*, 2001). En effet, cette toxine présente la particularité d'induire des mutations de *p53*, ce qui favoriserait alors une instabilité chromosomique et l'hépatocarcinogénèse (El-Serag & Rudolph, 2007).

- Le gène du rétinoblastome (*Rb*) est un autre gène suppresseur de tumeur largement étudié dans le CHC et dans d'autres tumeurs solides. Il contrôle la progression dans le cycle cellulaire en réprimant les protéines de la famille des facteurs de transcription E2F. Il a en effet été montré que l'augmentation de l'expression des protéines E2F-1 et E2F-2 était nécessaire à l'hépatocarcinogénèse (Conner *et al.*, 2000). Des mutations de *Rb* ont été retrouvées dans environ 15% des CHC (Ozturk, 1999).
- La phosphatase PTEN est un gène suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie de signalisation des PI3Ks/Akt, voie impliquée dans la régulation de la survie cellulaire (Li & Sun, 1998). L'absence ou la réduction de l'expression de PTEN a été retrouvée dans environ 40% des CHC (Hu *et al.*, 2003).
- Les mutations activatrices de la voie Wnt/CTNNB1 sont retrouvées dans 20 à 40% des CHC (de La Coste *et al.*, 1998). Cette voie de signalisation régule notamment l'expression de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (cycline D1 par exemple). Dans les cellules saines, CTNNB1 est hautement régulée par le complexe APC/axine/GSK3 qui stimule continuellement sa dégradation protéasomale (Clevers & Nusse, 2012). Dans le cancer du foie, il a été montré que l'inhibition hépato-spécifique de l'*APC*, gène lié à polypose adénomateuse familiale était suffisante pour induire l'hépatocarcinogénèse chez la souris, et que ceci était lié à l'accumulation anormale de CTNNB1 (Colnot *et al.*, 2004).

- L'expression du facteur de croissance TGF- α est augmentée dans la plupart des cas de CHC (81%) (Schaff *et al.*, 1994). TGF- α stimule la prolifération des cellules dans le CHC en activant la voie de signalisation du récepteur à l'EGF. La surexpression de TGF- α pourrait être associée à l'infection par le VHB (Hsia *et al.*, 1992).
- La voie de signalisation du facteur de croissance IGF-2 est également impliquée dans l'hépatocarcinogénèse. Des mutations du récepteur de IGF-2 sont fréquemment retrouvées dans le CHC (25-55% des cas) (De Souza *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1997). La modification de ce récepteur entraîne la surexpression de IGF-2, car le récepteur induit la dégradation de l'IGF-2 en condition normale. Le récepteur de l'IGF-2 active également le facteur de croissance TGF- β , un régulateur négatif de la croissance des cellules (Dennis & Rifkin, 1991). La modification du récepteur au TGF- β lui-même a également été constaté dans le CHC (~ 10% des cas) (Kawate *et al.*, 1999).

II. PI4Ks, PI4P et cancers

Les changements dynamiques dans les concentrations membranaires de PIs régulent de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, les réarrangements du cytosquelette et la motilité cellulaire (Paolo & Camilli, 2006). Ces modulations sont induites par plusieurs PI Kinases, PI Phosphatases, phospholipases et sont souvent dérégulées dans les cancers, conduisant à une tumorigénèse et des métastases (Yuan & Cantley, 2008). Plusieurs découvertes récentes indiquent que les PI4Ks peuvent jouer un rôle important dans la pathogénèse de certains cancers. Dans cette section, nous nous intéresserons aux PI4Ks et au PI4P, leur produit.

A. PI4P et cancers

Les données actuelles suggèrent que des réductions importantes de la synthèse de PI4P peuvent avoir un impact sur la viabilité ou la prolifération cellulaire, de façon spécifique aux types cellulaires et aux isoformes PI4Ks. En 2010, Chu *et al.* ont montré qu'une inhibition de l'expression de PI4KII α ou PI4KIII β conduisait à une réduction de 70-80% de la production de PI4P. Cela résultait en une diminution de la prolifération cellulaire et à l'apoptose des cellules MDA-MB-231, provenant d'une lignée de cancer du sein (Chu *et al.*, 2010). Cependant, dans les cellules COS-7 de la lignée rénale du singe vert d'Afrique, l'apoptose n'a été observée qu'après l'extinction de l'expression de PI4KII α seule, indiquant que les cellules diffèrent dans leurs dépendances par rapport aux PI4Ks, pour la survie cellulaire (Chu *et al.*, 2010). Par ailleurs, dans les cellules COS-7, la surexpression d'une version inactive pour l'activité kinase de PI4KII α entraînerait une diminution de l'activation d'Akt, protéine kinase impliquée dans la croissance et la survie cellulaire. La forme kinase inactive de PI4KII α induirait un trafic endosomal défectueux par modification du recrutement d'AP-3 (Craigie *et al.*, 2008), mais n'inhiberait pas la synthèse de PI4P endogène (Wang *et al.*, 2003). La conclusion serait donc que les fonctions non-catalytiques des PI4Ks pourraient être importantes pour le maintien de la signalisation pro-survie.

De façon intéressante, Reiss *et al.* ont retrouvé des niveaux élevés de PI4P chez des patients chroniquement infectés par le VHC, par une analyse en immunohistochimie de sections consécutives d'échantillons de foie congelés. Des cellules positives au marquage de NS5A ou de la protéine de capsid C ont été trouvées uniquement dans les tissus obtenus à partir des patients infectés par le VHC. Surtout, le marquage de NS5A, de la protéine de capsid C et de PI4P (Figure 30) révèle que les zones infectées par le VHC sont toujours enrichies en PI4P, indiquant ainsi que l'infection par le VHC entraîne effectivement des niveaux élevés de PI4P. Par ailleurs, ils ont également montré que PI4KIII α était responsable de cette production accrue de PI4P dans le cadre d'une infection par le VHC. En réalisant des expériences de co-localisation entre PI4KIII α , PI4KIII β et les protéines virales, ils ont constaté que seule PI4KIII α interagissait avec NS5A. Ils ont alors proposé que PI4KIII α était recrutée au complexe de réplication par NS5A, ce qui stimulait ainsi son activité kinase, conduisant aux niveaux élevés de PI4P (Reiss *et al.*, 2011).

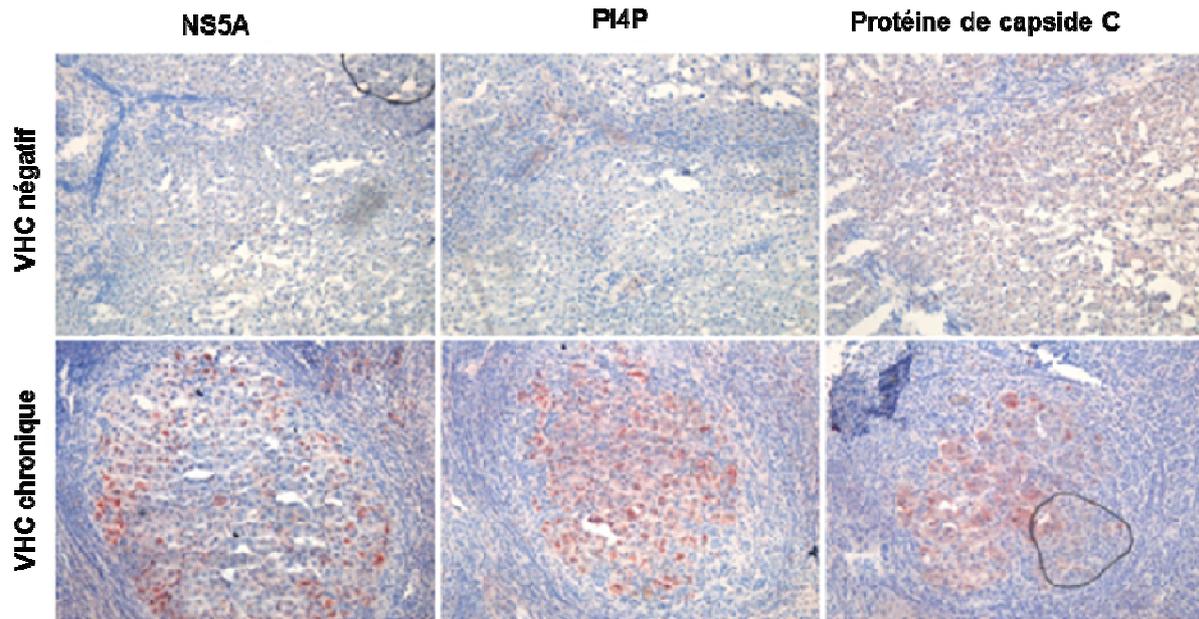


Figure 30 : Immunohistochimie sur les tissus du foie congelés provenant d'un patient non infecté par le VHC et d'un patient infecté chroniquement par le VHC.

Des sections hépatiques consécutives ont été colorées pour NS5A, PI4P, et la protéine de capsid C. Notez que les cellules présentant une coloration positive pour les protéines virales et PI4P résident dans la même région de chaque section (Reiss *et al.*, 2011).

B. PI4KIII α dans le cancer du pancréas et dans la chimiorésistance

L'implication possible de PI4KIII α dans le cancer du pancréas découle d'une étude qui a comparé l'expression du gène entre deux lignées de cellules de carcinome pancréatique ayant des caractéristiques différentes. Cette étude a identifié PI4KIII α et la MAPK kinase 2, comme associées à un phénotype plus invasif et métastatique (Ishikawa *et al.*, 2003).

Fait intéressant, dans une autre étude chez le poisson zèbre, l'inhibition de l'expression de PI4KIII α induisait des anomalies du développement. Ces anomalies ont été attribuées à la perturbation de l'axe de signalisation du récepteur au facteur de croissance fibroblastique (Fibroblast Growth Factor : FGF), stimulé par la voie MAPK (Ma *et al.*, 2009). STT4, l'orthologue de PI4KIII α chez la levure, contrôle également la cascade MAPK (Audhya & Emr, 2002). Ces deux études génétiques ont révélé une synergie inattendue entre PI4KIII α et la signalisation des MAPKs, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la signification de ces résultats dans le cancer (Waugh, 2012).

Deux études distinctes ont également mis en lumière l'importance de PI4KIII α dans la chimiorésistance. Un criblage par ARN interférence a identifié PI4KIII α comme médiateur de

la résistance au cisplatine dans des lignées cellulaires de médulloblastome (Guerreiro *et al.*, 2011). Cette isoforme a également été identifiée comme étant importante pour la résistance à la gemcitabine dans des cellules d'adénocarcinome pancréatique (Giroux *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que PI4KIII α pourrait avoir une fonction encore sous-estimée dans la chimiorésistance constitutive de cancers qui sont récalcitrants à l'induction apoptotique.

C. PI4KIII β et cancer du sein

Peu de données existent concernant l'implication de PI4KIII β dans les cancers. Néanmoins, des études sur des lignées cellulaires de cancer du sein ont montré que l'expression de PI4KIII β était anti-apoptotique pour les cellules MDA-MB-231 (Chu *et al.*, 2010) et que la surexpression de cette isoforme dans les cellules MCF 10A (cellules de glandes mammaires fibrocystiques) perturbait entre autres la morphogénèse acinaire *in vitro* (Pinke & Lee, 2011). Ces deux études pointent donc un rôle potentiel de PI4KIII β dans le cancer du sein. De plus, des données indiquent que cette enzyme pourrait fonctionner en aval du facteur d'élongation 1 α , une protéine qui est surexprimée dans les tumeurs du sein (Kulkarni *et al.*, 2007; Tomlinson *et al.*, 2005) et dans les tumeurs ovariennes (Anand *et al.*, 2002).

D. PI4KII α dans la régulation de récepteurs et dans le cancer

Une étude récente a montré que PI4KII α était surexprimée dans de nombreux cancers humains, tels que dans le mélanome, le fibrosarcome, le cancer du sein, le carcinome de la vessie ou encore le carcinome de la thyroïde (Li *et al.*, 2010). Dans cette étude, Li et ses collaborateurs ont rapporté que la surexpression de PI4KII α favorisait l'angiogenèse de la tumeur grâce à une production accrue du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) et d'un facteur induit par l'hypoxie, mais aussi via des modifications des cascades de signalisation impliquant les PI3Ks et la protéine kinase ERK (Li *et al.*, 2010). PI4KII α a également été montrée comme étant importante dans la signalisation de Wnt (Pan *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2009), et pour le trafic endosomal activé par le récepteur à l'EGF (Minogue *et al.*, 2006). Les travaux futurs dans ce domaine devront se concentrer sur la compréhension de la façon dont les fonctions de PI4KII α dans le réseau trans-golgien et dans le trafic endosomal deviennent dysfonctionnelles dans le cadre d'un cancer. Ces travaux devront également déterminer comment cela pourrait avoir un impact sur la compartimentalisation des récepteurs stimulés par les cascades de signalisation (Waugh, 2012).

E. PI4KII β et le carcinome hépatocellulaire

PI4KII β est fortement exprimée dans le foie et son rôle anti-métastatique dans le CHC a été proposé (Mazzocca *et al.*, 2008). L'expression de PI4KII β dans les cellules hépatiques aboutit à une augmentation du trafic de CD81, de la membrane plasmique vers les vésicules intracellulaires qui séquestrent également l'actine ; ce qui conduit à un remodelage du cytosquelette d'actine et inhibe la migration cellulaire. Inversement, la réduction de l'expression de PI4KII β conduit à une augmentation de la motilité cellulaire (Mazzocca *et al.*, 2008), qui représente une étape clé dans le développement d'un CHC invasif et métastatique. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour élucider le mécanisme par lequel cette isoforme peut potentiellement maintenir les niveaux de CD81 à la surface cellulaire.

*Cadre et
objectifs du
travail de thèse*

« Celui qui se donne la peine de se courber ne se relèvera pas sans rien. »

Proverbe mossi (Burkina Faso)

Depuis la découverte du VHC en 1989, de nombreux travaux ont été effectués pour étudier les interactions entre le pathogène et son hôte. Ainsi, au cours des étapes d'entrée du virus dans la cellule hôte, plusieurs facteurs cellulaires indispensables ont été identifiés. Lors du 2nd semestre 2009, cinq équipes dont la nôtre, ont découvert que la propagation du VHC dans des cellules de la lignée hépatique humaine Huh7.5.1 nécessitait l'expression de 2 kinases cellulaires : les phosphatidylinositol 4-kinases de type III, α et β (PI4KIII α et PI4KIII β) (Berger *et al.*, 2009; Borawski *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2009; Trotard *et al.*, 2009; Vaillancourt *et al.*, 2009). Ces différents travaux ont principalement montré l'importance de PI4KIII α au cours de la réplication du VHC. En revanche, contrairement aux données obtenues par une autre équipe (Berger *et al.*, 2009), nos résultats expérimentaux suggéraient que les PI4KIII α étaient également impliquées au cours de l'entrée du VHC, avec une dépendance plus ou moins marquée selon le génotype viral (Trotard *et al.*, 2009).

Bien que plusieurs équipes de recherche s'accordent sur le fait que PI4KIII α pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle, toutes les études qui avaient été réalisées jusque-là ont été faites sur des lignées hépatiques humaines. Les interactions entre le virus et des cellules transformées peuvent ne pas refléter correctement celles survenant *in vivo* dans des hépatocytes humains. Afin de confirmer l'implication des PI4KIII α au cours de l'entrée du VHC, notre principal projet de recherche consistait à exploiter les cultures primaires d'hépatocytes humains, sachant que ces cellules présentent à la fois un état de différenciation hépatique plus proche de l'*in vivo* et une polarisation bien établie.

Ainsi, le premier objectif de ma thèse se résumait en deux axes principaux :

- Vérifier l'importance de l'activité kinase des PI4KIII α au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires, à travers une approche chimique ;
- Valider l'implication de ces kinases et de leur activité enzymatique au cours de l'entrée virale dans les hépatocytes humains primaires grâce à une approche génétique basée sur l'ARN interférence et la restauration de phénotype.

Sachant que les enzymes du métabolisme des phosphoinositides (kinases et phosphatases) sont souvent dérégulées au cours des cancers (Waugh, 2012), notre second objectif était d'étudier l'expression de PI4KIII α au cours de pathologies hépatiques.

Outils expérimentaux

« Qui veut du miel doit avoir le courage d'affronter les abeilles. »

Proverbe sénégalais

I. Culture cellulaire

Toutes les cellules ont été maintenues à 37°C, avec 5% de CO₂ et sous atmosphère humide.

A. Les hépatocytes humains primaires

Les hépatocytes humains sont isolés à partir de fragments de foie, issus de déchets opératoires obtenus auprès de patients ayant subi une hépatectomie partielle. Les fragments exploités sont prélevés dans une zone du tissu jugée saine, d'un point de vue macroscopique. Toutes les procédures expérimentales sont conduites en accord avec les réglementations et les lois françaises et ont été approuvées par le Comité National d'Éthique. Les cellules sont isolées selon une méthode décrite par Guguen-Guillouzo et Guillouzo (1986), puis ensemencées à forte densité ($0,2 \cdot 10^6$ cellules/cm²) dans du milieu William's E (Invitrogen) complémenté avec $3,5 \cdot 10^{-7}$ M d'hydrocortisone hemisuccinate (Roussel), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), 50 mg/L de gentamicine (Sigma), 100 unités/mL de pénicilline (Invitrogen), 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen), 5 µg/mL d'insuline (Sigma) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco). Le lendemain de l'ensemencement, puis tout au long de la culture, le milieu de culture est renouvelé tous les 2 ou 3 jours. Ce dernier milieu diffère de celui utilisé à l'ensemencement par la présence de $3,5 \cdot 10^{-6}$ M d'hydrocortisone hemisuccinate, 5% de SVF, 2% de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma) et 5% de sérum humain issu de patients hémochromatosiques ayant subi une phlébotomie, dans le cadre de leurs traitements.

B. Les lignées cellulaires

Les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1 sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamine) (Gibco), complémenté avec 100 unités/mL de pénicilline (Invitrogen), 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen), 1 mM d'HEPES (Invitrogen), 2,24 mM L-Glutamine (Invitrogen), des acides aminés non essentiels (Sigma) et 10% SVF (Gibco) décomplémenté (30 min à 56°C).

Les cellules de la lignée HEK 293T (Human Embryonic Kidney) sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamine), complémenté avec 100 unités/mL de pénicilline (Invitrogen), 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen) et 10% de SVF (Gibco) décomplémenté.

II. Constructions plasmidiques

Afin d'inhiber l'expression des gènes *PI4KIII α* et *PI4KIII β* , nous avons utilisé des plasmides pLKO.1 contenant les séquences shRNA spécifiques de chaque cible (Openbiosystems). Les tableaux ci-dessous représentent les différentes séquences shRNA.

Tableau 4 : Séquences des shRNA ciblant PI4KIII α

Nom	Séquence de 5' vers 3'	Zone ciblée
shA1	CCGGCGCCATGTTCTCAGATAAGAACTCGAGTTCCTATCTGAGAACATGGCGTTTTTG	ORF
shA2	CCGGGCGGGAGTTTGATTCTTTAACTCGAGTTAAAGAAATCAAACCTCCCGTTTTTG	ORF
shA3	CCGGCCACTACATCTGGATCGACTTCTCGAGAAGTCGATCCAGATGTAGTGGTTTTTG	ORF
shA4	CCGGGCGTGAAGACATAAGCATCATCTCGAGATGATGCTTATGTCTTCACGCTTTTTG	ORF
shA5	CCGGGCCAGGTTTAAGAACACAGAACTCGAGTTCGTGTTCTTAAACCTGGCTTTTT	ORF
shA6	CCGGCCGATGTGGTTCCAAATGCAACTCGAGTTCATTGGAACCACATCGGTTTTTG	ORF
shA7	CCGGGCTGCACAAATACTACATGAACTCGAGTTCATGTAGTATTTGTGCAGCTTTTT	ORF
shA8	CCGGCCAGTTCATCTGGAACATGAACTCGAGTTCATGTCCAGATGAACTGGTTTTT	ORF
shA9	CCGGGCGTCTCATCACATGGTACAACCTCGAGTTGTACCATGTGATGAGACGCTTTTT	ORF
shA10	CCGGCAAGCTCTTGAAGCACAGGTTCTCGAGAACCTGTGCTTCAAGAGCTTGTTTTT	ORF
shA11	CCGGCCGATGTGGTTCCAAATGCAACTCGAGTTCATTGGAACCACATCGGTTTTTG	ORF
shA12	CCGGCCTCTGTTGCACTGGACATACTCGAGTATGTCCAGTGCAAACAGAGGTTTTTG	3'NC
shA13	CCGGCGGCAACATTATGCTGGACAACCTCGAGTTGTCCAGCATAATGTTGCCGTTTTTG	ORF
shA14	CCGGCGACCTCTTCAAGAACATCTTCTCGAGAAGATGTTCTTGAAGAGGTCGTTTTTG	ORF
shA15	CCGGCATCGACCTCTTCAAGAACATCTCGAGATGTTCTTGAAGAGGTCGATGTTTTTG	ORF

Zone ciblée : NC = Non Codante, ORF = Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture

Tableau 5 : Séquences des shRNA ciblant PI4KIII β

Nom	Séquence de 5' vers 3'	Zone ciblée
shB1	CCGGTCTCGGTA CTTAGGACTTGATCTCGAGATCAAGTCCTAAGTACCGAGATTTTT	3'NC
shB2	CCGGCCATACAAGATTCTTGTGATTCTCGAGAATCACAAGAATCTTGTATGGTTTTT	ORF
shB3	CCGGCCGAGAGTATTGATAATTCATCTCGAGATGAATTATCAATACTCTCGGTTTTT	ORF
shB4	CCGGCGACATGTTCAACTACTATAACTCGAGTTATAGTAGTTGAACATGTCGTTTTT	3'NC
shB5	CCGGCCAGTTGCTTAACATGTACATCTCGAGATGTACATGTTAAGCAACTGGTTTTT	ORF

pLKO.1 shRNA contrôle (shNT, Non Targeting) :

shNT : CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTT

Rouge : brin sens ; Vert : boucle ; Bleu : brin antisens

Afin de réaliser les expériences de restauration du phénotype, nous avons utilisé différentes constructions plasmidiques contenant les formes sauvages (WT) et mutées (KD) de nos gènes d'intérêt. Les plasmides pWPi-HA-PI4KIII α 230 kDa (WT) (pWPi-CA WT) et pWPi-HA-PI4KIII α -D1957A 230 kDa (KD) (pWPi-CA KD) ont été fournis par le Dr Lohmann (Allemagne). Les plasmides pLV-HA-PI4KIII β 110 kDa (WT) (pLV-CB WT) et pLV-HA-PI4KIII β 110 kDa D656A (KD) (pLV-CB KD) ont été obtenus auprès du Dr Balla (USA). Pour exemples, les constructions pWPi-CA WT et pLV-CB WT sont présentées ci-dessous.

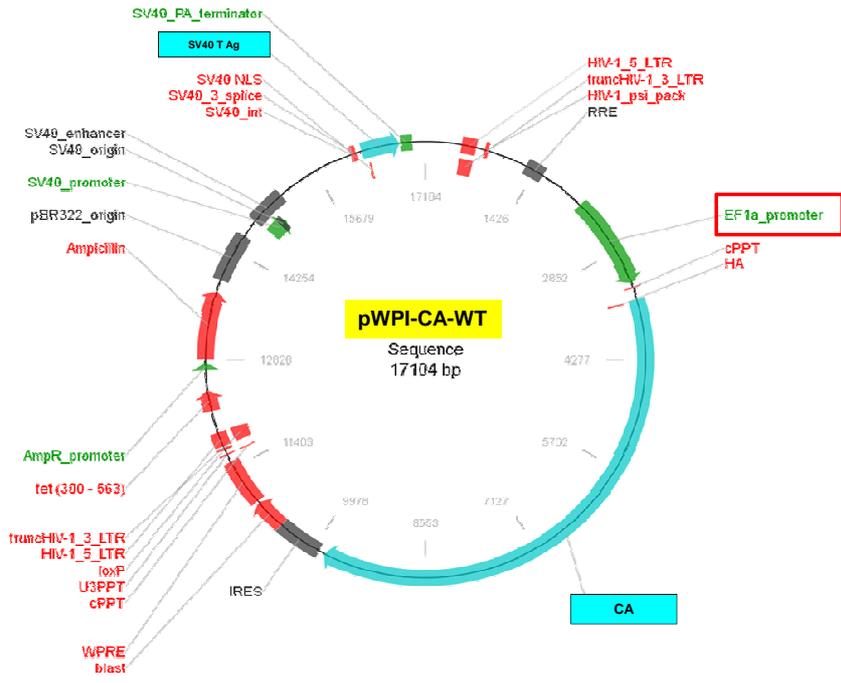


Figure 31 : Représentation schématique du plasmide codant pour le gène *PI4KIII α* WT

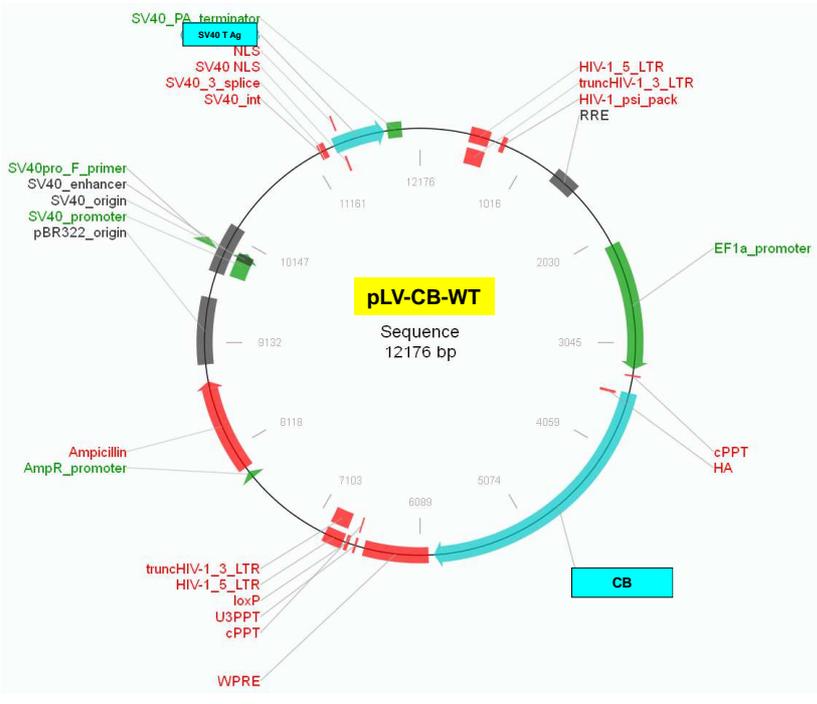


Figure 32 : Représentation schématique du plasmide codant pour le gène *PI4KIII β* WT

III. Production de particules virales

A. Pseudoparticules VHCpp

Elles ont été produites par co-transfection au phosphate de calcium des cellules de la lignée HEK 293T avec trois vecteurs : un vecteur de transfert (pLL3.7 Rluc) (Rubinson *et al.*, 2003) contenant la séquence de la *Renilla luciferase*, des vecteurs contenant les gènes nécessaires à la formation des particules virales (pMDLg/pRRE et pRSV/Rev) (Dull *et al.*, 1998) et un vecteur exprimant les protéines d'enveloppe du VCH (pCMV E1E2, clone H77) (Bartosch *et al.*, 2003a). Au final, 15 µg de pLL3.7 Rluc, 12,5 µg pMDLg/pRRE, 4 µg de pRSV/Rev et 8 µg de pCMV E1E2 ont été utilisés pour la transfection de 7.10^6 cellules.

Les surnageants des cellules productrices ont été collectés 48 et 72h après transfection, puis ont été filtrés (0,45 µM) pour éliminer les cellules en suspension. Les particules ont été alors concentrées 100 fois par ultracentrifugation (75 000 g pendant 2h à 4°C) sur un coussin de sucrose concentré à 20%. Les culots ont enfin été repris dans le milieu d'entretien des cellules Huh7.5.1, puis conservés à -80°C.

B. Particules dérivées de clone cellulaire VHCcc

Les particules VHCcc chimériques J6/JFH1 de génotype 2a ont été générées en électroporant (choc unique à 900 µF et 270 V) des cellules Huh7.5.1 (4.10^6) avec 20 µg d'ARN issu du plasmide pFL-J6/JFH-5'C19Rluc2Aubi (obtenu auprès du Dr Rice, USA). Le surnageant des cellules productrices a été collecté 48h et 72h post-transfection puis filtré (0,45 µM) pour éliminer les cellules en suspension. Les virus ont ensuite été conservés à -80°C.

C. Particules lentivirales contenant les shRNA ou les gènes *PI4KIIIα* et *PI4KIIIβ*, *WT* et *KD*

Les vecteurs lentiviraux comportant les shRNA ou les gènes d'intérêt ont été produits selon un protocole similaire à celui dédié à la production de VHCpp. Les cellules de la lignée HEK 293T ont été co-transfectées au phosphate de calcium avec :

- le vecteur de transfert, contenant un shRNA de la cible, le shNT ou les gènes d'intérêt ;
- le vecteur d'empaquetage psPAX2, et

- le vecteur pMD2/G contenant la protéine d'enveloppe G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G).

Au total, 22,5 µg de pLKO.1 shRNA ou de plasmide comportant le gène *PI4KIIIα* et *PI4KIIIβ*, *WT* et *KD*, 14,9 µg de psPAX2 et 7,9 µg de pMD2/G ont été utilisés pour la transfection de 7.10^6 cellules. La suite du protocole reste identique à celui utilisé pour la production de VHCpp.

Le protocole de production est schématisé sur la Figure 33 ci-dessous :

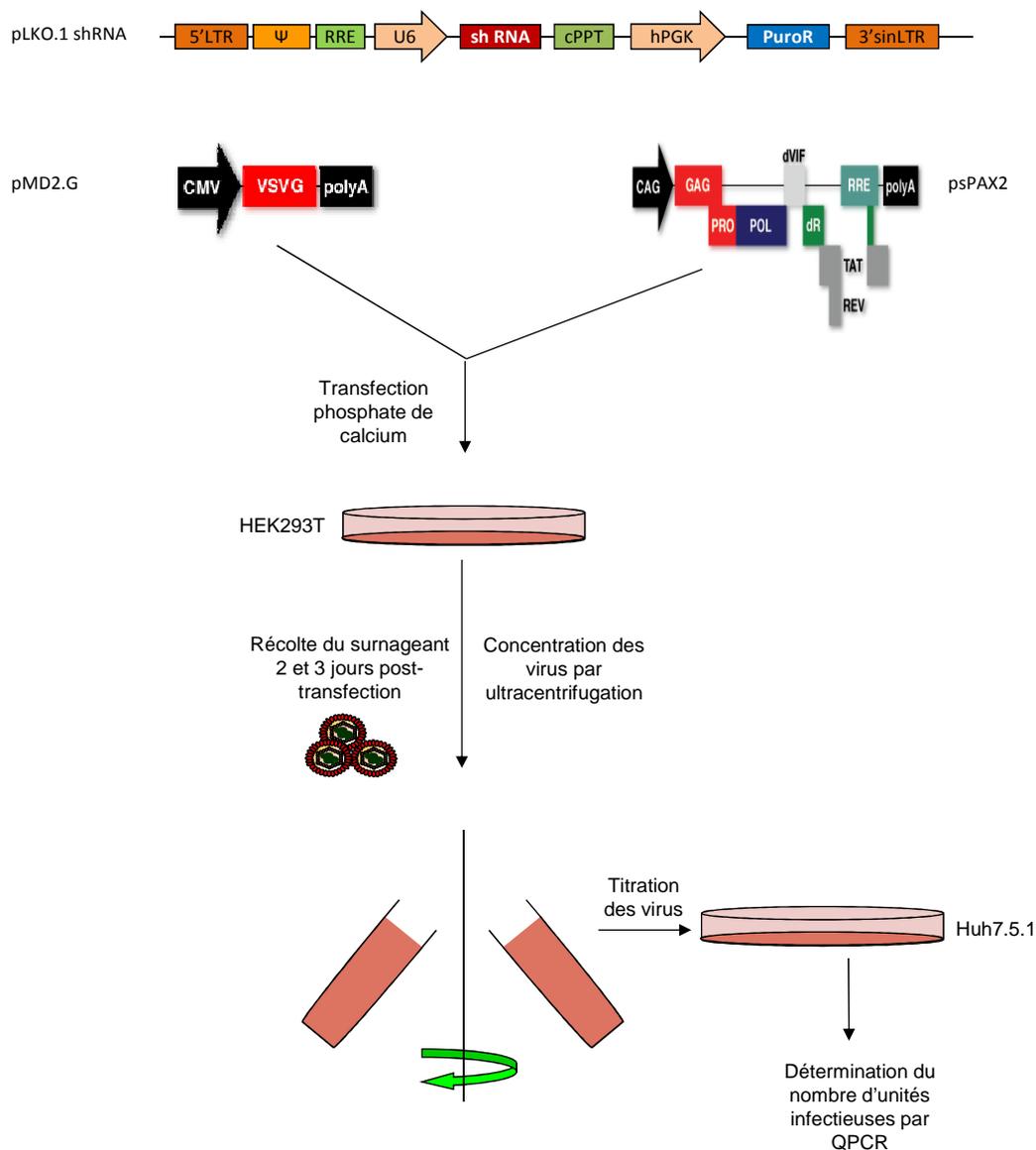


Figure 33 : Principe de production des lentivirus-shRNA.

IV. Titration des particules virales

Pour la titration des particules VHCpp et VHCcc, les cellules Huh7.5.1 ont été ensemencées à 10 000 cellules/cm² dans une plaque 96 puits. Le lendemain, elles ont été infectées avec des dilutions effectuées en série au dixième (de 10⁻¹ à 10⁻⁶), dans un volume final de 50 µL. Cinq jours après, les cellules ont été lysées afin de révéler les puits infectés en analysant la luminescence à l'aide du kit « Renilla Assay Luciferase » (Promega), selon le protocole du fabricant. La lecture de la luminescence est réalisée avec le luminomètre Centro XS3 LB960 (Berthold Technologies). La quantité de particules virales infectieuses est déterminée par le calcul du TCID₅₀/mL selon la méthode de Reed & Muench.

Pour la titration des lentivirus contenant les shRNA ou les gènes *PI4KIIIα* ou *PI4KIIIβ* WT ou KD, les cellules Huh7.5.1 ont été ensemencées à 25 000 cellules/cm² dans une plaque 24 puits. Le lendemain, elles ont été infectées avec des dilutions de virus au 1/125, 1/250 et 1/1000, dans un volume final de 250 µL. Trois jours après, l'ADN génomique total a été extrait à l'aide du kit « NucleoSpin Tissue XS » (Macherey Nagel), selon les recommandations du fournisseur. Une PCR quantitative a été réalisée en utilisant des oligonucléotides ciblant une région des vecteurs de transfert ; A₂-F : AGCAACCCTCTATTGTGTGC et A₂-R : GTGCGGTGGTCTTACTTTTG. Le titre viral a alors été calculé en déterminant le nombre de particules transduites dans les cellules. Pour cela, nous disposons d'une gamme réalisée à partir d'un lentivirus contrôle comportant la GFP, dont le titre avait été préalablement déterminé par FACS. Le protocole de la PCR quantitative sera détaillée plus bas, dans une autre section.

V. Procédures d'infection

A. Protocole d'inhibition de *PI4KIIIα* et *PI4KIIIβ*

Le lendemain de l'ensemencement, les hépatocytes humains primaires ou les cellules Huh7.5.1 ont été transduits avec les lentivirus contenant les séquences sh*PI4KIIIα*, sh*PI4KIIIβ*, ou le shNT. Pour cela, les lentivirus ont été dilués afin d'atteindre les multiplicités d'infections souhaitées (Multiplicity Of Infection : MOI). Le volume final d'infection est de 50 µL pour un puits de 0,32 cm² de diamètre (MW96), dédié au test de susceptibilité à l'infection par le VHCpp ou le VHCcc. Il est de 250 µL pour un puits de 2

cm² (MW24), dédié à l'extraction d'ARN totaux ou de protéines totales. La durée de la transduction est de 6 h.

Trois (pour les cellules Huh7.5.1) ou cinq jours (pour les hépatocytes humains primaires) plus tard, les cellules ont été infectées avec les pseudoparticules VHCpp. Pour cela, une MOI de 0,2 TCID₅₀/mL (pour les hépatocytes humains primaires) ou 0,02 TCID₅₀/mL (pour les cellules Huh7.5.1) a été utilisée dans un volume final de 50 µL dans une plaque 96 puits. L'infection se fait sur la nuit (~16h).

B. Protocole de restauration de l'infection par le VHC

Le lendemain de l'ensemencement, les hépatocytes humains primaires ou les cellules Huh7.5.1 ont été transduits avec les lentivirus comportant les gènes d'intérêt, sauvages ou mutés. Pour cela, les lentivirus ont été dilués à la MOI souhaitée, dans un volume final de 50 µL pour un puits de 0,32 cm² (MW96) et de 250 µL pour un puits de 2 cm² (MW24). La durée de la transduction est de 6 h. Le lendemain de cette première transduction, les cellules ont été transduites à nouveau, avec les lentivirus contenant les séquences shPI4KIIIα, shPI4KIIIβ, ou shNT, à la MOI souhaitée, pendant 6h.

Trois ou cinq jours après cette 2nde transduction, les cellules Huh7.5.1 ou les hépatocytes humains primaires ont été infectés avec les particules VHCcc ou VHCpp, respectivement. Pour cela, une MOI de 0,005 TCID₅₀/mL (pour le VHCcc) ou 0,01 TCID₅₀/mL (pour VHCpp) a été utilisée dans un volume final de 50 µL dans une plaque 96 puits. L'infection se fait sur la nuit (~16h).

C. Analyse de l'infection

Vingt quatre heures après la fin de l'infection par le VHCpp ou le VHCcc, la cytotoxicité est déterminée (voir section VIII plus bas), puis les cellules sont lysées afin de mesurer le niveau de luminescence, à l'aide du kit « Renilla Assay Luciferase » (Promega), selon le protocole du fabricant, et grâce au luminomètre Centro XS3 LB960 (Berthold Technologies). Les valeurs de luminescence sont systématiquement normalisées avec celles obtenues pour la cytotoxicité, dans le cas des cellules Huh7.5.1.

VI. Inhibiteurs chimiques et détermination des IC₅₀ sur PI4KIII α

LY-294002 provient de Calbiochem (USA). AL-9 a été obtenu auprès du Dr De Francesco (Italie). T-00127-HEV1 provient de la société Early Discovery Chemistry (Royaume-Uni).

Les différents réactifs utilisés sont :

- PI4KIII α (MW = 230 kDa) (Millipore)
- Phosphatidylinositol PI-diC8 (Cell Signaling, USA)
- Phosphatidylsérine PS-diC8 (Coger)
- Tampon HTRF contenant entre autres de l'HEPES, du NaCl et du MgCl₂, des détergents, et de l'azide de sodium (Millipore).
- Kit « ADP-Glo™ Kinase Assay » (Promega)

Brièvement, le protocole expérimental est le suivant : PI4KIII α a préalablement été diluée dans le tampon HTRF, en présence de phosphatidylinositol (1 mM final) et de phosphatidylsérine (1 mM final). Ensuite, 3 μ L de cette solution réactionnelle ont été incubés pendant 10 minutes avec les inhibiteurs (AL-9, LY290042, et T-00127-HEV1) préalablement dilués dans le tampon HTRF. Puis, 1 μ L d'ATP à 100 μ M final a été ajouté, suivie d'une incubation de 30 minutes. Ensuite, 5 μ L d'ADP-Glo™ Reagent ont été ajoutés avant une incubation de 40 minutes. Enfin, 10 μ L de Kinase Detection Reagent ont été ajoutés, avant une dernière incubation de 40 minutes. La mesure de la luminescence est alors effectuée avec le luminomètre Centro XS3 LB960 (Berthold Technologies). Toute la réaction se fait à température ambiante. La valeur de l'IC₅₀ a été mesurée grâce au logiciel GraphPad.

VII. Traitement des hépatocytes humains primaires avec les inhibiteurs chimiques

Toutes les drogues (T-00127-HEV1, LY-294002 et AL-9) ont été reprises dans du DMSO 100%. Le traitement des cellules est intervenu six jours après l'ensemencement. Les cellules ont d'abord été pré-incubées pendant 3h à 37°C à la concentration souhaitée à 2% final de

DMSO. Puis, elles ont été infectées sur la nuit avec le VHCpp, à une MOI de 0,02 toujours en présence de la drogue, et d'une concentration finale de 1% DMSO. Vingt quatre heures après la fin de l'infection par le VHCpp, la cytotoxicité est déterminée (voir section suivante), puis les cellules sont lysées afin de mesurer le niveau de luminescence.

VIII. Évaluation de la cytotoxicité *in vitro*

La toxicité liée à une exposition des cellules aux inhibiteurs chimiques et/ou aux transductions lentivirales a été déterminée en plaque de 96 puits, 24h après la fin de l'infection par le VHC, en utilisant le kit « Cell Proliferation Reagent WST-1 » (Roche), selon les recommandations du fournisseur. Le principe de ce kit réside dans le fait que les sels de tétrazolium sont clivés en molécules de formazan par des déshydrogénases mitochondriales. La quantité de formazan formée est directement corrélée aux nombres de cellules métaboliquement actives dans la culture. La mesure de l'absorbance du formazan a été effectuée à l'aide du spectrophotomètre FLUOstar Optima (BMG Labtech, USA) à une longueur d'onde de 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 650 nm.

IX. Extraction d'ARN et PCR quantitative

L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide du kit « High pure RNA isolation » (Roche), selon les recommandations du fournisseur. La concentration et la pureté de l'ARN ont été évaluées au spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Labtech France). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée après migration sur gel d'agarose 1%, en présence de Bromure d'Ethidium (BÉt).

Pour réaliser la transcription inverse, 0,3 à 1,5 µg d'ARN ont été utilisés. Après un pré-chauffage de 5 min à 70°C, le mélange réactionnel a été ensuite complété avec le tampon « RT first strand » 1X (Invitrogen), 36 ng/mL de random hexamers (Promega), 0.5 mM de dNTP, 10 mM de dithiothréitol, 20 U de RNasin (Promega) et 200 U de M-MLV transcriptase inverse (Invitrogen). La synthèse d'ADNc se déroule pendant 1 h à 42°C. La réaction se termine par un chauffage du milieu réactionnel pendant 5 min à 95°C.

La quantification des transcrits de PI4KIII α et PI4KIII β a été effectuée en utilisant le kit « qPCR Master Mix Plus for SYBR Green I » (Eurogentec), dans un volume final de 25 µL

contenant 0,4 μM final du couple d'oligonucléotides spécifiques de la cible à amplifier (Tableau 6). Les échantillons ainsi préparés ont été soumis à une première étape d'activation de l'enzyme de 10 min à 95°C. Ensuite 40 cycles de PCR ont été réalisés. Ils consistent en une étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C et une étape d'hybridation et d'élongation pendant 1 min à 62°C. Les résultats de l'amplification sont analysés en temps réel à l'aide de l'ABI 7300 (Applied Biosystems). La quantité de l'ARNm de la cible a été normalisée par rapport à la quantité de l'ARNm de la GAPDH. Enfin, la quantité d'ARNm au sein de chaque échantillon a été exprimée de manière relative à l'échantillon témoin et est issue d'une moyenne de trois quantifications distinctes.

Tableau 6 : Séquences des oligonucléotides utilisés

Nom	Séquence des Oligonucléotides (5' vers 3')
GAPDH_F	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH_R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
PI4KIII α _F	GGTCGTCTCCCTGGTCACTC
PI4KIII α _R	GTCGTAGGTCCGGCTCCTG
PI4KIII β _F	TGGAGATCATGCAGCAAGGTTC
PI4KIII β _R	GGAAGCCGTCATAGAGTTTGG

X. Western-Blot

Les hépatocytes humains primaires ou les cellules Huh7.5.1 ont été lavés avec du PBS froid et lysés dans un tampon contenant : 62,5 mM de Tris-HCl pH 6.8 ; 2% SDS, 10% glycérol, 50 mM DTT, et 0.01% bleu de bromohéno, complété extemporanément avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les cellules ont ensuite été soniquées (Sonic and Materials, Danbury, USA) pendant 30 secondes, puis les débris insolubles ont été culotés par centrifugation à 11 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines ainsi extraites ont été dosées suivant le protocole de dosage par coloration à l'amidoblack (Sigma). Environ 30 μg d'extrait total ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide 7,5%. Après migration, les protéines ont été transférées en milieu liquide sur une membrane de

nitrocellulose (Schleicher und Schuell) sur la nuit à 400 mA pour les protéines de haut poids moléculaire ou à 100V pendant 2H pour les protéines de faible ou moyen poids moléculaire. Le tampon utilisé est un tampon phosphate à pH 6,7 composé de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et de Na_2HPO_4 .

L'analyse de l'expression de PI4KIII α 230 kDa (polyclonal anti-rabbit, Cell Signaling 4902), PI4KIII β 110 kDa (polyclonal anti-rabbit, Upstate 06-578), Tag- α HA (monoclonal anti-souris, Covance MM-101P), et de la tubuline- α 50 kDa (monoclonal anti-souris, Sigma T5168) a été réalisée par incubation avec les anticorps respectifs, après une mise au point des conditions optimales pour certains d'entre eux. Le signal a été détecté par chimioluminescence, en conjonction avec un anticorps secondaire anti-rabbit ou anti-mouse couplé à la peroxydase HRP (Dako). Cette détection a été effectuée avec :

- le Super Signal West Femto Chimioluminescent Substrate (Thermo Scientific) pour révéler la protéine PI4KIII α ;
- ou le « Enhanced Chemio Luminescence » (ECL, Millipore) pour révéler PI4KIII β , la tubuline α , ou le Tag-HA.

Les signaux ont été détectés et quantifiés en utilisant l'imageur FujiFilm LAS 3000 et le logiciel MultiGauge.

XI. Analyses statistiques

Les données ont été exprimées et représentées comme la moyenne de plusieurs expériences \pm écart à la moyenne (SEM, Standard Error of the Mean). Des tests t non appariés de Student ont été utilisés pour comparer la moyenne des groupes témoins et expérimentaux. La valeur p ainsi que la taille de l'échantillon de chaque groupe expérimental ont été précisées dans les légendes des figures respectives.

Résultats et Discussion

« Celui qui désire la pluie doit aussi accepter la boue. »

Proverbe malawite

« Personne-quel que soit son degré- ne voit jamais le sommet de son propre crâne ; pour y voir clair, vient toujours un moment où l'on a besoin de l'aide d'un tiers. »

Tradition orale peule, d'après Amadou Hampâté Bâ

Résultat 1 :

*Effet d'inhibiteurs des PI4KIIIs
sur l'entrée du VHC*

I. Impact de l'inhibition de l'activité des PI4KIII α sur l'entrée virale

Pour étudier l'implication potentielle des PI4KIII α au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires, nous avons utilisé une approche chimique. Pour cela, nous disposons de trois inhibiteurs des PI4KIII α :

- Un composé proche de l'enviroxime, T-00127-HEV1 ;
- Un dérivé de la quercétine, LY-294002 ;
- Un dérivé de la 4-anilino quinazoline, AL-9.

Avant de tester ces molécules sur les hépatocytes humains primaires, nous avons déterminé leur IC₅₀ *in vitro*, sur la protéine PI4KIII α (Voir section *Outils expérimentaux*). Les valeurs obtenues étaient de : 21 μ M \pm 5,6 pour LY294002; 2,3 μ M \pm 1,1 pour AL-9 et 100 μ M pour T-00127-HEV1 (Figure 34 A, B). Cette dernière molécule T-00127-HEV1 précipitait en milieu aqueux à des concentrations supérieures à 125 μ M, ce qui n'a pas permis de faire une courbe complète. A notre connaissance, la seule équipe ayant utilisé T-00127-HEV1 comme molécule inhibitrice des PI4KIII α a testé une concentration maximale de 10 μ M lors de la détermination des IC₅₀. Elle a alors conclu que cette molécule était spécifique de PI4KIII β , avec une IC₅₀ de 60 nM (Arita *et al.*, 2011). Concernant l'inhibiteur AL-9, l'IC₅₀ que nous avons obtenu était légèrement supérieure à celle déterminée par Bianco *et al.*, qui était de l'ordre de 0,57 μ M \pm 0,08 pour PI4KIII α . De plus, cette équipe a noté que cette molécule inhibait également PI4KIII β , à une IC₅₀ un peu plus forte : 3,08 \pm 0,21 μ M (Bianco *et al.*, 2012). Enfin, pour ce qui est de LY294002, l'IC₅₀ que nous avons déterminé était inférieure à celle trouvée par Balla *et al.*, qui variait entre 50 et 100 μ M pour PI4KIII α . En outre, elle serait d'environ 100 μ M pour PI4KIII β (Balla & Balla, 2006). Cette molécule a également une activité inhibitrice sur d'autres kinases comme les PI3Ks (IC₅₀ \sim 1,4 μ M) auxquelles les PI4KIII α sont structurellement apparentées, avec un fort degré de conservation dans leurs domaines catalytiques (Wymann *et al.*, 1996). Le Tableau 7 ci-dessous récapitule ces différentes IC₅₀.

Tableau 7 : Gamme des IC₅₀ issues de différentes études

	PI4KIII α	PI4KIII β	PI3Ks
LY294002	21-100 μ M	100 μ M	1,4 μ M
T-00127-HEV1	100 μ M	0,06 μ M	ND
AL-9	0,57-2,3 μ M	3,08 μ M	ND

ND : Non Déterminée

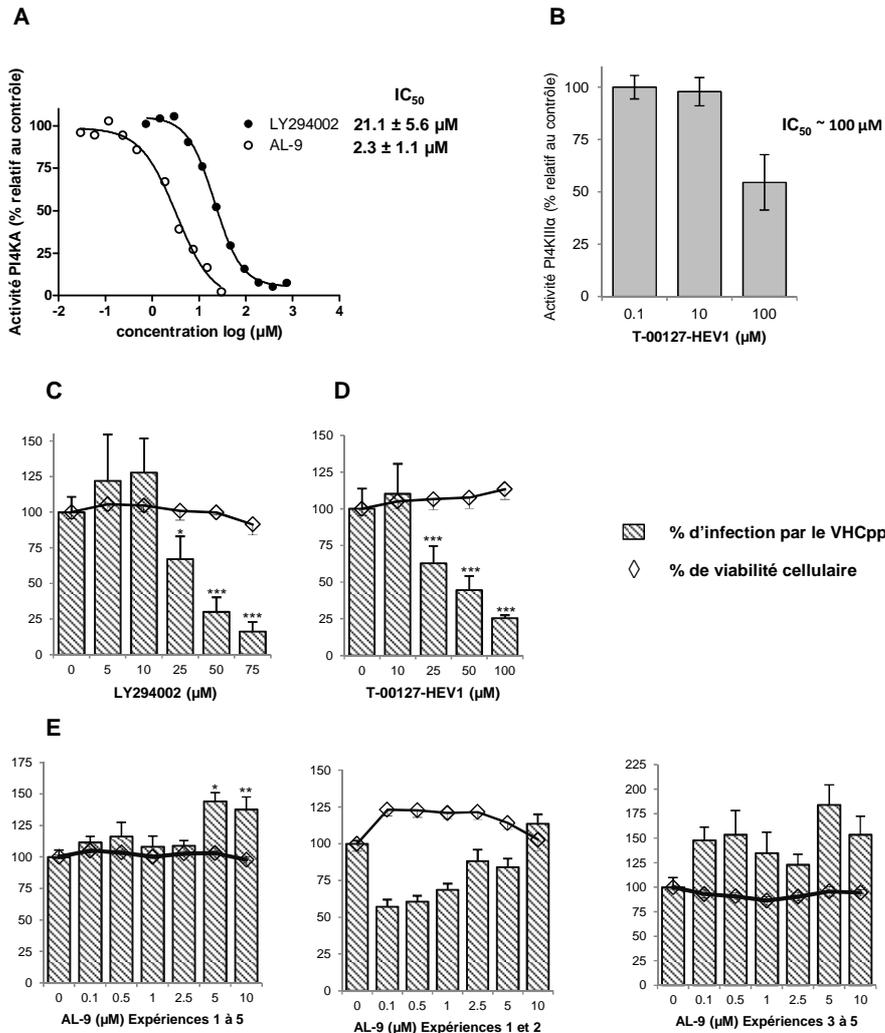


Figure 34: Détermination des IC₅₀ d'inhibiteurs des PI4KIII et analyse de leur effet sur la viabilité des hépatocytes humains primaires et leur susceptibilité à l'infection par le VHCpp.

Courbes d'inhibitions dose-réponse de LY294002, AL-9 (A) et histogramme dose-réponse de T-00127-HEV1 (B) sur PI4KIII α purifiée. L'enzyme a été pré-incubée pendant 10 minutes avec les concentrations indiquées de AL-9, LY294002, T-00127-HEV1 ou du DMSO, en présence de phosphatidylinositol, son substrat. La réaction a été initiée par l'addition de 100 μ M final d'ATP, comme décrit dans la section *Outils expérimentaux*. L'activité, mesurée comme la conversion de l'ATP en ADP, est exprimée en pourcentage du témoin DMSO. Les panels A et B sont représentatifs de quatre expériences indépendantes, et les IC₅₀ indiquées représentent la moyenne de ces quatre expériences.

Cinq jours après l'ensemencement, les cultures d'hépatocytes humains primaires ont été prétraitées pendant trois heures avec différentes concentrations de (C) LY294002, (D) T-00127-HEV1, et (E) AL-9 avant leur infection sur la nuit avec du VHCpp (à une Multiplicité d'Infection de 0,02), en présence de la drogue. Les données de viabilité et d'infection sont exprimées en pourcentage des valeurs obtenues dans les cellules infectées, mais sans traitement. Les résultats pour (C) et (D) sont présentés comme la moyenne de quatre expériences indépendantes \pm SEM, et le panel gauche de (E) comme la moyenne de cinq expériences indépendantes, réalisées sur différents lots de cellules \pm SEM. Le panel central de (E) représente la moyenne des deux premières expériences réalisées avec AL-9, et le panel de droite de (E) représente la moyenne des trois dernières expériences. * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001

Utilisée à différentes concentrations, LY294002 a eu un effet dose-dépendant sur la protection des hépatocytes humains primaires à l'infection par le VHCpp de génotype 1a. Cette protection a atteint 75%, sans effet toxique significatif (Figure 34C). De plus fortes concentrations (100, 150 et 200 μM) ont également été testées, donnant lieu à une inhibition plus importante de l'entrée, avec toutefois une légère toxicité à 200 μM (données non présentées). L'absence d'effet inhibiteur du LY294002 aux faibles concentrations (inférieures à 10 μM) tend à montrer que les PI3Ks ne sont pas impliquées au cours de l'entrée du VHCpp dans les hépatocytes humains primaires. En effet, LY294002 a une action inhibitrice sur les PI3Ks, à une IC_{50} de 1,4 μM . La molécule T-00127-HEV1 a également permis une protection dose-dépendante des cellules (Figure 34D). Les résultats obtenus avec ces deux molécules inhibitrices suggèrent que l'inhibition de l'activité kinase des PI4KIII s permet de protéger les hépatocytes humains primaires de l'infection par le VHCpp. Par conséquent, l'activité enzymatique de ces kinases serait importante pour l'entrée du VHCpp dans les hépatocytes humains primaires. Par contre, l'utilisation d'AL-9 n'a pas permis d'avoir des résultats concluants. En effet, les deux premières expériences, réalisées sur deux lots différents d'hépatocytes humains primaires ont abouti à une protection de l'infection par le VHCpp d'environ 50%, aux plus faibles doses d'AL-9 (0,1 ; 0,5 et 1 μM) (Figure 34E, histogramme du milieu). Par contre, cet effet a été perdu aux plus fortes doses, à partir de 2,5 μM . Sur les trois dernières expériences, réalisées sur 3 autres lots de cellules, AL-9 n'a eu aucun effet sur l'entrée du VHCpp dans les hépatocytes humains primaires (Figure 34E, histogramme de droite).

II. Discussion des résultats

Des inhibiteurs chimiques ont été testés afin d'évaluer l'importance de l'activité kinase des PI4KIII s au cours de l'entrée du VHCpp dans les hépatocytes humains primaires. La première molécule utilisée, LY294002 est un dérivé de la quercétine, initialement décrite pour ses capacités à inhiber les PI3Ks. En effet, la forte homologie entre les sites catalytiques des PI4KIII s et des PI3Ks explique leur sensibilité commune à certaines drogues, avec toutefois des degrés de sensibilité variable. LY294002 n'a pas affecté l'infection des hépatocytes humains primaires par le VHCpp, jusqu'à une dose de 10 μM . L'infection par le VHCpp ne semblait donc pas dépendante des PI3Ks puisque l' IC_{50} de cette drogue sur les PI3Ks a été

évaluée à 1,4 μM . A partir de doses plus fortes (25 à 75 μM), LY294002 a permis de protéger les hépatocytes humains primaires d'une infection par le VHCpp, et ce, de façon dose-dépendante. Cette sensibilité semblait coïncider avec l'inhibition de PI4KIII α pour laquelle nous avons déterminé une IC₅₀ de l'ordre de 20 μM , alors que l'IC₅₀ de LY294002 sur PI4KIII β avait été évaluée à 100 μM par d'autres équipes. Ces données étaient en cohérence avec celles obtenues à l'aide d'une seconde molécule nommée T-00127-HEV1. Cette drogue a été décrite dans des travaux publiés par Arita et ses collaborateurs (Arita *et al.*, 2011) comme étant une molécule spécifique de PI4KIII β , avec une IC₅₀ faible, définie à 0,06 μM . Cette équipe a également réalisé des tests biochimiques de son spectre d'action, avec une dose unique de 10 μM : ni la kinase PI4KIII α , ni les 6 différentes PI3Ks n'ont été inhibées. Il faut toutefois noter que les auteurs auraient utilisé une forme tronquée en N-terminale de PI4KIII α , modification pouvant altérer son activité (Heilmeyer *et al.*, 2003; Szentpetery *et al.*, 2011). Au cours de nos travaux, nous avons utilisé la grande isoforme complète de PI4KIII α afin de déterminer l'IC₅₀ de T-00127-HEV1, que nous avons évalué proche de 100 μM . Or, cette molécule n'a pas eu d'impact sur l'infection des hépatocytes humains primaires par le VHCpp jusqu'à la dose de 10 μM , donc bien au-delà de la dose normalement nécessaire pour inhiber PI4KIII β (IC₅₀ \sim 0,06 μM). Par contre, un effet inhibiteur dose-dépendant a été observé à partir d'une dose de 25 μM . La dose correspondant à son IC₅₀ sur PI4KIII α (100 μM) permettait de réduire l'infection de 75%.

L'utilisation de ces deux molécules sur le modèle d'infection des hépatocytes humains primaires par le VHCpp suggérait donc que l'activité de PI4KIII α serait indispensable à l'entrée virale. Néanmoins, une telle approche basée sur des inhibiteurs chimiques présente des limites. En premier lieu, les drogues ont rarement une spécificité stricte. Ainsi, avant d'imputer le phénotype induit par une drogue à l'inhibition de sa cible principale connue, il faut confirmer les résultats obtenus à l'aide de plusieurs drogues et d'approches expérimentales complémentaires. Par ailleurs, nos études ont été réalisées sur des hépatocytes humains primaires, or ces cellules sont spécialisées dans la prise en charge de xénobiotiques afin de les transformer et les éliminer. Nos conditions de cultures, qui sont définies pour maintenir un état de différenciation hépatique proche de l'*in vivo*, permettent de conserver ces propriétés de métabolisation des drogues. Par conséquent, même si les gammes d'inhibition de l'entrée du VHCpp obtenues avec les drogues LY294002 et T-00127-HEV1 correspondaient aux gammes d'inhibition de PI4KIII α , on ne peut émettre de conclusion définitive. En effet, on ne peut pas omettre le risque que ces drogues soient en partie

métabolisées par les hépatocytes humains, diminuant ainsi les doses effectives pour retomber dans des gammes d'inhibition non plus de PI4KIII α , mais de PI4KIII β , voire de PI3Ks.

D'ailleurs, il est probable que nous ayons été confrontés à une interférence des propriétés de métabolisation des hépatocytes humains lors de l'utilisation d'une troisième drogue, PIK93. Ce phenylthiazole a été décrit comme un outil capable de discriminer éventuellement entre PI4KIII α et PI4KIII β car l'isoforme β est 50 fois plus sensible à cette drogue, que l'isoforme α (IC₅₀ respectifs de 0,02 μ M et 1,1 μ M). Cependant, cette drogue est tout aussi efficace pour inhiber les PI3Ks (IC₅₀ à partir de 0,02 μ M). L'incubation des hépatocytes humains primaires en présence de PIK93 à des concentrations allant jusqu'à 50 μ M (soit 50 fois supérieures à son IC₅₀ sur PI4KIII α) n'a pas protégé les cellules d'une infection par le VHCpp (données non montrées). Pourtant, cette même drogue était capable de diminuer efficacement l'activité répliquative de réplicons présents dans des lignées hépatiques humaines, dès une dose de 1 μ M (données non montrées).

Pour tenter de compléter nos données, nous avons utilisé une quatrième drogue, AL-9, très récemment caractérisée pour sa capacité à inhiber les PI4KIII α (Bianco *et al.*, 2012). AL-9 est un prototype de la classe des 4-anilino quinazolines. Cette classe contient des inhibiteurs de la réplication du VHC, et une portion de 4-anilino quinazoline est souvent retrouvée dans les inhibiteurs de kinases, incluant des molécules anti-cancéreuses approuvées en clinique (ex : erlotinib qui inhibe EGF-R). Cette molécule présentait un avantage théorique limité, pour tenter de discriminer l'implication des 2 PI4KIII α au cours de l'entrée virale. En effet, PI4KIII α était seulement légèrement plus sensible à AL-9 que PI4KIII β (IC₅₀ respectifs de 0,6-2,3 μ M versus 3,08 μ M). Par ailleurs, des résultats contrastés ont été obtenus sur le modèle d'infection d'hépatocytes humains primaires par le VHCpp. Ainsi, sur deux lots de cellules, une inhibition de l'ordre de 50% fut détectée lors de l'utilisation de concentrations (0,1 à 1 μ M) proches de l'IC₅₀ d'AL-9 sur PI4KIII α . Cependant, cet effet inhibiteur disparaissait à des concentrations supérieures (2,5 à 10 μ M) sur ces deux lots de cellules, et aucune baisse d'efficacité de l'infection ne fut détectée sur les 3 autres lots distincts de cellules, et ce, quelque soit la dose (0,1 à 10 μ M). Deux hypothèses, qui ne sont pas exclusives, pourraient expliquer les phénomènes observés :

- (i) AL-9 serait inactivé en étant pris en charge par les enzymes du métabolisme hépatique, de façon plus ou moins efficace selon les lots de cellules. En effet, l'efficacité de métabolisation peut varier d'un individu à l'autre, d'autant plus que les

donneurs ont été exposés à des traitements distincts avant l'hépatectomie qu'ils ont dû subir. Ces thérapies influencent différemment les capacités de métabolisation des hépatocytes, la plupart du temps en les stimulant. Par ailleurs, AL-9 pourrait activer cette métabolisation à partir d'une certaine concentration expliquant ainsi la perte d'effet inhibiteur aux doses élevées, supérieures à 1 μ M.

- (ii) Les PI4KIII α s présenteraient un polymorphisme génétique capable de moduler leur sensibilité à AL-9. D'ailleurs, certaines études ont fait état de l'existence de ce polymorphisme dans le gène *PI4KIII α* . En effet, le criblage de deux domaines fonctionnels de PIK4III α et de la région du promoteur a abouti à l'identification de 15 polymorphismes différents dont trois ont été retrouvés chez des patients atteints de désordres bipolaires, et 3 autres atteints de schizophrénie (Saito *et al.*, 2003).

Au final, seul l'effet inhibiteur de 2 drogues, LY294002 et T-00127-HEV1 était en accord avec l'implication de l'activité de PI4KIII α au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires. Cependant, les limites de cette approche, exposées plus haut, ne permettent pas d'émettre une conclusion définitive.

Résultat 2 :

*Mise au point de la stratégie
d'extinction des PI4KIIIIs*

Certaines données obtenues avec l'approche chimique ont permis de suggérer que l'activité kinase des PI4KIII α serait requise pour l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires. Afin de confirmer ces données, nous avons décidé d'utiliser une approche génétique basée sur l'ARN interférence. Cependant, ces cellules sont réfractaires aux méthodes classiques de transfection telles que la lipofection. Il était donc nécessaire d'utiliser la vectorologie lentivirale afin d'introduire les shRNA dans la cellule cible.

Au début de ma thèse, nous disposions de plasmides adaptés à la production de lentivirus (OpenBiosystems, série pLKO.1-shRNA) contenant différentes séquences shRNA pour chaque cible. En particulier, nous avons 15 shRNA ciblant PI4KIII α et 5 shRNA ciblant PI4KIII β . Ces shRNA ciblent soit le cadre ouvert de lecture, soit la région 3'NC. Aucune des séquences ciblées ne se chevauchent. Nous disposions également d'un plasmide contenant un shRNA contrôle, qui ne cible aucune région du génome humain : il s'agit du shNT (Non Targeting). Toutes ces séquences sont présentées dans la section *Outils expérimentaux* (Tableaux 4 et 5).

Nous avons réalisé un criblage afin de sélectionner les shRNA les plus efficaces pour l'extinction de l'ARNm ciblé. Cette sélection s'est effectuée en 2 étapes principales. Ne disposant pas systématiquement d'hépatocytes humains primaires, la 1^{ère} étape de sélection a été réalisée par transfection transitoire des cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1. Pour cela, les différents plasmides-shRNA ont été introduits par lipofection dans les cellules. Trois jours après la transfection, les ARN totaux ont été extraits puis analysés par RT-QPCR.

Trois critères ont été pris en compte pour choisir les séquences shRNA : (i) efficacité d'extinction de l'ARNm ciblé, (ii) spécificité de l'extinction en vérifiant l'absence d'impact sur le niveau d'expression d'ARNm de l'isoforme étudiée en parallèle et (iii) choix d'au moins une séquence ciblant une région non codante de l'ARNm ciblé afin de permettre des expériences ultérieures plus aisées de restauration du phénotype. Sur les 15 shRNA ciblant PI4KIII α , seuls 4 shRNA (shA2, shA3, shA9 et shA12) ont montré une efficacité d'inhibition d'environ 40% de l'ARNm. Les autres se sont avérés inefficaces. Sur les 5 shRNA ciblant PI4KIII β , 3 shRNA (shB1, shB4 et shB5) ont permis d'inhiber l'ARNm de l'ordre de 50%.

Au cours de la 2^{nde} étape de sélection, des lentivirus comportant les séquences shPI4KIII α et shPI4KIII β pré-sélectionnées, ou comportant la séquence shNT ont été produits, puis testés sur les cellules Huh7.5.1. Les shA2 et shA3 ont finalement été retirés de la liste car une 2^{nde} expérience de transfection n'a pas permis d'observer une inhibition efficace de l'ARNm de

PI4KIII α avec ces deux shRNA. Nous avons donc produit des lentivirus non concentrés comportant les shRNA suivants : shA9, shA12, shB1, shB4, shB5 ou shNT. Une fois les lentivirus produits (protocole présenté dans la section *Outils expérimentaux*), ils ont été utilisés (purs et non titrés) pour transduire les cellules Huh7.5.1, afin d'évaluer l'efficacité d'extinction de l'ARNm.

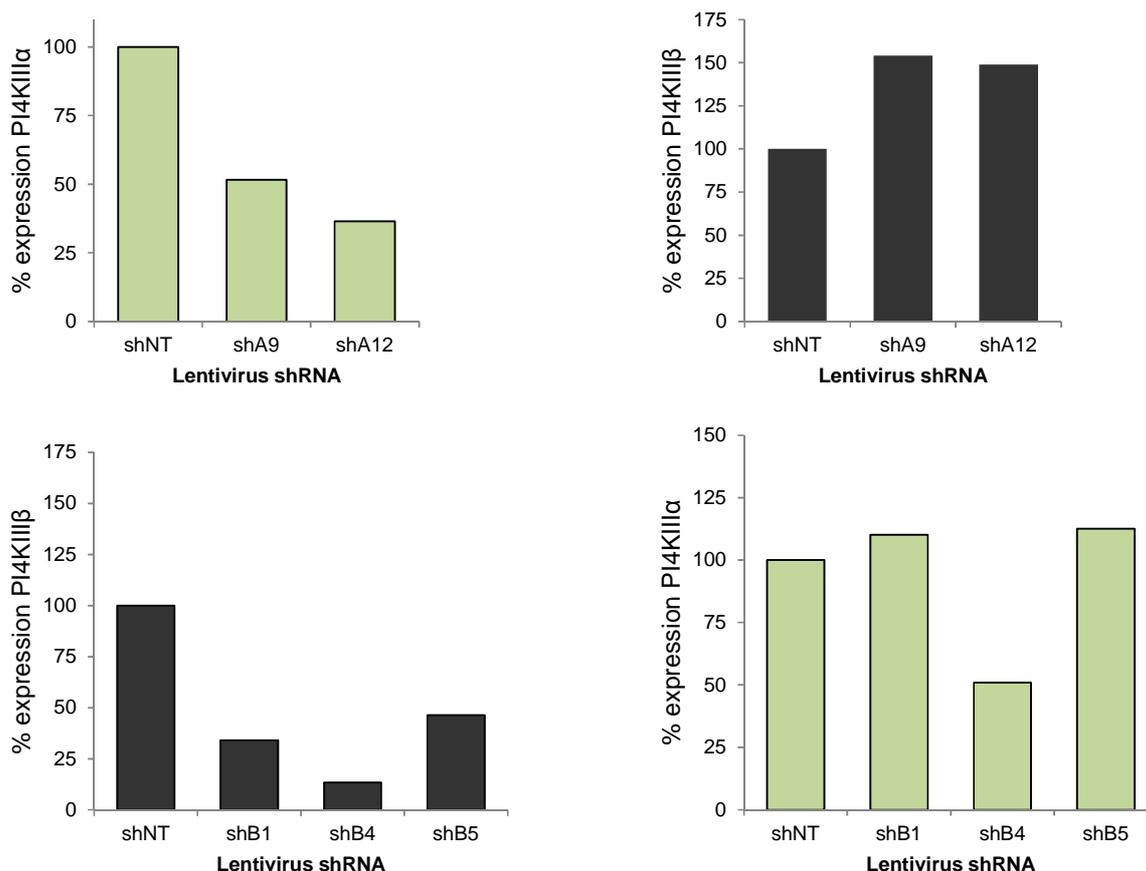


Figure 35: Efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIII α et PI4KIII β dans les Huh7.5.1 par transduction lentivirale.

Les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1, ensemencées la veille à 50 000 cellules/cm² ont été transduites avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT) ou différents shRNA indépendants ciblant PI4KIII α (histogrammes du haut) ou PI4KIII β (histogrammes du bas). Trois jours après la transduction, les ARN totaux ont été extraits. Les niveaux d'ARNm de PI4KIII α et PI4KIII β ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au shNT.

Nous avons constaté une diminution de l'expression de l'ARNm de PI4KIII α d'environ 75% avec shA12, et d'environ 50% avec shA9 sans impact inhibiteur sur PI4KIII β . Au contraire, l'inhibition de l'ARNm de PI4KIII α a entraîné une augmentation d'environ 50% de l'ARNm de PI4KIII β (Figure 35, histogrammes du haut). Concernant PI4KIII β , shB1, shB4 et shB5 ont permis une inhibition de l'ARNm, d'au moins 50%. Par contre, le shB4 n'était pas

spécifique de PI4KIII β car il inhibait aussi l'ARNm de PI4KIII α , de l'ordre de 50% (Figure 35, histogrammes du bas). Il a donc été ôté de la liste. Ces inhibitions des ARNm cibles ont été obtenues sans aucun effet toxique sur les cellules.

En définitive, les shRNA retenus pour la suite de notre travail étaient :

- Pour PI4KIII α , shA9 qui cible le cadre ouvert de lecture et shA12 qui cible la région 3'NC. Ils seront désormais appelés shPI4KIII α #1 et shPI4KIII α #2, respectivement.
- Pour PI4KIII β , shB1 qui cible la région 3'NC et shB5 qui cible le cadre ouvert de lecture. Ils seront désormais appelés shPI4KIII β #1 et shPI4KIII β #2, respectivement.

Résultat 3 :
Implication de PI4KIII α dans
l'entrée du VHC

Avant la présentation des différents résultats, il est important de souligner que nous avons évalué l'efficacité de transduction des hépatocytes humains primaires en utilisant des lentivirus comportant le gène codant pour la GFP (pLKO.3G). Cinq jours après la transduction, à une MOI de 62,5 (la plus faible utilisée lors de nos expériences), nous avons observé par FACS que 84% des cellules étaient transduites (données non montrées). La transduction lentivirale est donc efficace dans les hépatocytes humains primaires.

I. Effet de l'extinction de PI4KIII α sur l'entrée virale

Les lentivirus comportant les séquences shRNA sélectionnées (shPI4KIII α #1 et shPI4KIII α #2) ont été produits, concentrés et titrés selon le protocole se trouvant dans la section *Outils expérimentaux*. Les expériences présentées dans la Figure 36 ci-dessous ont été réalisées sur trois lots différents d'hépatocytes humains primaires.

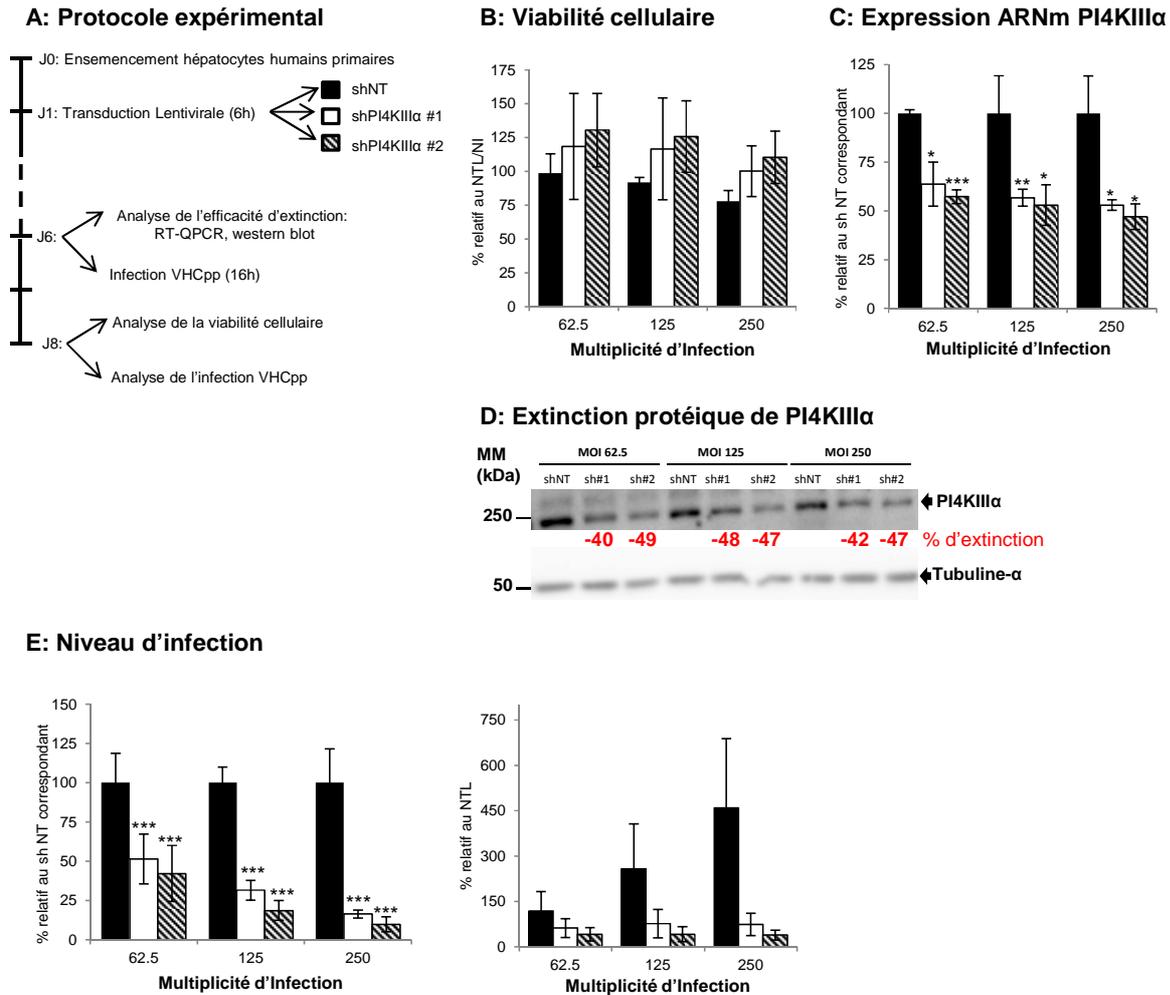


Figure 36: Effet de l'inhibition de PI4KIIIα sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires.

- Protocole expérimental. Cinq jours avant leur infection par le VHCpp, les cellules ont été transduites à différentes Multiplicités d'Infection avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou deux shRNA indépendants ciblant PI4KIIIα (shPI4KIIIα #1 et shPI4KIIIα #2, barres blanches et hachurées, respectivement).
 - Impact de la transduction lentivirale sur la viabilité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCpp.
 - Efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIIIα. Les niveaux d'ARNm de PI4KIIIα ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au shNT correspondant.
 - Efficacité d'extinction de la protéine PI4KIIIα. Les lysats cellulaires ont été analysés en utilisant un anticorps anti-PI4KIIIα ou un anticorps anti-tubuline α. Les positions de PI4KIIIα, de la tubuline α, et des masses moléculaires en kDa sont indiquées sur chaque côté de la membrane.
 - Impact de l'extinction partielle de PI4KIIIα sur l'infection par le VHCpp (Multiplicité d'Infection de 0,2). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).
- B, C et E sont présentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes, réalisées sur différents lots de cellules ± SEM. * p < 0,05 ** p < 0,001, *** p < 0,0001.

Le protocole expérimental est schématisé sur la Figure 36A. Le lendemain de l'ensemencement, les cellules ont été transduites avec les vecteurs lentiviraux-shRNA, à différentes MOI. Cinq jours après la transduction, l'expression de PI4KIIIα a été analysée par RT-QPCR et WB. En parallèle, une infection a été réalisée pendant 16 h avec du VHCpp de génotype 1a (isolat H77). Environ 48 heures après cette infection, la viabilité cellulaire ainsi que les niveaux d'infection ont été mesurés.

Comme présenté sur la Figure 36B, les différentes transductions n'ont eu aucun effet sur la viabilité des hépatocytes humains primaires, par rapport aux cellules contrôles, non transduites et non infectées.

Nous avons aussi vérifié l'efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIII α . De façon étonnante, cette inhibition d'environ 50% est restée stable, quelque que soit la MOI utilisée et ce, pour les 2 shRNA (Figure 36C). Il en est de même pour l'extinction de la protéine, qui était également stable et de l'ordre de 50% (Figure 36D). Malgré l'absence d'une inhibition dose-dépendante des quantités d'ARNm et de protéine, une protection dose-dépendante de l'infection par le VHCpp a été observée. Par rapport au contrôle shNT de la même MOI, elle est de l'ordre de 50% à la MOI de 62,5 et atteint 80% pour la MOI 250, la plus élevée (Figure 36E, histogramme de gauche). Cependant, en exprimant les pourcentages d'infection par rapport aux cellules non transduites, nous avons observé que l'effet dose-dépendant constaté pouvait être biaisé par le fait que les cellules transduites avec les lentivirus-shNT étaient plus susceptibles à l'infection par le VHCpp, au fur et à mesure que les MOI augmentaient (Figure 36E, histogramme de droite). L'inhibition semble donc stable au final et est cohérente avec les taux stables d'inhibition de la protéine, quelque soit la MOI utilisée. Ces résultats montrent l'implication de PI4KIII α au cours de l'entrée du VHCpp de génotype 1a dans les hépatocytes humains primaires. En effet, le fait qu'une protection similaire de l'infection ait été obtenue avec 2 shRNA distincts suggère que l'effet observé est spécifique, car il est peu probable que 2 shRNA distincts présentent le même effet adverse, s'ils en ont.

En parallèle des hépatocytes humains primaires, nous avons voulu valider l'efficacité de nos shRNA dans les cellules Huh7.5.1. La Figure 37 ci-dessous est représentative de quatre expériences différentes. Le protocole expérimental est très similaire à celui utilisé pour les hépatocytes humains primaires, à l'exception du temps entre la fin de la transduction et le test d'infection par le VHCpp, qui a été réduit à 3 jours (Figure 37A). La densité cellulaire (prenant en compte la prolifération et la toxicité) des différentes conditions expérimentales a été comparée à celle mesurée dans les puits de culture cellulaire qui ont été ni transduits, ni infectés. Un effet dose-dépendant a été observé, en particulier avec le shPI4KIII α #1 (Figure 37B).

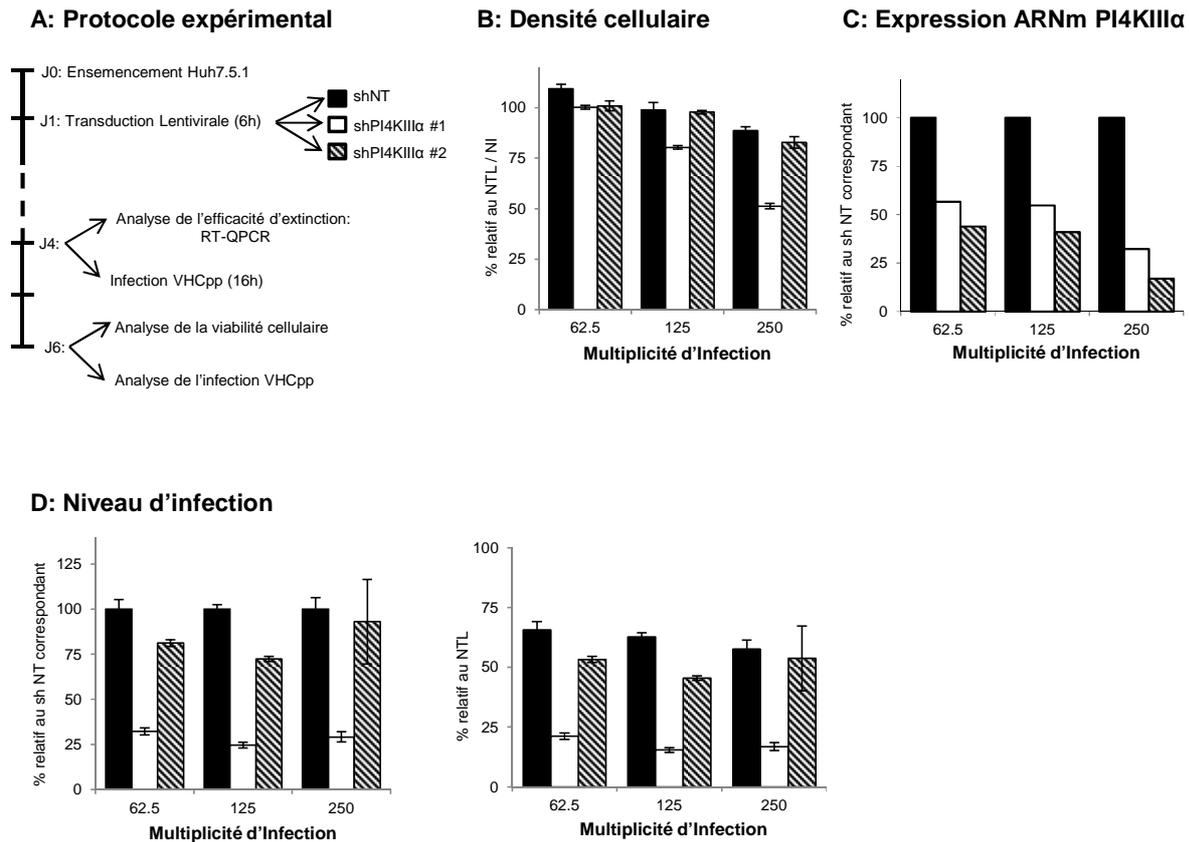


Figure 37: Effet de l'inhibition de PI4KIIIα sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1.

- Protocole expérimental. Trois jours avant leur infection par le VHCpp, les cellules ont été transduites à différentes Multiplicités d'Infection avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou deux shRNA indépendants ciblant PI4KIIIα (shPI4KIIIα #1 et shPI4KIIIα #2, barres blanches et hachurées, respectivement).
 - Impact de la transduction lentivirale sur la densité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCpp.
 - Efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIIIα. Les niveaux d'ARNm de PI4KIIIα ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au shNT correspondant.
 - Impact de l'extinction partielle de PI4KIIIα sur l'infection par le VHCpp (Multiplicité d'Infection de 0,02). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).
- B, C et D sont représentatifs de quatre expériences indépendantes. Les écarts-types présentés sur B et D ont été obtenus sur des triplicats pour chaque condition, dans la même expérience. Le panel C quant à lui montre des résultats acquis sur un seul puits lysé pour l'extraction d'ARN total.

Quant à l'extinction de l'ARNm de PI4KIIIα, un effet dose-dépendant a été détecté, avec des inhibitions supérieures à 50% (Figure 37C). Dans cette expérience de validation, l'extinction protéique n'a pas été vérifiée. Avec le shPI4KIIIα #1, dès la plus faible MOI utilisée (62,5) et pour laquelle la densité cellulaire n'a pas été modifiée, les cellules Huh7.5.1 ont été efficacement protégées d'une infection par le VHCpp, d'environ 75% (Figure 37D, histogramme de gauche et de droite). Nous avons remarqué qu'une diminution de l'ARNm de PI4KIIIα légèrement plus importante à une MOI de 250 pour ce shPI4KIIIα #1 ne se traduit pas par une meilleure protection des cellules à une infection par le VHCpp. Il est possible que cette différence soit trop faible pour augmenter la protection, ou qu'un seuil de protection ait

été atteint. Ainsi, un pourcentage réduit de virus pourrait entrer dans les cellules Huh7.5.1, indépendamment de PI4KIII α . De façon surprenante, malgré une inhibition efficace de l'ARNm avec le shPI4KIII α #2, aucun effet significatif sur l'entrée virale n'a été observé avec ce 2nd shRNA (Figure 37D). Cette expérience de validation a été réalisée avec les mêmes lots de lentivirus que ceux utilisés sur les hépatocytes humains primaires, mais il n'y a pas eu d'augmentation de l'infection par le VHCpp due à la transduction avec les lentivirus-shNT dans les Huh7.5.1, et ce malgré l'utilisation de MOI identiques (37D, histogramme de droite).

II. Validation de l'implication de PI4KIII α dans l'entrée virale.

La protection de l'infection, induite par 2 inhibiteurs chimiques et par 2 shRNA différents ciblant PI4KIII α suggérait que cette kinase était impliquée dans l'entrée du VHCpp de génotype 1a dans les hépatocytes humains primaires. Toutefois, au vue des données partiellement contradictoires obtenues sur les cellules Huh7.5.1, nous avons choisi de réaliser des tests de restauration de l'entrée virale en surexprimant dans les hépatocytes humains primaires une PI4KIII α active ou inactive, échappant au shPI4KIII α #2 qui cible la partie 3'NC du gène. Cette approche devait nous permettre d'exclure de possibles effets adverses dans l'approche génétique et également statuer sur l'importance de l'activité kinase de PI4KIII α au cours de l'entrée virale. Pour cela, nous avons généré des lentivirus contenant la séquence complète de PI4KIII α sous sa forme sauvage, ou sous sa forme inactive (Kinase Dead) (mutation D1957A), à partir de constructions plasmidiques obtenues auprès du Dr Volker Lohmann et validées au cours de ses travaux (Reiss *et al.*, 2011) :

- Un vecteur transfert plasmidique vide, qui sert de contrôle (pWPi-vide) ;
- Un vecteur codant PI4KIII α sous sa forme sauvage (NM_058004.2) (pWPi-CA WT) et incluant en N-terminal une séquence nucléotidique issue de l'hémagglutinine du virus de la grippe (tag-HA). Ce vecteur exprime la grande isoforme de 230 kDa. Le gène cloné est uniquement constitué de la partie codante et contrairement à l'ARN endogène, il échappe au shPI4KIII α #2 ciblant la région 3'NC ;

- Un vecteur codant PI4KIII α mutée (pWPI-CA KD). Cette forme mutée diffère de la forme sauvage uniquement par la substitution D1957A qui est une mutation ponctuelle inactivatrice de l'activité kinase.

Comme tous les lentivirus produits au cours de ma thèse, les lentivirus contenant le vecteur vide ou le vecteur comprenant le gène *PI4KIII α WT* ou *PI4KIII α KD* ont été concentrés puis titrés (Voir section *Outils expérimentaux*).

Les résultats de la Figure 38 ci-dessous sont ceux d'une seule expérience. Le protocole expérimental utilisé est schématisé sur la Figure 38A. Brièvement, le lendemain de l'ensemencement, les hépatocytes humains primaires ont été transduits avec les lentivirus contenant le vecteur vide ou le vecteur permettant l'expression du gène *PI4KIII α WT* ou *KD* (notés pWPI-vide, pWPI-CA WT et pWPI-CA KD, respectivement), à une MOI de 1000. Le lendemain de cette transduction dite « de surexpression », les cellules ont été transduites avec des lentivirus comportant soit le shNT, soit le shPI4KIII α #2, à une MOI de 500. Cinq jours après cette 2nde transduction, l'expression de PI4KIII α a été analysée par RT-QPCR et WB ; en parallèle, une infection a été réalisée pendant 16 h avec du VHCpp de génotype 1a (isolat H77). Environ 48 heures après cette infection, une analyse de la viabilité cellulaire a été effectuée, et les niveaux d'infections ont été évalués pour ces différentes conditions expérimentales.

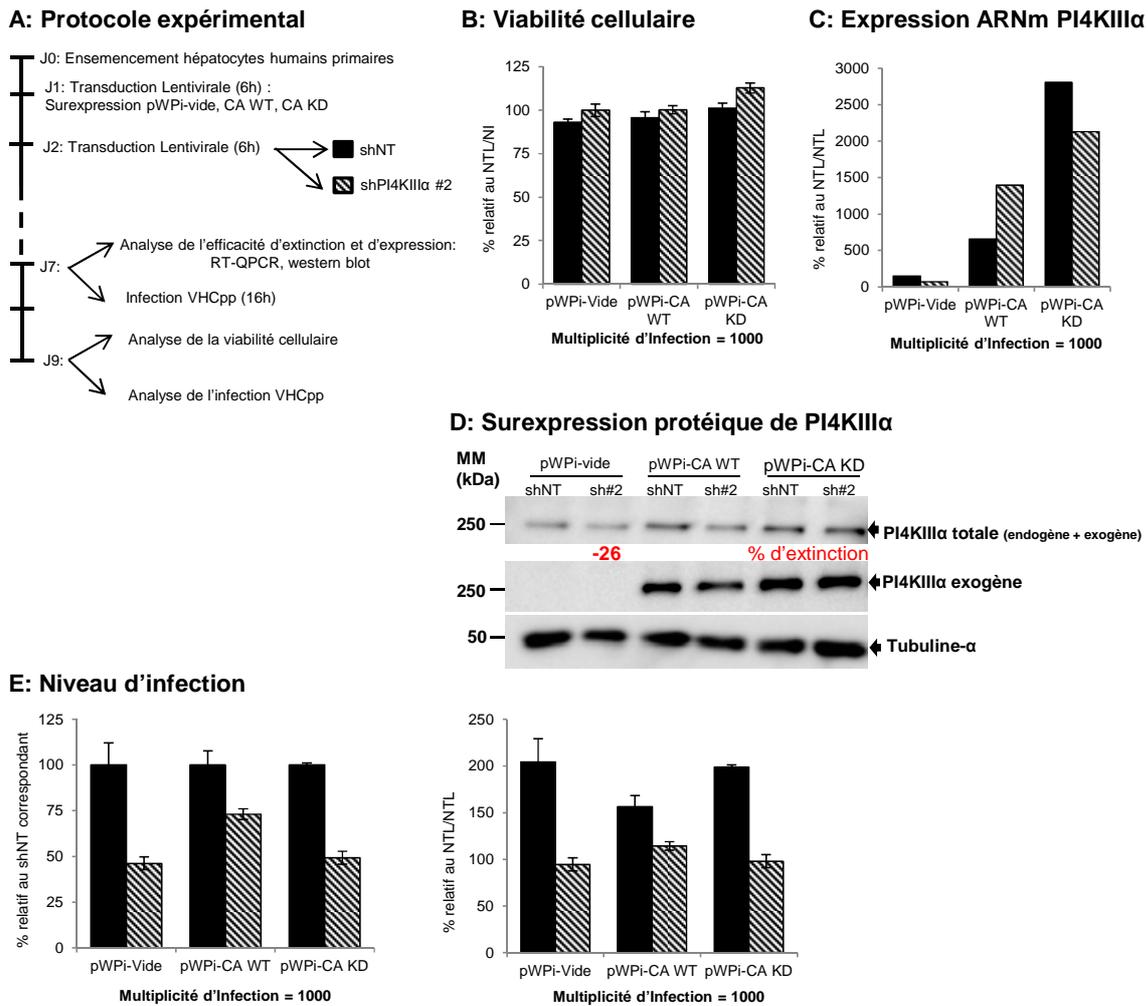


Figure 38: Test de restauration de l'infection par le VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires partiellement dépourvus de PI4KIIIα endogène.

- Protocole expérimental. Six jours avant leur infection par le VHCpp, les cellules ont été transduites avec des vecteurs lentiviraux vides ou contenant PI4KIIIα soit sous sa forme sauvage (WT), soit sous sa forme mutée pour son activité kinase (KD), à une Multiplicité d'Infection de 1000. Le lendemain, elles ont été transduites à une multiplicité d'Infection de 500 avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou un shRNA ciblant uniquement PI4KIIIα endogène, dans sa région 3'NC (shPI4KIIIα #2, barres hachurées).
- Impact des transductions lentivirales sur la viabilité cellulaire exprimée par rapport au NTL/NI, correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCpp.
- Efficacité de surexpression de l'ARNm de PI4KIIIα. Les niveaux d'ARNm totaux de PI4KIIIα (endogène et exogène) ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au NTL/NTL, c'est-à-dire aux cellules non transduites.
- Efficacité de la surexpression protéique de PI4KIIIα. Les lysats cellulaires ont été analysés en utilisant un anticorps anti-PI4KIIIα pour évaluer la protéine totale (endogène et exogène), un anticorps anti-Tag αHA pour évaluer la protéine exogène ou un anticorps anti-tubuline α. Les positions de PI4KIIIα, de la tubuline α, et des masses moléculaires en kDa sont indiquées sur chaque côté de la membrane.
- Impact de la surexpression de PI4KIIIα sur l'infection par le VHCpp (Multiplicité d'Infection de 0,01). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL/NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).

Comme présenté sur la Figure 38B, les doubles transductions n'ont eu aucun effet sur la viabilité des hépatocytes humains primaires, par rapport aux cellules non transduites et non infectées.

L'efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIIIα endogène a été vérifiée. Elle était d'environ 50% dans les cellules transduites avec les vecteurs lentiviraux vides (pWPI-vide) et le

lentivirus-shPI4KIII α #2. Cette extinction est donc similaire à celle obtenue lors de nos expériences précédentes de simple inhibition (Figure 36C). L'efficacité de surexpression de l'ARNm de PI4KIII α exogène a été également mesurée. Malgré la forte MOI utilisée (1000), la surexpression reste modérée, de l'ordre de 5 à 15 fois pour PI4KIII α WT, par rapport au contrôle (pWPI-*vide*) et de l'ordre de 20 à 30 fois pour PI4KIII α KD (Figure 38C).

Par ailleurs, dans ce lot d'hépatocytes humains primaires, l'inhibition de la protéine PI4KIII α endogène était de l'ordre de 26% dans les cellules transduites avec les lentivirus vides (pWPI-*vide*) et le lentivirus-shPI4KIII α #2, par rapport aux cellules contrôles correspondantes, transduites avec le lentivirus- shNT (Figure 38D). Cette inhibition est donc plus faible que celle observée lors des expériences précédentes de simple inhibition (Figure 36D, ~50% d'inhibition). Nous avons également vérifié la surexpression protéique de la forme exogène, grâce au tag-HA fusionné au gène (Figure 38D, PI4KIII α exogène). En parallèle, le niveau d'expression de PI4KIII α totale a été analysé, c'est-à-dire la forme endogène plus la forme exogène (Figure 38D, PI4KIII α totale). Curieusement, nous n'avons pas observé d'augmentation de la quantité protéique totale de PI4KIII α dans les cellules transduites avec pWPI-CA WT ou KD, par rapport aux cellules transduites avec les vecteurs vides, et ce malgré une expression réelle de la forme exogène (Figure 38D, PI4KIII α exogène). Ainsi, malgré la forte MOI utilisée, nous n'avons pas constaté une surexpression protéique de PI4KIII α , sauvage ou mutée. Dans les cellules transduites avec les vecteurs vides, le niveau d'infection par le VHCpp était d'environ 46% en présence du shPI4KIII α #2 comparé aux cellules transduites avec le lentivirus-shNT, soit 54% d'inhibition de l'entrée virale (Figure 38E). Elle était donc comparable à la protection observée lorsque les cellules avaient été uniquement transduites avec des lentivirus comportant shPI4KIII α #1 ou shPI4KIII α #2, à différentes MOI (Figure 36E). En analysant ensuite les niveaux d'infection par rapport à chaque shNT correspondant, l'infection semblait être partiellement restaurée, dans les cellules transduites avec le vecteur devant permettre la surexpression de PI4KIII α WT. En effet, le niveau d'infection est passé de 46% dans les cellules contenant le vecteur vide, à 73% dans celles comportant pWPI-CA WT (Figure 38E, histogramme de gauche). Cette restauration partielle pouvait s'expliquer par le faible niveau de surexpression de PI4KIII α exogène. En outre, aucune augmentation de l'infection n'a été observée dans les cellules comportant pWPI-CA KD, faisant ainsi penser que l'activité kinase de PI4KIII α serait bien nécessaire à l'entrée du VHCpp dans les hépatocytes humains primaires (Figure 38E, histogramme de gauche).

Avant d'utiliser la MOI de 1000 pour la surexpression, des MOI plus faibles de 250 et 500 ont été testés lors de deux expériences différentes, mais sans effet sur la restauration de l'infection (données non montrées). A ce stade, il est donc difficile de conclure, pour deux raisons principales : d'une part, l'expérience n'a été réalisée qu'une fois, et d'autre part la restauration partielle observée pourrait être surestimée. En effet, nous avons noté une diminution de la susceptibilité à l'infection par le VHCpp dans les cellules transduites avec pWPI-CA WT et le lentivirus-shNT, par rapport au contrôle NTL/NTL, correspondant aux cellules non transduites (Figure 38E, histogramme de droite).

III. Tentatives d'améliorer la surexpression de PI4KIII α

Face aux difficultés pour surexprimer PI4KIII α exogène dans les hépatocytes humains primaires (Figure 38D), nous avons réalisé d'autres constructions plasmidiques dans lesquelles le promoteur EF-1 α contrôlant l'expression de PI4KIII α dans les vecteurs pWPI a été remplacé par un autre promoteur fort, celui du CMV. Nous avons nommé ces nouveaux vecteurs pWPC. Après production des lentivirus comportant ces nouvelles constructions, nous avons observé une baisse drastique du titre viral, passant de 10^{10} UI/mL pour les vecteurs pWPI-CA WT et PWPI-CA KD, à 10^8 UI/mL pour les vecteurs pWPC-CA WT et PWPC-CA KD, soit une baisse de 100 fois. Du fait de ce titre relativement faible, la MOI maximale qui pouvait être utilisée était d'environ 75.

Lors des tests effectués sur les hépatocytes humains primaires, aucune surexpression protéique de PI4KIII α n'a été observée avec les vecteurs lentiviraux pWPC-CA WT et pWPC-CA KD, à la MOI de 75. De plus, l'augmentation de la quantité de transcripts ARNm n'était que de 2 fois, par rapport aux cellules contrôles contenant les vecteurs vides (données non montrées). Des productions de ces mêmes vecteurs ont été réalisées une seconde fois, et les mêmes titres ont été obtenus. Nous avons donc été contraint d'arrêter l'exploitation de ces vecteurs pWPC car des MOI supérieures à 75 ne pourraient pas être utilisées.

Suite à cet obstacle, nous avons changé de stratégie, en utilisant un autre vecteur plasmidique. Le nouveau vecteur alors appelé pLL3.8 contient également le promoteur CMV et est dérivé d'un plasmide déjà utilisé au sein de notre équipe, pour produire de manière efficace des lentivirus (notamment les pseudoparticules VHCpp). Les titres de cette nouvelle série étaient

de l'ordre de 10^9 UI/mL pour pLL3.8-CA WT et pLL3.8-CA KD, soit une baisse de 10 fois par rapport aux titres obtenus pour les vecteurs initiaux pWPI. Ainsi, la MOI maximale exploitable était de l'ordre de 750 pour ces nouveaux vecteurs. Là aussi, nous avons comparé leurs niveaux de surexpression par rapport aux vecteurs pWPI, mais cette fois dans les cellules Huh7.5.1. Une fois de plus, les niveaux d'expression étaient inférieurs à ceux obtenus avec les vecteurs initiaux pWPI (Figure 39). Par contre, c'était la première fois que nous observions une surexpression avec les vecteurs pWPI-CA WT et KD, dans les cellules Huh7.5.1. Contrairement à ce qui a été observé dans les hépatocytes humains primaires, il y a donc une réelle surexpression de PI4KIII α WT et KD dans les Huh7.5.1 (comparer pWPI-vide, par rapport à pWPI-CA WT et CA KD pour PI4KIII α totale).

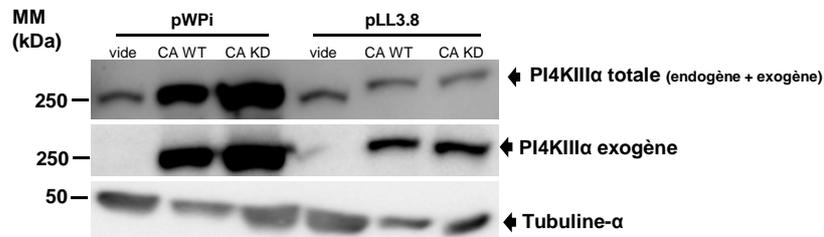


Figure 39: Efficacité de la surexpression protéique de PI4KIII α par différentes constructions lentivirales.

Le lendemain de l'ensemencement, les cellules Huh7.5.1 ont été transduites avec les différents vecteurs lentiviraux, à une MOI de 750 chacun. Les lysats cellulaires obtenus 3 jours après la transduction ont été analysés, en utilisant un anticorps anti-PI4KIII α pour évaluer la protéine totale (endogène et exogène), un anticorps anti-Tag α HA pour évaluer la protéine exogène ou un anticorps anti-tubuline α . Les positions de PI4KIII α , de la tubuline α et des masses moléculaires en kDa sont indiquées sur chaque côté de la membrane.

Au final, les vecteurs initiaux pWPI étaient ceux qui permettaient la « meilleure » surexpression de nos gènes. Nous avons donc repris ces vecteurs pour la suite de nos expériences, en changeant de stratégie pour tenter d'améliorer le niveau d'expression de PI4KIII α exogène.

IV. Validation de l'implication de PI4KIII α dans le cycle complet du VHC

Face à la difficulté technique de surexprimer PI4KIII α WT et KD dans les hépatocytes humains primaires, nous avons néanmoins voulu valider les différents outils de surexpression, au moins dans le modèle de lignées. Mais nous nous sommes heurtés au fait que le shPI4KIII α #2 s'était avéré inefficace pour protéger les cellules Huh7.5.1 de l'infection par le VHCpp (Figure 37D). Nous ne pouvions donc pas utiliser ce modèle VHCpp pour des expériences de restauration de l'infection. Nous avons alors choisi d'exploiter le modèle d'infection des cellules Huh7.5.1 par le VHCcc de génotype 2a (construction J6/JFH1) qui reproduit *in vitro* le cycle viral complet. Ce modèle avait été déjà utilisé par Reiss *et al.* pour démontrer par des expériences de restauration du phénotype que l'activité kinase de PI4KIII α était importante pour la réplication du VHC (Reiss *et al.*, 2011).

Avant d'effectuer les tests de restauration de l'infection dans le modèle VHCcc, nous avons au préalable vérifié dans quatre expériences différentes, qu'une inhibition d'environ 60% de l'ARNm de PI4KIII α à l'aide des shPI4KIII α #1 et shPI4KIII α #2 permettait de protéger efficacement les cellules Huh7.5.1 de l'infection par le VHCcc, de l'ordre de 90% (données non montrées).

Notre première expérience de restauration a été réalisée avec une MOI de 1000 pour les lentivirus dédiés à la surexpression, selon un protocole expérimental similaire à celui utilisé sur les hépatocytes humains primaires (Figure 40A).

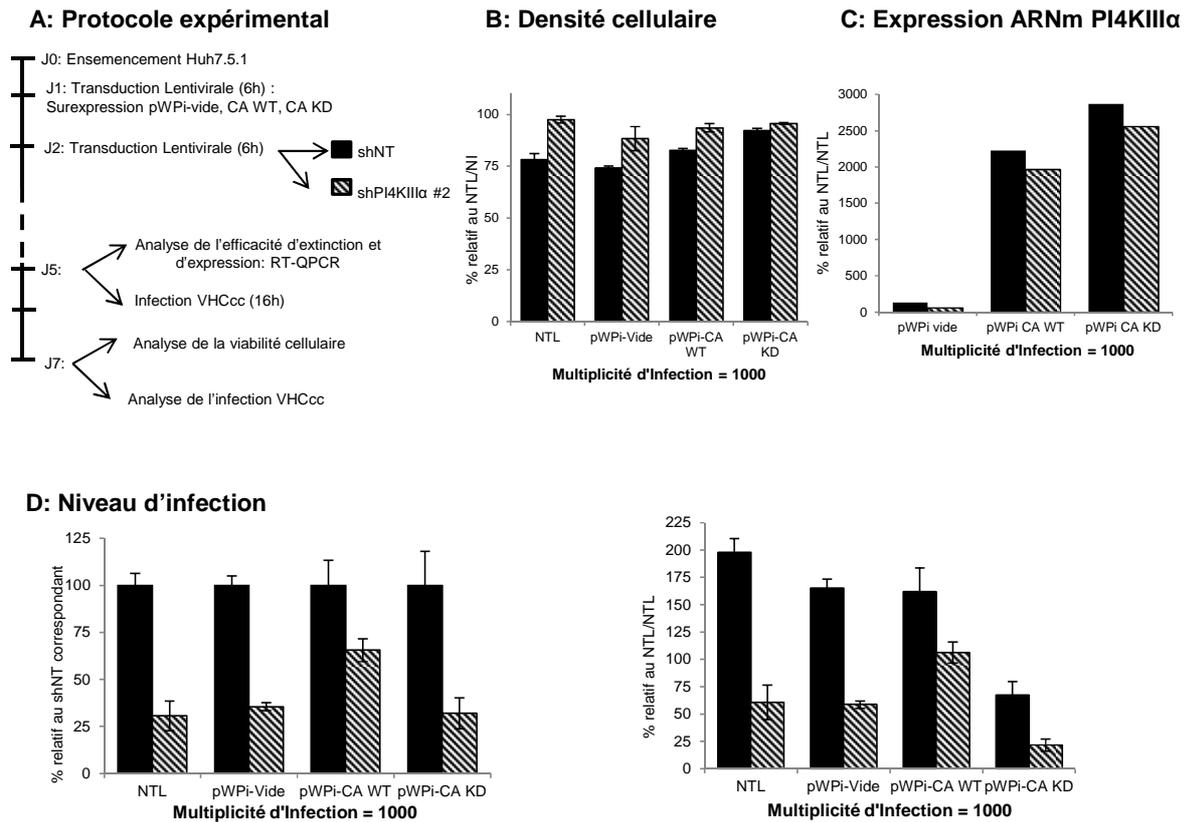


Figure 40: Test de restauration de l'infection par le VHCcc de génotype 2a (J6/JFH1) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1 partiellement dépourvues de PI4KIIIα.

- A. Protocole expérimental. Le lendemain de l'ensemencement, les cellules ont été transduites avec les vecteurs lentiviraux vides ou contenant PI4KIIIα soit sous sa forme sauvage (WT), soit sous sa forme mutée pour son activité kinase (KD), à une Multiplécité d'Infection de 1000. Vingt quatre heures après, elles ont été transduites à une multiplécité d'Infection de 125 avec des lentivirus contenant un shRNA contrôlé (shNT, barres noires) ou un shRNA ciblant uniquement PI4KIIIα endogène, dans sa région 3'NC (shPI4KIIIα #2, barres hachurées).
- B. Impact des transductions lentivirales sur la densité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCcc.
- C. Efficacité de surexpression de l'ARNm de PI4KIIIα. Les niveaux d'ARNm totaux de PI4KIIIα (endogène et exogène) ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au NTL/NTL, c'est-à-dire aux cellules non transduites.
- D. Impact de la surexpression de PI4KIIIα sur l'infection par le VHCcc (Multiplécité d'Infection de 0,005). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL/NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).

Les écarts-types présentés sur B et D ont été obtenus sur des triplicats pour chaque condition, dans la même expérience. Le panel C quant à lui montre des résultats acquis sur un seul puits lysé pour l'extraction d'ARN total.

Les différentes transductions n'ont eu aucun effet significatif sur la densité cellulaire, par rapport aux cellules non transduites et non infectées (Figure 40B). En parallèle, l'efficacité d'extinction de l'ARNm endogène de PI4KIIIα a été vérifiée dans les conditions de transduction avec le vecteur vide (pWPi-vide). Cette inhibition est d'environ 60% pour les cellules transduites avec le lentivirus-shPI4KIIIα #2 à une MOI de 125, par rapport aux cellules transduites avec le lentivirus-shNT. Quant à la surexpression de l'ARNm de PI4KIIIα exogène, elle a été estimée à environ 20 fois celle de l'ARNm endogène (Figure 40C). Les quantités de protéines n'ont pas été analysées dans cette expérience. La surexpression efficace

de l'ARNm a permis une restauration partielle de l'infection. Le niveau d'infection, d'environ 35% dans les cellules transduites avec le lentivirus-shPI4KIII α #2 en absence de surexpression de PI4KIII α exogène (Figure 40D, conditions NTL et pWPi-*vide*) passe à 65% lorsque les cellules surexpriment PI4KIII α WT exogène échappant au shPI4KIII α #2 (Figure 40D). Cette restauration partielle n'a pas été retrouvée dans les cellules transduites avec pWPi-CA KD. Au contraire, de façon très intéressante, il semble y avoir un effet dominant négatif du pWPi-CA KD. En effet, nous avons observé une baisse globale de la susceptibilité à l'infection par le VHCcc dans les cellules co-transduites avec les lentivirus contenant PI4KIII α KD et shNT, par rapport aux cellules co-transduites avec les vecteurs lentiviraux vides et shNT (Figure 40D, histogramme de droite). Par ailleurs, malgré l'effet dominant négatif induit par le pWPi-CA KD, une protection supplémentaire est obtenue quand la quantité de PI4KIII α endogène est également réduite à l'aide du shPI4KIII α #2. Cela signifie que dans les cellules co-transduites avec les lentivirus pWPi-CA KD et shNT, l'infection résiduelle est assurée par la protéine PI4KIII α endogène. Cette observation confirme que l'activité kinase de PI4KIII α est nécessaire à l'infection des cellules Huh7.5.1 par le VHCcc, résultat en accord avec les données publiées par Reiss et ses collaborateurs (Reiss *et al.*, 2011).

Afin de confirmer ce résultat d'une part, et d'améliorer la restauration de l'infection par le VHCcc d'autre part, nous avons réalisé 3 nouvelles expériences. Pour tenter d'améliorer la surexpression de la forme exogène, 3 transductions consécutives sur 3 jours ont été effectuées avec les lentivirus vides ou contenant pWPi-CA WT ou KD, toujours à une MOI de 1000 et avant la transduction dédiée à l'extinction de PI4KIII α endogène. Le protocole expérimental est schématisé dans la partie A de la Figure 41.

Cette figure présente les données de ces 3 expériences, en séparant parfois l'expérience n°1 des expériences n°2 et n°3 pour lesquelles les résultats diffèrent. Etant donné que les résultats de surexpression de l'ARNm et d'impact sur la susceptibilité des cellules à l'infection par le VHCcc diffèrent selon les expériences, les histogrammes des Figures 41C et 41E présentent les données des 3 expériences, mais en séparant l'expérience n°1 des expériences n°2 et n°3. Les données de l'histogramme de la Figure 41B montrent clairement que les quadruples transductions n'affectent pas la densité cellulaire sur les 3 expériences. Quant à l'inhibition de l'ARNm de PI4KIII α endogène, elle atteignait 60% dans les cellules Huh7.5.1 co-transduites avec le vecteur vide et le lentivirus-shPI4KIII α #2, dans les 3 expériences (Figure 41C,

histogrammes du haut et du bas). Concernant l'expression de l'ARNm exogène, dans l'expérience n°1, les quantités d'ARNm étaient 40 fois supérieures dans les cellules où PI4KIII α WT ou KD a été surexprimée, par rapport aux cellules contenant les vecteurs vides (Figure 41C, histogramme du haut). Par contre, les niveaux de surexpression de l'ARNm étaient de 125 fois plus que le niveau basal dans les expériences n°2 et n°3, pour les mêmes conditions expérimentales (Figure 41C, histogramme du bas).

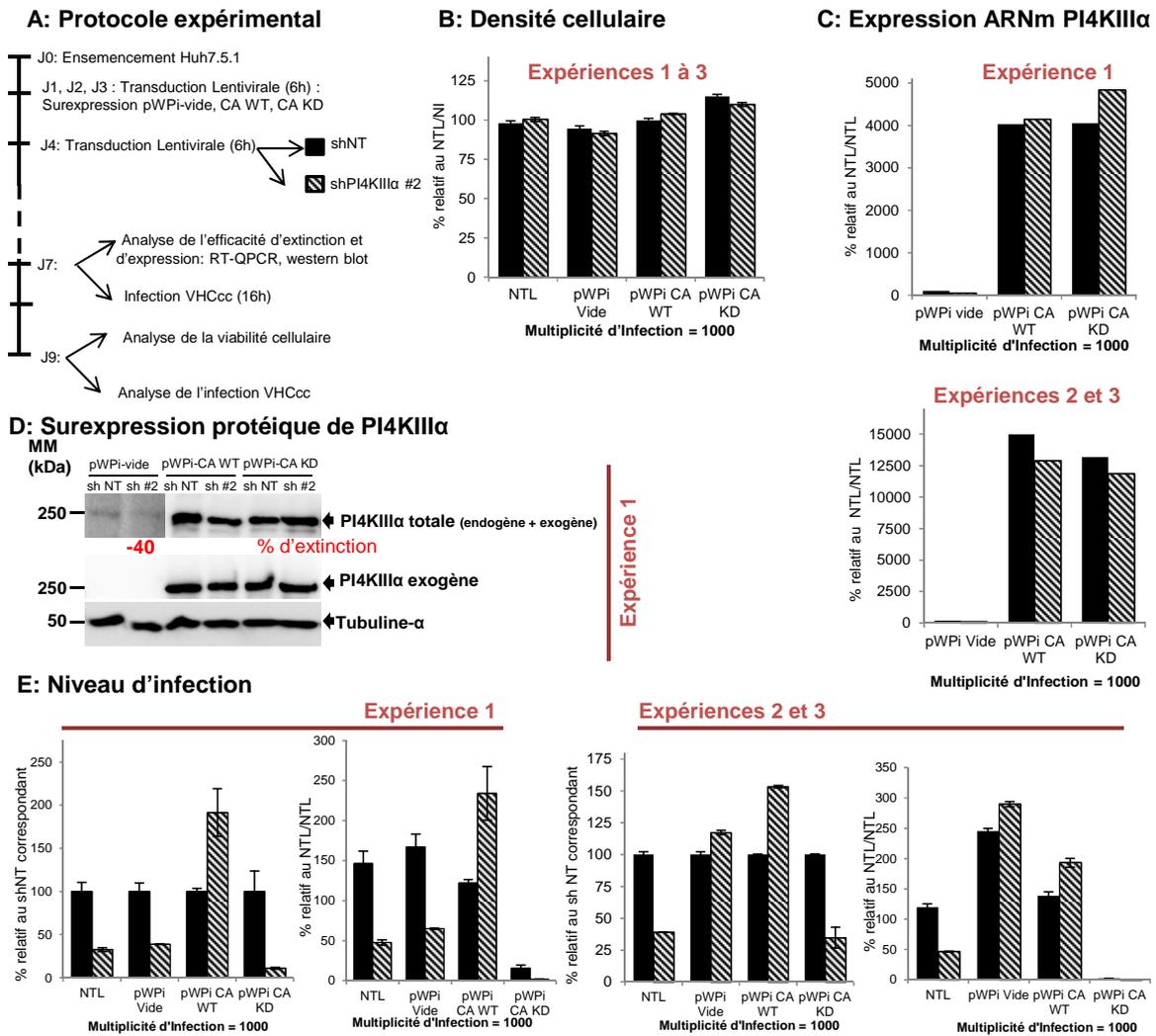


Figure 41: Test de restauration de l'infection par le VHCcc de génotype 2a (J6/JFH1) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1 partiellement dépourvues de PI4KIIIα endogène.

- Protocole expérimental. Le lendemain de l'ensemencement, les cellules ont été transduites 3 fois sur 3 jours consécutifs avec des vecteurs lentiviraux vides ou contenant PI4KIIIα soit sous sa forme sauvage (WT), soit sous sa forme mutée pour son activité kinase (KD), à une Multiplicité d'Infection de 1000. Vingt quatre heures après, elles ont été transduites à une multiplicité d'Infection de 125 avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou un shRNA ciblant uniquement PI4KIIIα endogène, dans sa région 3'NC (shPI4KIIIα #2, barres hachurées).
- Impact des transductions lentivirales sur la densité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCcc.
- Efficacité de surexpression de l'ARNm de PI4KIIIα. Les niveaux d'ARNm totaux de PI4KIIIα (endogène et exogène) ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au NTL/NTL, c'est-à-dire aux cellules non transduites.
- Efficacité de la surexpression protéique de PI4KIIIα. Les lysats cellulaires ont été analysés, en utilisant un anticorps anti-PI4KIIIα pour évaluer la protéine totale (endogène et exogène), un anticorps anti-Tag αHA pour évaluer la protéine exogène ou un anticorps anti-tubuline α. Les positions de PI4KIIIα, de la tubuline α et des masses moléculaires en kDa sont indiquées sur chaque côté de la membrane.
- Impact de la surexpression de PI4KIIIα sur l'infection par le VHCcc (Multiplicité d'Infection de 0,005). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL/NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).

Au niveau protéique, nous avons observé une inhibition de l'ordre de 40%, dans les cellules co-transduites avec le vecteur vide et le lentivirus-shPI4KIIIα #2, comparé aux cellules co-transduites avec le vecteur vide et le lentivirus-shNT (Figure 41D, PI4KIIIα totale). Une inhibition similaire a également été obtenue dans les expériences n°2 et n°3 (données non

montrées). Le western blot a aussi permis de confirmer la surexpression de PI4KIII α WT ou KD exogène dans les cellules (Figure 41D, PI4KIII α exogène). Nous avons aussi analysé le niveau d'expression de PI4KIII α totale, c'est-à-dire la forme endogène et la forme exogène (Figure 41D, PI4KIII α totale). Ainsi, dans les cellules où la protéine PI4KIII α WT ou KD a été surexprimée, nous avons noté une quantité de PI4KIII α totale d'environ 30 fois supérieure à celle mesurée dans les cellules contenant des vecteurs vides. Ce niveau de surexpression est également similaire dans les expériences n°2 et n°3 (données non montrées).

Dans les conditions expérimentales contrôles de simple transduction avec les lentivirus d'extinction des 3 expériences, les cellules Huh7.5.1 ont bien été protégées de l'infection par le VHCcc, avec le shPI4KIII α #2 (Figure 41E, conditions NTL des expériences 1 et 2-3). Des différences de niveaux d'infection surviennent dans les conditions contrôles pWPI-vidé. En effet, dans l'expérience n°1, les triples transductions effectuées à l'aide du lentivirus contrôle pWPI-vidé n'affectent pas le niveau d'infection, puisque l'extinction avec le shPI4KIII α #2 protège les cellules à environ 60% d'une infection par le VHCcc, en comparaison aux cellules transduites avec le lentivirus-shNT (Figure 41E, Expérience 1). A l'inverse, dans les expériences n°2 et n°3, ces triples transductions avec le vecteur lentiviral pWPI-vidé ont augmenté le niveau d'infection par le VHCcc et dans ce cas, aucune différence n'est détectable entre les conditions shNT et shPI4KIII α #2 (Figure 41E, Expériences 2 et 3). Ces incohérences rendent donc impossible l'interprétation des résultats de restauration lorsque pWPI-vidé est remplacé par pWPI-CA WT dans ces deux expériences. Cependant, dans l'expérience n°1, la surexpression de PI4KIII α WT exogène échappant au shPI4KIII α #2 permet de rétablir la susceptibilité à l'infection par le VHCcc. Toutefois, pour une raison encore indéterminée, le niveau d'infection était même supérieur avec le shPI4KIII α #2, comparé au shNT.

Notons aussi que l'on retrouve bien un effet protecteur induit par les propriétés de dominant négatif de la protéine inactive (par surexpression de PI4KIII α KD exogène) ; effet qui est toujours amplifié lorsque la quantité de protéine endogène est également réduite en parallèle à l'aide du shPI4KIII α #2.

Quelques semaines avant la finalisation de ce manuscrit, une ultime tentative de restauration de l'infection par le VHCpp a été réalisée sur les hépatocytes humains primaires, en testant la triple transduction pour tenter une surexpression plus efficace.

Le protocole expérimental est schématisé sur la Figure 42A. Les quantités disponibles de lentivirus permettant la surexpression de PI4KIII α WT et KD étaient insuffisantes pour réaliser en parallèle les analyses d'ARNm et de protéines. En effet, la production des 3 lentivirus de « surexpression » a été réalisée en même temps (5 flasques de 175 cm²/lentivirus) et permet d'obtenir environ 2,2 mL de chaque lentivirus concentré (100x) avec des titres proches de 10¹⁰ UI/mL. Sachant qu'une expérience complète (ARNm, protéine et infection) sur les hépatocytes humains primaires requiert une grande quantité de virus (~1,4 mL), nous avons décidé d'effectuer un simple test d'infection, sans analyser les quantités d'ARNm et de protéines.

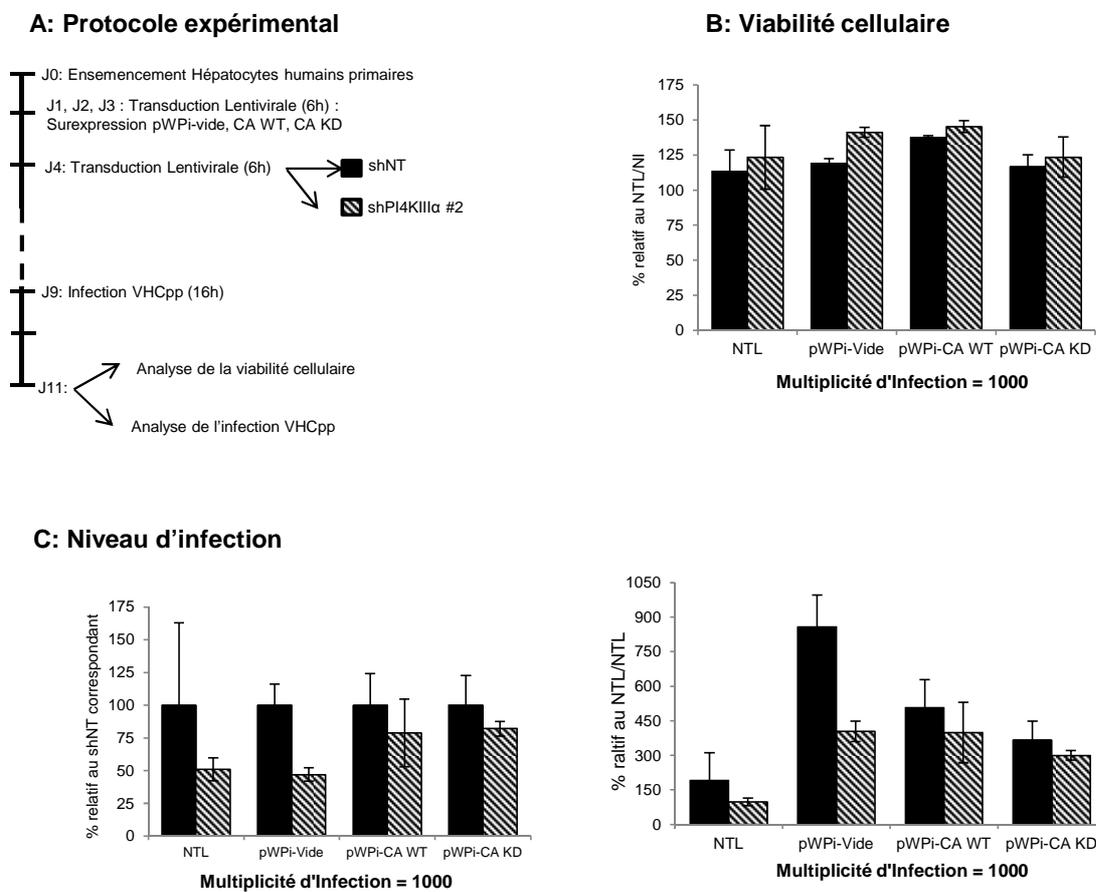


Figure 42: Test de restauration de l'infection par le VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires partiellement dépourvus de PI4KIII α endogène.

- Protocole expérimental. Le lendemain de l'ensemencement, les cellules ont été transduites 3 fois sur 3 jours consécutifs avec les vecteurs lentiviraux vides ou contenant PI4KIII α sous sa forme sauvage (WT) ou sous sa forme mutée pour son activité kinase (KD) à une MOI de 1000. Vingt quatre heures après, elles ont été transduites à une MOI de 500 avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou un shRNA ciblant uniquement PI4KIII α endogène, dans sa région 3'NC (shPI4KIII α #2, barres hachurées).
- Impact des transductions lentivirales sur la viabilité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCpp.
- Impact de la surexpression de PI4KIII α sur l'infection par le VHCpp (Multiplicité d'Infection de 0,02). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL/NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).

Les quadruples transductions n'ont pas eu d'effet sur la viabilité des hépatocytes humains primaires (Figure 42B). De façon surprenante, les triples transductions de surexpression ont augmenté la susceptibilité des cellules à l'infection par le VHCpp (Figure 42C, histogramme de droite). Toutefois, les lentivirus-shPI4KIII α #2 ont permis de protéger de plus de 50% l'infection des hépatocytes humains primaires préalablement transduits avec le vecteur vide (pWPi-vide). Lorsque l'on analyse les résultats quand les valeurs sont rapportées au shNT correspondant (Figure 42C, histogramme de gauche), on a l'impression d'avoir obtenu une restauration de l'infection lorsque les cellules ont été préalablement transduites afin de surexprimer PI4KIII α WT exogène. Cependant, quand on analyse les valeurs brutes rapportées aux cellules non transduites (NTL/NTL) (Figure 42C, histogramme de droite), on s'aperçoit que l'augmentation précédemment observée n'est pas liée à une meilleure infection des hépatocytes humains primaires co-transduits avec les lentivirus contenant pWPi-CA WT et shPI4KIII α #2. Elle est plutôt due à une diminution de l'infection dans les cellules contrôles co-transduites avec les lentivirus pWPi-CA WT et shNT. Le même phénomène survient également pour la construction pWPi-CA KD. Les biais liés aux variations d'infection des cellules transduites avec le lentivirus-shNT contrôle ne permettent donc pas de répondre à notre question initiale concernant la spécificité du phénomène de protection liée à l'extinction de PI4KIII α à l'aide du shPI4KIII α #2. Ces données sont à considérer avec précaution, étant donné que l'expérience n'a été réalisée qu'une fois.

V. Discussion des résultats

Des hépatocytes humains primaires dans lesquels les quantités de PI4KIII α ont été diminuées se sont avérées moins susceptibles à l'infection par un VHCpp de génotype 1a. Cette protection a été reproduite sur 3 lots différents de cellules et à l'aide de 2 shRNA ciblant des régions différentes du gène d'intérêt. Ces résultats venaient donc renforcer l'idée d'une intervention de la protéine PI4KIII α au cours de l'entrée virale. Cependant, nous voulions confirmer ces données par une approche de restauration du phénotype. Toutefois, notre première tentative n'a pas été concluante (Figure 38). Même si une restauration partielle apparente semblait être obtenue, une analyse des données brutes révèle que la diminution de l'écart entre le contrôle shNT et le shPI4KIII α #2 lors de la surexpression de PI4KIII α WT

exogène n'était pas liée à une augmentation de la susceptibilité des cellules co-transduites avec les constructions shPI4KIII α #2 et pWPI-CA WT. Cette diminution était plutôt liée à une baisse de l'infection dans les cellules contrôles co-transduites avec les constructions shNT et pWPI-CA WT. Par ailleurs, les analyses des ARNm et des protéines dans les cellules co-transduites avec les lentivirus dédiés à la surexpression de PI4KIII α révèlent que les niveaux d'expression obtenus pourraient être insuffisants pour obtenir une éventuelle restauration de phénotype (Figure 38C, 38D-PI4KIII α totale). L'origine du problème provenait certainement de la taille du gène PI4KIII α (7600 pb) qui diminuait d'une part les niveaux de production de lentivirus recombinants et peut-être d'autre part, l'efficacité d'expression de PI4KIII α exogène. Ces limites venaient s'ajouter au fait que les hépatocytes humains primaires sont moins susceptibles que les lignées cellulaires à l'infection par des lentivirus pourtant pseudotypés avec la protéine G du VSV.

La première piste que nous avons étudiée était que le promoteur eF-1 α dont dépendait l'expression du gène pouvait être inadapté aux hépatocytes humains primaires. D'ailleurs, nous avons réalisé une étude comparative de l'efficacité de différents promoteurs au sein de ces cellules (kit SMART choice lentiviral shRNA, Thermo Scientific). Il s'est avéré que les promoteurs CMV humains et murins étaient plus efficaces que les autres promoteurs, dont EF-1 α . Nous avons alors substitué le promoteur eF-1 α par le promoteur CMV dans nos constructions. Cependant, nous avons été confrontés à une chute importante du titre viral. On peut d'ailleurs se poser la question d'un éventuel impact de la surexpression de PI4KIII α sur la production de lentivirus, impact qui ne serait pourtant pas lié à l'activité kinase de PI4KIII α , puisque la diminution du titre viral était également observée pour le mutant inactif. Par conséquent, nous avons tenté de palier en partie au problème de rendement de production en réduisant la taille du vecteur de transfert contenant le gène exogène. Nous avons ainsi utilisé un vecteur contenant 4000 pb de moins ; soit une taille finale de 12800 pb pour cette nouvelle série pLL3.8 au lieu de 17100 pb pour la série initiale pWPI, toujours en présence du promoteur CMV. La surexpression avec cette nouvelle série de construction s'est avérée inférieure à celle obtenue avec l'ancienne, bien que nous ne sachions l'expliquer.

Au vue des difficultés rencontrées sur le modèle d'hépatocytes humains primaires, nous avons voulu validé nos outils dans le modèle de lignées. Cela nous aurait permis de prouver que la faible restauration provenait bien de la difficulté de surexprimer PI4KIII α dans les hépatocytes humains primaires. Il fallait donc au préalable montrer que l'inhibition de PI4KIII α par les shPI4KIII α #1 et shPI4KIII α #2 protégeait bien les Huh7.5.1 de l'infection

par le VHCpp. En réalité, seul le shPI4KIII α #1 a permis de protéger les cellules Huh7.5.1 de l'infection, malgré des efficacités d'extinction similaires aux niveaux des ARNm. Pourquoi le shPI4KIII α #2 est-il inefficace dans les lignées, alors qu'il permet de protéger les hépatocytes humains primaires de l'entrée virale ? Plusieurs interprétations peuvent être faites :

(i) PI4KIII α ne serait pas nécessaire à l'entrée du VHCpp dans les cellules Huh7.5.1.

C'est pourquoi le shPI4KIII α #2 n'impacte pas l'efficacité d'infection. Par contre, la protection de l'infection par le shPI4KIII α #1 serait liée à un effet non spécifique de ce shRNA, ce qui expliquerait peut-être en partie l'effet inhibiteur observé sur la densité cellulaire. Cette hypothèse serait en accord avec les données obtenues par Berger *et al.*, avec 3 siRNA différents ciblant PI4KIII α (Berger *et al.*, 2009). Cependant, elle serait en contradiction avec les résultats obtenus avec un pool de 4 siRNA ciblant PI4KIII α , pool capable d'inhiber la réplication virale et l'entrée du VHCpp de même génotype que celui utilisé dans nos expériences (Trotard *et al.*, 2009).

(ii) PI4KIII α est bien requise pour l'entrée du VHCpp dans les cellules Huh7.5.1. Dans ce cas, comment expliquer l'absence de protection avec le shPI4KIII α #2 alors que la quantité d'ARNm est diminuée de façon aussi efficace qu'avec le shPI4KIII α #1 ? Même si la probabilité est faible, on peut imaginer que le shPI4KIII α #2 induit un effet adverse qui viendrait compenser l'effet inhibiteur lié à l'extinction de PI4KIII α .

Au final, avec ces seules données obtenues sur les cellules Huh7.5.1 avec des lentivirus, il est difficile de conclure, alors que les résultats acquis sur les hépatocytes humains primaires semblaient cohérents et en faveur d'une implication de PI4KIII α au cours de l'entrée virale.

Etant donné que le shPI4KIII α #2 ne pouvait donc pas être utilisé pour des expériences de restauration du phénotype d'entrée du VHCpp sur les cellules Huh7.5.1, nous l'avons alors utilisé dans le modèle VHCcc. Nous avons d'abord vérifié que les deux shPI4KIII α permettaient de réduire la quantité intracellulaire d'ARNm de PI4KIII α (~ 60% d'extinction) et de protéger efficacement (90% d'inhibition) les cellules Huh7.5.1 de l'infection par le VHCcc (données non montrées). Ensuite, notre 1^{er} test de restauration du phénotype sur ce modèle était encourageant puisque l'expression de PI4KIII α WT exogène échappant au shPI4KIII α #2 permettait de presque doubler le niveau d'infection, comparé au point

équivalent contrôle, sans PI4KIII α WT exogène. Par ailleurs, non seulement aucune restauration n'était détectable avec la forme inactive de la protéine (PI4KIII α KD), mais un effet dominant négatif fut observé. Ces résultats importants démontraient que nos outils (lentivirus d'extinction et de surexpression) étaient fonctionnels. Cette validation est un élément supplémentaire pour l'interprétation des données obtenues avec le shPI4KIII α #2 qui s'est révélé incapable de protéger les cellules Huh7.5.1 de l'infection par le VHCpp. Elle est en effet en faveur d'une entrée du VHCpp, dans les cellules Huh7.5.1, indépendante de PI4KIII α . L'effet protecteur observé avec le shPI4KIII α #1 résulterait donc d'un effet non spécifique.

Suite à cette augmentation encourageante de l'infection par le VHCcc après la surexpression de PI4KIII α WT, nous avons tenté d'obtenir une restauration plus importante en procédant à des transductions multiples successives, afin d'augmenter la surexpression de l'exogène. Ces transductions multiples (triples) ont eu un effet inattendu sur les cellules Huh7.5.1, en fonction des expériences. En effet, dans la 1^{ère} expérience de triple transduction de surexpression que nous avons effectué, la surexpression exogène de PI4KIII α WT a permis de rétablir l'infection par le VHCcc, dans les cellules où PI4KIII α endogène a été inhibée. Cette restauration de l'infection a été obtenue sans effet notable de la seule triple transduction. Ainsi, que ce soit dans les cellules contrôles simple transduction d'extinction (NTL) ou dans les cellules contrôles de triple transduction (pWPi-vide), l'inhibition de PI4KIII α endogène par le shPI4KIII α #2 a permis de protéger de façon similaire les cellules de l'infection par le VHCcc (Figure 41E). Par contre, dans les expériences n°2 et n°3, les triples transductions avec le vecteur porteur de pWPi-vide ont augmenté le niveau d'infection par le VHCcc, et dans ce cas, aucune différence n'était détectable entre les conditions shNT et shPI4KIII α #2. Cependant, dans les 3 expériences, l'effet dominant négatif de PI4KIII α KD était toujours observé.

Même si les différences entre l'expérience n°1 et les expériences n°2 et n°3 rendent difficiles les interprétations de restauration du phénotype d'infection dans les cellules Huh7.5.1, nous pouvons supposer que PI4KIII α est importante pour l'infection par le VHCcc de génotype 2a (J6/JFH1) dans les Huh7.5.1, et que cela dépend de l'activité kinase. Cette donnée est alors concordante avec les résultats de Reiss *et al.*, où un génotype 2a a également été utilisé (isolat JcR). En effet, l'équipe allemande a généré des lignées Huh7.5 où PI4KIII α endogène était stablement inhibée, et où les formes active ou inactive de PI4KIII α exogène étaient

stablement exprimées. Après infection par le VHCcc JcR, ils ont constaté que l'infection était partiellement rétablie par la surexpression de PI4KIII α WT, mais pas par celle de PI4KIII α KD (Reiss *et al.*, 2011).

En voyant que la triple transduction avec les vecteurs lentiviraux contenant PI4KIII α WT exogène avait permis une restauration de l'infection par le VHCcc dans les Huh7.5.1, du moins dans l'expérience n°1, nous avons voulu tester cette approche dans les hépatocytes humains primaires. Comme dans le cas des expériences n°2 et n°3 sur les cellules Huh7.5.1, nous avons observé un effet de la triple transduction sur l'infection par le VHCpp. En effet, dans les hépatocytes humains primaires transduits avec les vecteurs lentiviraux pWPi-vide, CA WT ou CA KD, nous avons constaté une augmentation globale de l'infection, comparée aux cellules contrôles (NTL) où ces vecteurs n'ont pas été introduits (Figure 42C). Toutefois, contrairement à ce qui a été observé dans les Huh7.5.1, cela n'a pas eu d'impact sur l'inhibition de l'infection par le VHCpp dans les cellules contrôles (pWPi-vide). Dans le même temps, la surexpression de PI4KIII α WT ou KD a entraîné une diminution de l'infection par le VHCpp dans les cellules transduites avec les lentivirus-shNT, comparé aux cellules co-transduites avec le vecteur vide et le lentivirus-shNT (Figure 42C, histogramme de droite). Étonnament, l'infection semble partiellement restaurée par la surexpression de PI4KIII α WT, mais aussi de PI4KIII α KD. En effet, par rapport au contrôle shNT, le niveau d'infection est passé de 53% en présence du vecteur vide, à 85% et 95% quand PI4KIII α WT ou KD était surexprimée, respectivement (Figure 42C, histogramme de gauche). La restauration de l'infection par la surexpression de PI4KIII α KD dans ce test de triple transduction de surexpression était surprenante, mais il n'est pas exclu que l'intervention de PI4KIII α au cours de l'entrée du VHCpp dans les hépatocytes humains primaires soit indépendante de son activité kinase. Cependant, cette hypothèse est en partie en contradiction avec les résultats obtenus lors de l'utilisation d'inhibiteurs chimiques. D'ailleurs, aucun effet dominant négatif n'a été détecté dans ce modèle lors de la transduction avec les lentivirus devant permettre la surexpression de PI4KIII α inactive (KD). Toutefois, une surexpression insuffisante pourrait expliquer l'absence d'effet dominant négatif. Ces données de restauration suite à des transductions multiples sont cependant à considérer avec précaution car elles sont issues d'une unique expérience sur les hépatocytes humains primaires.

Au final, malgré la difficulté d'émettre une conclusion définitive, des indices suggèrent que PI4KIII α est importante pour l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires. En effet, la protection de l'infection par 2 shRNA différents ciblant PI4KIII α indique que l'effet observé pourrait être spécifique de l'extinction partielle de PI4KIII α .

Résultat 4 :
Implication de PI4KIIIβ dans
l'entrée du VHC

I. Effet de l'extinction de PI4KIII β sur l'entrée virale.

En parallèle de PI4KIII α , nous avons également voulu évaluer l'implication de PI4KIII β au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires. Les expériences présentées dans la Figure 43 ci-dessous ont été réalisées sur trois lots différents d'hépatocytes humains primaires. Le protocole expérimental est schématisé dans la section A. Le lendemain de l'ensemencement, les cellules ont été transduites avec les vecteurs lentiviraux-shRNA, à différentes MOI. A cinq jours post-transduction, l'inhibition de PI4KIII β a été analysée par RT-QPCR et WB ; en parallèle, une infection avec du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) a été réalisée pendant 16 h. Environ 48 heures après cette infection, la viabilité cellulaire, ainsi que les niveaux d'infection ont été mesurés.

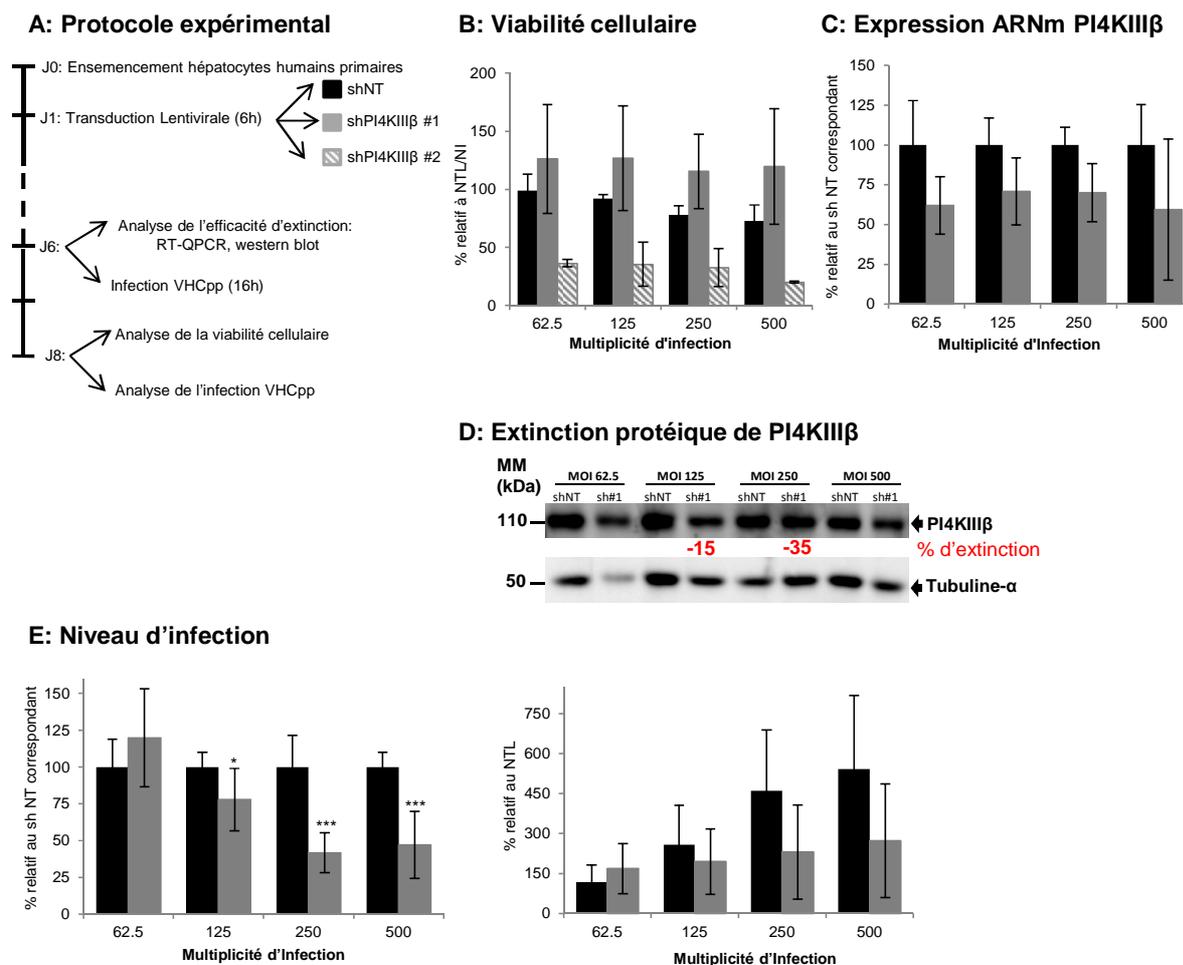


Figure 43: Effet de l'inhibition de PI4KIIIβ sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires.

- Protocole expérimental. Cinq jours avant leur infection par le VHCpp, les cellules ont été transduites à différentes multiplicités d'infection avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou deux shRNA indépendants ciblant PI4KIIIβ (shPI4KIIIβ #1 et shPI4KIIIβ #2, barres grises et hachurées, respectivement).
 - Impact de la transduction lentivirale sur la viabilité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCpp.
 - Efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIIIβ. Les niveaux d'ARNm de PI4KIIIβ ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au shNT correspondant.
 - Efficacité d'extinction de la protéine PI4KIIIβ. Les lysats cellulaires ont été analysés en utilisant un anticorps anti-PI4KIIIβ ou un anticorps anti-tubuline α . Les positions de PI4KIIIβ, de la tubuline α et des masses moléculaires en kDa sont indiquées sur chaque côté de la membrane.
 - Impact de l'extinction partielle de PI4KIIIβ sur l'infection par le VHCpp (Multiplicité d'Infection de 0,2). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).
- B, C et E sont présentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes, effectuées sur différents lots de cellules \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

La transduction avec les lentivirus contenant shPI4KIIIβ #2 (ciblant le cadre ouvert de lecture) a eu un effet toxique sur les hépatocytes humains primaires, par rapport aux cellules non transduites et non infectées (Figure 43B). Le shPI4KIIIβ #1 (ciblant la région 3'NC) quant à lui n'a pas été toxique. Du fait de la forte toxicité liée au shPI4KIIIβ #2, nous n'avons pas poursuivi son exploitation dans la suite de notre travail. De plus, nous avons testé des MOI plus faibles de lentivirus comportant ce shRNA (MOI inférieures à 10), mais l'effet

toxique était toujours présent. Deux hypothèses principales pourraient expliquer cette toxicité : la plus probable serait que PI4KIII β est indispensable à la survie cellulaire. En effet, en 1999, Godi *et al.* ont montré que PI4KIII β était nécessaire au maintien de l'intégrité structurelle de l'appareil de Golgi. L'inhibition de son activité kinase entraînait une désorganisation du complexe golgien, dans les cellules COS-7 de la lignée rénale du singe vert d'Afrique (Godi *et al.*, 1999). Dans notre cas, cela impliquerait que le shPI4KIII β #2 ait été plus efficace que le shPI4KIII β #1 pour l'extinction de la cible ; ce qui explique son effet toxique. La deuxième hypothèse serait quant à elle liée à de possibles effets adverses du shRNA sur une autre cible vitale pour la cellule.

L'efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIII β a été vérifiée pour le shPI4KIII β #2. Cette inhibition, d'environ 30% était stable quelque que soit la MOI utilisée (Figure 43C). L'extinction protéique était également faible, et a atteint 35% avec une MOI de 250 (Figure 43D). L'inhibition protéique n'a pu être observée aux MOI 62,5 et 500, probablement du fait d'un biais de quantification lié à une quantité de tubuline plus faible pour ces conditions. Malgré ces extinctions faibles de l'ARNm et de la protéine, une protection des cellules à l'infection par le VHCpp a tout de même été observée, de l'ordre de 50% aux deux plus fortes MOI (250 et 500), lorsque les valeurs sont rapportées au contrôle d'infection, c'est-à-dire le lentivirus-shNT à la même MOI (Figure 43E, histogramme de gauche). Par contre, quand les valeurs sont rapportées au contrôle non transduit (NTL), on s'aperçoit que cette inhibition apparente n'est pas liée à une diminution de l'infection dans les cellules transduites avec les lentivirus-shPI4KIII β #2. Elle est plutôt due à une augmentation de la susceptibilité à l'infection, des cellules transduites avec le lentivirus-shNT (phénomène déjà observé, Figure 36E, histogramme de droite). Il est par conséquent difficile de conclure sur l'implication de PI4KIII β au cours de l'entrée du VHCpp de génotype 1a dans les hépatocytes humains primaires puisque ces résultats discutables ont été obtenus avec un seul shPI4KIII β .

En parallèle des hépatocytes humains primaires, nous avons auparavant voulu valider l'efficacité de nos shPI4KIII β dans les cellules Huh7.5.1. Les résultats présentés dans la Figure 44 ci-dessous sont représentatifs de 4 expériences différentes. Le protocole expérimental est très similaire à celui utilisé pour les hépatocytes humains primaires, à l'exception du temps entre la transduction lentivirale et l'infection par le VHCpp qui est de 3 jours, au lieu de 5 jours (Figure 44A).

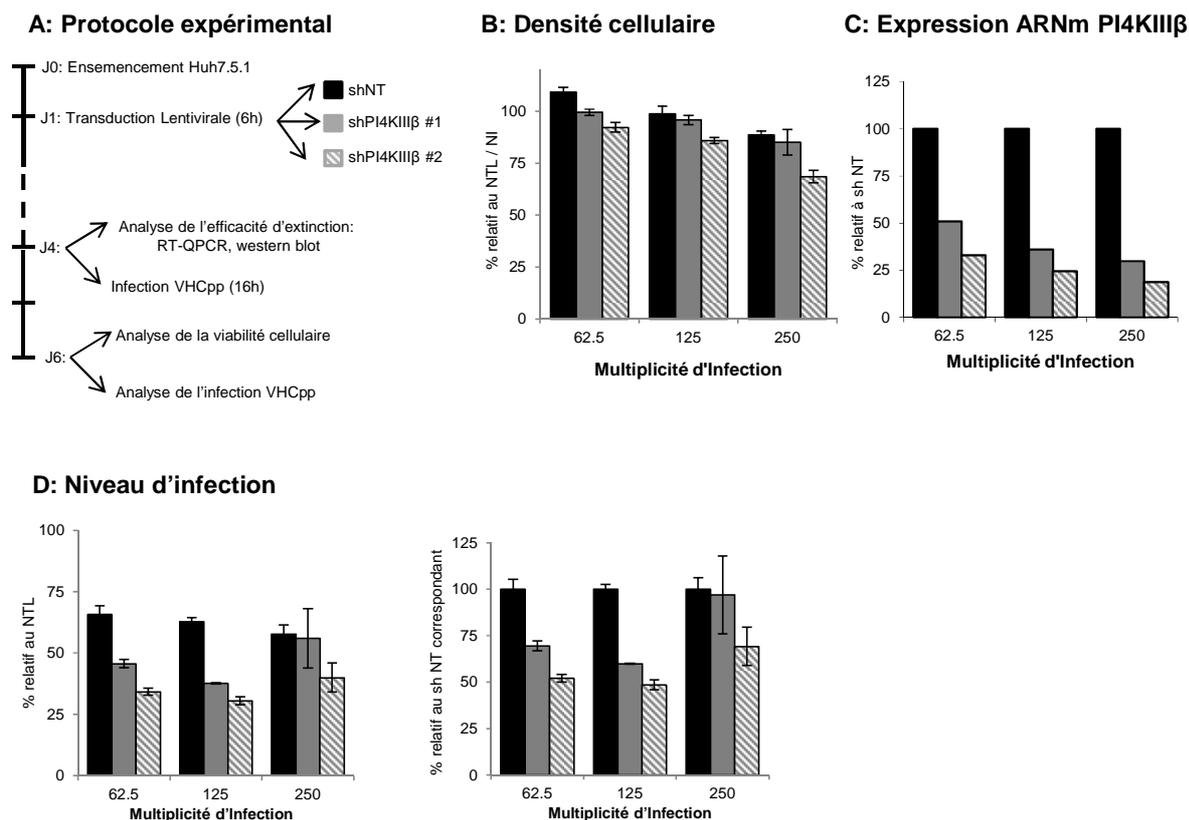


Figure 44: Effet de l'inhibition de PI4KIIIβ sur l'entrée du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1.

- Protocole expérimental. Trois jours avant leur infection par le VHCpp, les cellules ont été transduites à différentes multiplicités d'infection avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou deux shRNA indépendants ciblant PI4KIIIβ (shPI4KIIIβ #1 et shPI4KIIIβ #2, barres grises et hachurées, respectivement).
 - Impact de la transduction lentivirale sur la densité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites et non infectées par le VHCpp.
 - Efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIIIβ. Les niveaux d'ARNm de PI4KIIIβ ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au shNT correspondant.
 - Impact de l'extinction partielle de PI4KIIIβ sur l'infection par le VHCpp (Multiplicité d'Infection de 0,02). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).
- B, C et D sont représentatifs de quatre expériences indépendantes. Les écarts-types présentés sur B et D ont été obtenus sur des triplicats pour chaque condition, dans la même expérience. Le panel C quant à lui montre des résultats acquis sur un seul puits lysé pour l'extraction d'ARN total.

La transduction avec les lentivirus comportant shPI4KIIIβ #1 et shPI4KIIIβ #2 a eu un léger effet sur la densité cellulaire des Huh7.5.1 (Figure 44B), par rapport aux cellules non transduites et non infectées. Cependant, le shPI4KIIIβ #2 n'a pas eu d'effet aussi délétère que sur les hépatocytes humains primaires. L'efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIIIβ a été vérifiée, et dès la plus faible MOI utilisée (62,5), l'inhibition était de 50% et dose-dépendante (Figure 44C). Dans cette expérience de validation, l'extinction protéique n'a pas été vérifiée. Avec une inhibition d'au moins 50% de l'ARNm, une protection efficace et stable des cellules à l'entrée du VHCpp a été observée ; elle était de l'ordre de 60% avec les deux shPI4KIIIβ par rapport au contrôle shNT de la même MOI et au NTL (Figure 44D,

histogrammes de gauche et de droite, respectivement). Par contre, la protection des cellules se perdait à la plus forte MOI de 250. Cette perte de protection pourrait venir d'effets adverses liés à une inhibition trop importante de PI4KIII β .

Cette expérience de validation a été réalisée avec les mêmes lots de lentivirus que ceux utilisés sur les hépatocytes humains primaires, et il n'y a pas eu d'augmentation de l'infection par le VHCpp due à la transduction avec les lentivirus-shNT dans les Huh7.5.1 (Figure 44D, histogramme de droite). Ces résultats obtenus après l'extinction de PI4KIII β par les shPI4KIII β #1 et #2 sur les cellules Huh7.5.1 sont concordants avec les données précédemment publiées par notre équipe lors de l'utilisation de siRNA synthétiques (Trotard *et al.*, 2009).

II. Validation de l'implication de PI4KIII β dans l'entrée virale.

Concernant les expériences réalisées sur les hépatocytes humains primaires, étant donné que nos interprétations ne reposent que sur un seul shRNA, il était important de confirmer que la protection était bien spécifique de l'extinction de PI4KIII β en tentant de restaurer le phénotype d'infection à l'aide d'une protéine PI4KIII β exogène échappant au shPI4KIII β #1. Cela permettrait d'exclure de possibles effets adverses et statuer si l'activité kinase est requise pour l'entrée virale, le cas échéant.

Pour cela, nous disposons de plusieurs constructions plasmidiques obtenues auprès de Dr Tamas Balla et validées dans des travaux dont il est co-signataire (Hsu *et al.*, 2010). Il s'agit :

- D'un vecteur de transfert plasmidique vide, qui sert de contrôle (pLV-vide) ;
- D'un vecteur codant PI4KIII β sous sa forme sauvage (U81802.1) (pLV-CB WT) et incluant en N-terminal un tag-HA. Le gène cloné, d'environ 2500 pb est uniquement constitué de la partie codante qui, contrairement à l'ARN endogène échappe au shPI4KIII β #1 ciblant la région 3'NC ;
- D'un vecteur codant PI4KIII β sous sa forme mutée (pLV-CB KD). Cette forme mutée diffère de la forme sauvage uniquement par la substitution D656A qui est une mutation ponctuelle inactivatrice de l'activité kinase.

Le protocole expérimental utilisé est schématisé sur la Figure 45A. Brièvement, le lendemain de l'ensemencement, les hépatocytes humains primaires ont été transduits avec les lentivirus contenant PI4KIII β WT ou KD. Le lendemain, les cellules ont été transduites avec les lentivirus-shNT ou shPI4KIII β #1. Cinq jours plus tard, l'expression de PI4KIII β a été analysée par RT-QPCR et WB ; en parallèle, une infection avec le VHCpp a été réalisée pendant 16 h. Environ 48 heures après cette dernière infection, une analyse de la viabilité cellulaire a été effectuée, et les niveaux d'infections ont été évalués pour ces différentes conditions expérimentales.

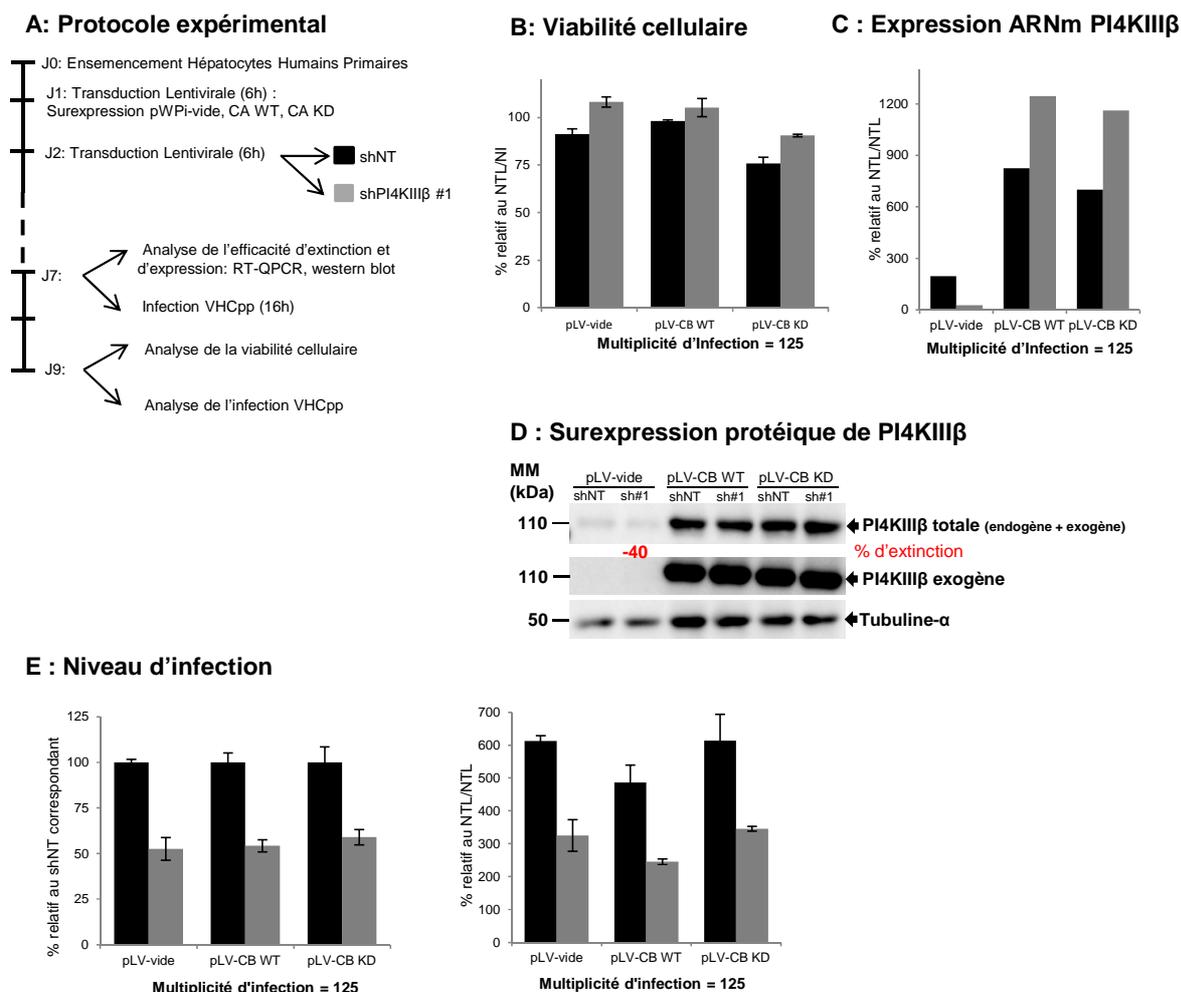


Figure 45: Test de restauration de l'infection par du VHCpp de génotype 1a (isolat H77) dans les hépatocytes humains primaires partiellement dépourvus de PI4KIIIβ endogène.

- A. Protocole expérimental. Six jours avant leur infection par le VHCpp, les cellules ont été transduites avec des vecteurs lentiviraux vides ou contenant PI4KIII β sous sa forme sauvage (WT) ou sous sa forme mutée pour son activité kinase (KD) à une Multiplicité d'Infection de 125. Vingt quatre heures plus tard, elles ont été transduites à une Multiplicité d'Infection de 500 avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle (shNT, barres noires) ou un shRNA ciblant uniquement PI4KIIIβ endogène, dans sa région 3'NC (shPI4KIIIβ #1, barres grises).
- B. Impact des transductions lentivirales sur la viabilité cellulaire, exprimée par rapport au NTL/NI correspondant aux cellules non transduites par des lentivirus et non infectées par le VHCpp.
- C. Efficacité de surexpression de l'ARNm de PI4KIIIβ. Les niveaux d'ARNm de PI4KIIIβ (endogène et exogène) ont été évalués par RT-qPCR, normalisés par rapport à l'ARNm de la GAPDH et exprimés par rapport au NTL/NTL, c'est-à-dire aux cellules non transduites.
- D. Efficacité de la surexpression protéique de PI4KIIIβ. Les lysats cellulaires ont été analysés en utilisant un anticorps anti-PI4KIIIβ pour évaluer la protéine totale (endogène et exogène), un anticorps anti-Tag αHA pour évaluer la protéine exogène ou un anticorps anti-tubuline α. Les positions de PI4KIIIα, de la tubuline α et des masses moléculaires en kDa sont indiquées sur chaque côté de la membrane.
- E. Impact de la surexpression de PI4KIIIβ sur l'infection par le VHCpp (Multiplicité d'Infection de 0,2). Les niveaux d'infection sont rapportés, soit au shNT correspondant (histogramme de gauche), soit au NTL/NTL c'est-à-dire aux cellules non transduites (histogramme de droite).
- B, C et D représentent la moyenne de deux expériences indépendantes (± SEM pour B et E uniquement).

Les transductions n'ont pas eu d'effet significatif sur la viabilité des hépatocytes humains primaires, par rapport aux cellules non transduites et non infectées (Figure 45B), ce qui est en accord avec ce qui a été obtenu précédemment (Figure 43B).

L'efficacité d'extinction de l'ARNm de PI4KIII β a été vérifiée. Le shPI4KIII β #1 a permis de diminuer de 85% les quantités d'ARNm de sa cible dans les cellules préalablement transduites avec le vecteur lentiviral servant de contrôle (pLV-vide). L'efficacité de surexpression de l'ARNm exogène de PI4KIII β a également été mesurée (Figure 45C). Avec une MOI de 125, la surexpression était de l'ordre de 10 fois par rapport au contrôle (pLV-vide) (Figure 45C). Dans les cellules co-transduites avec pLV-vide et le lentivirus-shPI4KIII β #1, l'inhibition de la protéine PI4KIII β était d'environ 40% (Figure 45D). Nous avons aussi vérifié la surexpression protéique de la forme exogène (Figure 45D, PI4KIII β exogène), de même que le niveau d'expression de PI4KIII β totale (Figure 45D, PI4KIII β totale). Il y a bien eu une augmentation de l'expression de PI4KIII β . En effet, comparée aux cellules transduites avec le vecteur vide, la surexpression était de l'ordre de 40 fois dans les cellules transduites avec les lentivirus comportant PI4KIII β WT ou KD. Malgré cela, l'infection, qui a pourtant bien été inhibée par le shPI4KIII β #1, n'a pas été restaurée par la surexpression efficace de PI4KIII β WT, ni par celle de PI4KIII β KD (Figure 45E). Dans ces expériences de restauration du phénotype, il n'y pas eu d'augmentation de la susceptibilité à l'infection due à la transduction par les lentivirus-shNT. Cela semblait lié à la différence de lots de lentivirus-shNT utilisés pour les expériences précédentes d'inhibition (Figure 43E) et celles de restauration du phénotype (Figure 45E). Au final, l'effet observé de protection de l'infection par le VHCpp serait donc lié à des effets non spécifiques induits par le shPI4KIII β #1. Aucune conclusion ne peut donc être émise quant à l'implication de PI4KIII β au cours de l'entrée du VHCpp dans les hépatocytes humains primaires.

III. Discussion des résultats

En parallèle de PI4KIII α , nous avons étudié l'implication de PI4KIII β au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires. L'importance de PI4KIII β dans l'entrée d'autres virus à ARN simple brin de polarité positive a déjà été démontrée. En effet, en 2012, Yang et ses collègues ont montré que l'activité kinase de PI4KIII β était nécessaire à l'étape d'entrée du coronavirus responsable du Syndrome Respiratoire Sévère Aigu, le SARS-CoV. Les auteurs ont ainsi montré que l'inhibition de l'expression de PI4KIII β par ARN interférence conduisait à une baisse de l'entrée du SARS-CoV dans les cellules de la lignée

VeroE6 (lignée rénale du singe vert d'Afrique). De plus, grâce à une surexpression ectopique de la phosphatase Sac1, l'équipe a mimé un microenvironnement déplété en PI4P. En effet, Sac1 déphosphoryle le PI4P en PtdIns. Avec cette surexpression exogène de Sac1, une baisse de l'entrée du SARS-CoV a également été observée, montrant ainsi que l'activité de PI4KIII β , et donc la production de PI4P étaient impliquées au cours de l'entrée du SARS-CoV dans les cellules Vero E6. Par contre, la manière dont PI4KIII β contrôle l'entrée de ce virus n'a pas été élucidée. Il semblerait cependant que cette kinase ne contrôle, ni le niveau d'expression membranaire du récepteur Angiotensin-1 Converting Enzyme 2 (ACE2), ni l'attachement du virus à la cellule, ni son internalisation, ni l'étape de fusion (Yang *et al.*, 2012).

A ce stade, des conclusions définitives ne peuvent être émises concernant l'importance de PI4KIII β au cours de l'entrée du VHC. En effet, malgré l'utilisation de fortes doses de lentivirus-shPI4KIII β #1, on assiste à une diminution modérée de l'ARNm et de la protéine (environ 30% d'extinction). Cela s'est traduit par une protection d'environ 50% de l'entrée du VHC, qui semble significative. On peut donc imaginer que de faibles diminutions de l'expression de PI4KIII β suffisent à protéger les hépatocytes humains primaires face à l'entrée du VHC. Toutefois, l'inhibition de PI4KIII β avec un 2nd shRNA, le shPI4KIII β #2 s'est avéré très toxique pour les hépatocytes humains primaires, même à des faibles doses, alors qu'elle n'a pas eu d'effet sur la densité cellulaire des Huh7.5.1. Cette toxicité pourrait être liée au caractère indispensable de PI4KIII β pour la survie cellulaire, hypothèse que nous avons émise plus haut. Cependant, pourquoi seul le shPI4KIII β #2 est toxique dans les hépatocytes humains primaires ? On peut supposer que le shPI4KIII β #2 ait été plus efficace que shPI4KIII β #1 dans l'extinction de la cible, et que ce soit cette inhibition trop importante qui a eu un effet délétère dans les hépatocytes humains primaires, mais pas dans les cellules Huh7.5.1. On peut également envisager des effets adverses dus à l'inhibition de cette enzyme.

Malgré une surexpression conséquente de PI4KIII β WT (augmentation de 40 fois environ du niveau d'expression exogène, par rapport à l'endogène), l'infection par le VHCpp n'a pu être restaurée lors de l'extinction de la protéine endogène. La question peut donc se poser de savoir d'où vient l'effet sur l'entrée virale quand nous avons inhibé PI4KIII β . On peut envisager l'existence d'un effet non spécifique du shPI4KIII β #1, et que PI4KIII β ne soit finalement pas impliquée dans l'entrée du VHC.

Au final, les différences tant au niveau de la viabilité/toxicité ou encore dans les efficacités d'extinction ou de protection face à l'infection entre les lignées cellulaires et les cultures primaires illustrent la difficulté d'extrapoler des données obtenues avec des lignées cellulaires. Elles confirment donc la nécessité de valider les différentes expérimentations dans un modèle primaire.

Résultat 5 :
Article ; Surexpression de
PI4KIII α et carcinome
hépatocellulaire

L'article soumis dans **Molecular Carcinogenesis** reprend les principaux résultats que nous avons obtenu sur la régulation du niveau d'expression de PI4KIII α en physiopathologie hépatique.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) reste une pathologie caractérisée par un taux élevé de récurrence et de décès, même après une résection chirurgicale. La caractérisation moléculaire des CHC a pour but d'affiner le pronostic et d'apporter des pistes pour tenter d'améliorer la thérapie. Les phosphatidylinositol 4-kinases ont récemment émergé comme facteurs associés à des cancers (Waugh, 2012). En outre, la phosphatidylinositol 4-kinase de type III α (PI4KIII α) s'avère nécessaire pour la propagation du virus de l'hépatite C, un facteur étiologique important du CHC (Berger *et al.*, 2011; Lim & Hwang, 2011; Reiss *et al.*, 2011; Tai & Salloum, 2011). En collaboration avec l'équipe du Pr Zucman-Rossi (Inserm U674, Paris), nous avons travaillé sur une collection de tissus hépatiques issue d'une cohorte de 344 patients. Nous avons détecté une augmentation significative de la quantité de transcrits de PI4KIII α dans le CHC. Nous avons également montré que cette augmentation dans les CHC était plus importante dans les échantillons de tumeurs peu différenciées et avec un taux de prolifération plus élevé. Cette association a également été confirmée dans des modèles *in vitro*, en modulant l'état de prolifération et de différenciation dans des cellules de lignées hépatiques humaines (Huh7.5.1 et HepaRG). En outre, les patients atteints de CHC ayant subi une résection chirurgicale et ayant des quantités importantes d'ARNm de PI4KIII α dans leur tissu tumoral présentaient un risque plus élevé de récurrence tumorale. De plus, chez les patients n'ayant pas été opérés, ces quantités élevées corrélaient avec une mortalité liée au CHC, plus importante. Une analyse multivariée a indiqué que la quantité d'ARNm de PI4KIII α était un marqueur de pronostic indépendant de survie, chez les patients atteints de CHC. L'utilisation de PI4KIII α comme un nouveau marqueur moléculaire pourrait améliorer les modèles de pronostic déjà établis et pourrait conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques.



Overexpression of Phosphatidylinositol 4-Kinase type III α is associated with the undifferentiated status and poor prognosis of hepatocellular carcinoma

Journal:	<i>Molecular Carcinogenesis</i>
Manuscript ID:	MC-13-0129
Wiley - Manuscript type:	Brief Communication
Date Submitted by the Author:	23-Apr-2013
Complete List of Authors:	<p>Ilboudo, Adeodat; INSERM, UMR1085; Université de Rennes 1, ; Fédération de Recherche BioSit de Rennes, Nault, Jean Charles; INSERM, UMR674; Université Paris Descartes, Labex Immuno-oncology Dubois-Pot-Schneider, Hélène; INSERM, UMR991; Université de Rennes 1, ; Fédération de Recherche BioSit de Rennes, Corlu, Anne; INSERM, UMR991; Université de Rennes 1, ; Fédération de Recherche BioSit de Rennes, Zucman-Rossi, Jessica; INSERM, UMR 674; Université Paris Descartes, Labex Immuno-oncology Samson, Michel; INSERM, UMR1085; Université de Rennes 1, ; Fédération de Recherche BioSit de Rennes, UMS3480 Le Seyec, Jacques; INSERM, UMR1085; Université de Rennes 1, ; Fédération de Recherche BioSit de Rennes,</p>
Keywords:	Hepatocellular carcinoma, PI4KA, biomarker, prognosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Overexpression of Phosphatidylinositol 4-Kinase type III α is associated with the**
4
5 **undifferentiated status and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.**
6
7

8
9 Adéodat Ilboudo^{1,3,4*}, Jean-Charles Nault^{5,6*}, Hélène Dubois-Pot-Schneider^{2,3,4}, Anne
10 Corlu^{2,3,4}, Jessica Zucman-Rossi^{5,6}, Michel Samson^{1,3,4} and Jacques Le Seyec^{1,3,4,†}
11
12

13
14
15
16 ¹ INSERM, UMR1085, Institut de Recherche Santé Environnement & Travail (IRSET), F-
17 35043 Rennes, France.

18
19 ² INSERM, UMR991, Liver Metabolisms and Cancer, F-35033 Rennes, France.

20
21 ³ Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France.

22
23 ⁴ Fédération de Recherche BioSit de Rennes UMS 3480-, F-35043 Rennes, France.

24
25 ⁵ INSERM, UMR674, Génomique fonctionnelle des tumeurs solides, IUH, Paris, F-75010
26 France

27
28 ⁶ Université Paris Descartes, Labex Immuno-oncology, Sorbonne Paris Cité, Faculté de
29 Médecine, Paris, France
30
31

32
33
34 * equal contribution

35
36
37 † corresponding author : U1085, Faculté de Pharmacie, 2 av. du Pr. Léon Bernard, 35043
38 Rennes cedex, France ; Tel : + 33 2 23 23 48 62 ; Fax : + 33 2 23 23 47 21 ; Email :
39 jacques.leseyec@univ-rennes1.fr
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Grant support:

This work was supported by the Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University of Rennes 1, the Ligue Nationale contre le Cancer (“Coordination Grand-Ouest” and “Cartes d’identité des tumeurs” program), the Réseau national CRB Foie, INCa (WntHCC) and BioIntelligence (OSEO). A.I. is supported by a fellowship from the Ministère de l’Education and from the ARC. J-C.N. is supported by a grant from the INCa. H.D.P.S. is supported by grants from LIV-ES and the Contrat de Plan Etat Région (axe biothérapie).

Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HCA, hepatocellular adenoma; HNF1A, hepatocyte nuclear factor 1; CTNNB1, catenin (cadherin-associated protein) beta 1; AFP, alphafoetoprotein; TP53, tumor protein p53; PI4KA, phosphatidylinositol 4-kinase type III α ; PtdIns, phosphatidylinositol; PLC, phospholipase C; RT, reverse transcriptase; PCR, polymerase chain reaction; ALB, albumin; ALDOB, aldolase b; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; MKI67, antigen identified by monoclonal antibody Ki-67.

Abbreviated title: Expression of PI4KA in hepatocellular carcinoma

Keywords: Hepatocellular carcinoma, PI4KA, biomarker, prognosis

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) remains a frightful disease characterized by a high rate of recurrence and death even after surgical resection. Molecular characterization of HCC will help to refine prognostic and will eventually provide therapeutic improvements. Phosphatidylinositol 4-kinases have newly emerged as factors associated to cancers. In addition, phosphatidylinositol 4-kinase type III α (PI4KA) is necessary for the propagation of the hepatitis C virus, a major HCC etiological factor. In investigating a collection of liver tissues issued from a cohort of 344 patients, we identified a significant increase in the amount of PI4KA transcript in HCC. We also showed that PI4KA over-expression was associated with a poor differentiation and an active proliferation rate in HCC. This association was confirmed in *in vitro* models by modulating the proliferative and differentiation state of human liver cell lines. Moreover, patients with HCC who underwent curative surgical resection, high PI4KA mRNA expression in tumors was associated with tumor recurrence (median time: 20 months versus 49 months, $P = 0.001$) and short disease-specific survival (first quartile time: 16 months versus 48 months, $P = 0.0004$). Multivariate analysis showed that PI4KA mRNA expression was an independent prognostic marker of HCC (hazard ratio = 2.36, $P = 0.006$). The use of PI4KA as a new molecular marker could improve already established prognostic models and could lead to the development of new therapeutic approaches.

INTRODUCTION

Liver cancer is the third leading cause of deaths by cancer worldwide, while they are the sixth most commonly encountered malignancies [1] and hepatocellular carcinoma (HCC) represents the most frequent primary cancer of the liver (70-80%). In western countries, HCC develop mainly on cirrhotic background related to chronic alcohol intake, chronic hepatitis B

1
2
3 virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections [2]. HCC rarely arise on normal liver and
4
5 sometimes it is caused by a malignant transformation of an hepatocellular adenoma (HCA).
6
7 HCA are benign hepatocellular tumors develop mostly on otherwise normal liver in women
8
9 taking oral contraception [3]. These last years, a genotype/phenotype classification identified
10
11 four different molecular subgroups of HCA: *HNFI1A* mutated, inflammatory, *CTNNB1*
12
13 mutated and unclassified. The *CTNNB1* mutated subgroup displays a high risk of malignant
14
15 transformation in HCC [4,5]. In the field of HCC, several transcriptomic classifications have
16
17 underlined the huge genetic and phenotypic heterogeneity of this tumor type [6]. One of these
18
19 classifications has identified six molecular subgroups (G1 to G6) closely related with clinical
20
21 and pathological features [7]. Further genotype/phenotype analyses revealed that well-
22
23 differentiated tumors with cholestasis were typically mutated for *CTNNB1* and classified in
24
25 the G5-G6 subgroups. In contrast, poorly differentiated HCC are more frequently mutated for
26
27 TP53, with high level of alphafoetoprotein (AFP) and classified in the G1-G3 transcriptomic
28
29 subgroups, a proliferative subtype. However, the mechanisms underlying the molecular and
30
31 phenotypic differences in HCC remain to be deciphered.
32
33
34
35
36
37

38
39 Recently in the liver pathology field, the scientific community is interested in the
40
41 phosphatidylinositol 4-kinase type III α (PI4KA). Indeed, we and others have shown that this
42
43 enzyme is required for the propagation of the Hepatitis C virus (HCV), one of the main
44
45 etiological factors of HCC [8-12]. Four distinct phosphatidylinositol 4-kinases (PI4Ks) are
46
47 expressed in human cells [13]. These isoenzymes (PI4KA, PI4KB, PI4K2A and PI4K2B)
48
49 catalyze the phosphorylation of phosphatidylinositol (PtdIns) localized in cytoplasmatic
50
51 membranous leaflet, leading to the production of phosphatidylinositol 4-phosphate
52
53 (PtdIns4P). Each isozyme displays a specific subcellular distribution. Thus, PI4KA is mainly
54
55 expressed at the endoplasmic reticulum (ER). Its activity seems to regulate both the formation
56
57
58
59
60

1
2
3 of ER exit sites [14,15] and the PtdIns4P level in the plasma membrane [16]. This PtdIns4P
4 serves as a precursor of other phosphoinositides generated by additional phosphorylation(s),
5
6
7 which are involved in a wide range of cellular functions [17]. Among them, cell migration and
8
9 proliferation are controlled by PI dependent signalling pathways implying phospholipase C
10
11 (PLC) isozymes or phosphoinositide 3-kinases. Therefore, it is consistent that several types of
12
13 deregulation in these signalling pathways, including those affecting PI4Ks, are detected in
14
15 some cancer [18].
16
17
18
19

20
21 Molecular characterization of HCC can serve as diagnostic and prognostic tool but it can also
22
23 be used to adapt therapies. Moreover, the central roles played by PI4KA during the HCV life
24
25 cycle have led to consider it as a potential therapeutic target. In this context, because the
26
27 potential treatment could be affected by the level of PI4KA expression, it appears interesting
28
29 to analyze the level of PI4KA expression in different types of liver diseases. To achieve a
30
31 large-scale approach, and because suitable antibodies for the detection of the endogenous
32
33 protein by immunohistochemistry is lacking, we analysed the level of PI4KA mRNA
34
35 expression by quantitative real time PCR in large cohort of liver tumors. An overexpression of
36
37 PI4KA in hepatocellular carcinoma was found when compared to normal liver and to benign
38
39 tumors. In HCC, PI4KA higher expression was related to poor differentiation and to bad
40
41 prognosis.
42
43
44
45
46

47 **MATERIALS AND METHODS**

51 **Biological materials**

52
53 All patients have given their written consent according to the French law. This study was
54
55 approved by our local IRB committees. Liver tissues were collected in French hospitals and
56
57
58
59
60

1
2
3 immediately frozen in nitrogen after surgical resection. The first cohort composed of 344 liver
4
5 tissues included 217 HCC, 101 HCA and 21 cirrhosis. Molecular subtypes of HCA (see table
6
7 S1 for clinical and molecular features) were determined according to previous molecular
8
9 classification using gene mutation and immunohistochemistry staining [3-5]. HCC included in
10
11 this study has been already extensively described [19]. We summarized the main clinical,
12
13 pathological and molecular features of the 217 HCC in table S2. All HCC were screened for
14
15 *TP53* and *CTNNB1* mutations and classified using our G1-G6 molecular classification as
16
17 previously described [7,20]. The second cohort consisted of liver fragments issued from 31
18
19 patients undergoing surgical resection for hepatic metastases of colorectal cancer. These
20
21 fragments were taken in macroscopically normal liver.
22
23

24
25 Huh-7.5.1 and HepaRG cell cultures were maintained as previously described [21,22]. See the
26
27 supplemental experimental procedures for detailed information on the differentiation
28
29 protocols.
30
31

32 33 34 **Quantitative RT-PCR and microarray analysis**

35
36
37
38 DNA and RNA were purified with commercial kits (Qiagen). Quantitative RT-PCR was
39
40 performed, as previously described [23]. Primer sequences could be obtained on request. A
41
42 TaqMan gene expression assay (hs01021084m1, Applied Biosystems) was chosen to analyze
43
44 PI4KA expression to avoid amplification of the pseudogene products. Microarray data (60
45
46 HCC and 6 normal livers) have been previously extensively described [7] and are available on
47
48 public database (E-TABM-36).
49
50

51 52 53 54 55 **Statistic**

56
57 Statistical analyses are detailed in the supplemental experimental procedures.
58
59
60

RESULTS AND DISCUSSION

A liver tissue collection of 344 characterized samples was exploited in order to compare the level of expression of PI4KA transcript in normal and different pathological hepatic tissues (Fig. 1A). No significant difference was identified between normal and cirrhosis samples. Compared to normal liver, the average expression level found in HCA was slightly increased ($P=0.0235$; 1.4-fold). This prompted us to analyse the putative variations between the different HCA subgroups classified according to their specific pathomolecular signature (Fig. 1B) [3-5]. It turned out that a significant larger amount of PI4KA mRNA was uncovered in HCA with inactivated for *HNFI1A*, which encodes the hepatocyte nuclear factor 1-alpha. Interestingly, this transcription factor is known to play an important role in hepatocyte differentiation [24].

Besides, a greater increase in the level of PI4KA transcript was observed in HCC (Fig. 1A). The mean expression level was 2.1 fold higher in HCC than in normal specimens ($P=0.0023$). However, PI4KA level of expression was similar in HCC developed in patients chronically infected or not with HCV (data not shown). This was consistent with the fact that HCV promotes its replication by stimulating the activity of PI4KA but not its expression [25]. In contrast to HCA, the increase of PI4KA in HCC expression could not be explained by *HNFI1A* mutations because the frequency of these mutations was low in our HCC series (<4 %) [26]. Then, we searched for relationship between tumor differentiation and PI4KA mRNA expression in HCC. HCC tumors exhibiting a poor differentiation (Edmondson grade III-IV) showed a higher PI4KA expression when compared to well-differentiated tumors (Edmondson grades I-II, Fig. 1C).

1
2
3 To further study the link between hepatic differentiation and PI4KA mRNA level, we
4 exploited two HCC derived cell lines (Huh-7.5.1 derived from Huh-7 [21]; and HepaRG)
5 whose differentiation state can be modulated *in vitro* [22,27]. We compare the PI4KA mRNA
6 absolute amounts present in Huh-7.5.1, HepaRG and normal liver tissue. Normal human
7 hepatic specimens, issued from a cohort different from that used in the first analysis
8 (presented in Fig. 1), contained an average of 121.71 ± 28.59 copies/ng cDNA (Mean \pm SD),
9 while HepaRG and Huh-7.5.1 cells, both at proliferative stage, had respectively 3.4-fold and
10 7.2-fold more PI4KA transcripts (Fig. 2A). These data were therefore consistent with the
11 observations made above on the detection of a larger amount of PI4KA transcripts in HCC
12 from which these cell lines derived and in the less differentiated cell line, the Huh-7.5.1. By
13 applying their specific differentiation procedures, both cell lines gradually acquired a more
14 differentiated hepatocyte state as evidenced by the up-regulation of the liver-specific *ALDOB*
15 and *ALB* genes, which respectively encodes aldolase B and albumin. By contrast, the PI4KA
16 transcripts levels gradually decreased during differentiation (Fig. 2 B and C, top panels).
17 Spearman rank analysis showed that, in Huh-7.5.1 and HepaRG cells, PI4KA mRNA
18 expression was actually negatively correlated to those of *ALDOB* and *ALB* (Fig. 2B and C,
19 bottom panels). Given that the differentiated state of both cell lines is clearly associated with a
20 decline in proliferative activity [27,28], our data showed that an increase in the number of
21 PI4KA transcripts correlates with hepatic dedifferentiation and active proliferation.
22

23
24 Similarly, high mitotic activity and proliferation rate are also frequently associated with poor
25 differentiation in cancer. In this way, we investigated the link between PI4KA expression and
26 two usual markers of cell proliferation (proliferating cell nuclear antigen PCNA and MKI67)
27 in a series of 60 HCC and 6 normal liver tissues analysed using HG-U133A Affymetrix
28 GeneChip™ microarray. PI4KA expression was correlated with PCNA and MKI67
29 expression in HCC (Fig. 3A and B). Moreover, level of PI4KA was higher in HCC classified
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 in G1-G3 subgroup than in HCC classified in G4-G6 subgroup (Fig. 3B). G1-G3 subgroups
4
5 are known as the proliferative subclasses because they harboured transcriptomic dysregulation
6
7 of cell cycle genes [7,29]. This subgroup is also classically enriched in HCC mutated for
8
9 *TP53* and with high level of serum AFP, two factors which correlated with higher expression
10
11 level of PI4KA (Fig. S1 and S2). Altogether, *in vivo* and *in vitro* data sets were consistent and
12
13 support the hypothesis that the quantity of PI4KA transcripts is correlated with the
14
15 differentiation status and the proliferation rate of tumors.
16

17
18 While PI4K2A has been shown to be up-regulated in at least seven types of human cancer
19
20 [30], our work reports for the first time an increased PI4KA expression in a human carcinoma.
21
22 Mechanism of this up-regulation in HCC remains to be determined. However, studies suggest
23
24 that PI4KA may regulate signalling pathways involved in survival and proliferation [18].
25
26
27
28

29
30 Since the clinical outcomes of our HCC library includes survival and recurrence data, we
31
32 cross-checked them with PI4KA mRNA expression levels. The 214 HCC samples were
33
34 subdivided into low and high PI4KA expression groups, stratified by the median value.
35
36 Analysis of the correlation between PI4KA expression level and the prognosis of patients with
37
38 HCC demonstrated that tumors with high expression level of PI4KA presented a shorter
39
40 disease-specific survival (first quartile time to tumor related death: 16 months in HCC with
41
42 high level of PI4KA versus 48 months in HCC with low level of PI4KA, $p = 0.0004$, Fig.
43
44 4A). Similar results were obtained for the risk of tumour recurrence. Medians time to tumor
45
46 recurrence were 20 months for patients with high PI4KA expression level and 49 months for
47
48 the others patients ($p = 0.001$, Fig. 4B). Importantly, in multivariate analysis, high level of
49
50 PI4KA was associated with disease specific survival (HR: 2.36 (1.27; 4.36) $P=0.006415$)
51
52 independently of classical clinical, biological and pathological features as size, number of
53
54 tumors, microvascular invasion and tumor portal thrombosis (Table 1). Interestingly, such a
55
56
57
58
59
60

1
2
3 link between PI4KA up-regulation and poor-prognostic has been suggested by works carried
4
5 out on the comparison of cancer cell lines derived from hamster pancreas. PI4KA was indeed
6
7 more expressed in the most aggressive cell line [31]. PI4KA could therefore serve as a
8
9 prognostic marker in addition to those already identified in order to improve the accuracy of
10
11 existing prediction models [19]. Now, further investigations remain to be conducted to
12
13 unravel the role of this phospholipid kinase in HCC and whether it could be targeted for
14
15 therapy.
16

17
18 In conclusion, our study clearly shows that higher levels of PI4KA transcripts are detected in
19
20 HCC and that this increase is correlated to their differentiation/proliferation status and
21
22 associated to poor survival in patients with HCC.
23

24 25 26 27 **ACKNOWLEDGMENTS**

28
29 We thank Dr. Francis Chisari (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) for the Huh-
30
31 7.5.1 cells and the Biological Resource Centre of Rennes for providing the normal human
32
33 liver specimens.
34
35

36 37 38 39 40 **REFERENCES**

- 41 1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of
42 cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127(12):2893-2917.
- 43 2. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012;379(9822):1245-1255.
- 44 3. Nault JC, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Hepatocellular Benign Tumors-From Molecular
45 Classification to Personalized Clinical Care. *Gastroenterology* 2013.
- 46 4. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular
47 adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* 2006;43(3):515-524.
- 48 5. Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C et al. Hepatocellular adenoma subtype classification
49 using molecular markers and immunohistochemistry. *Hepatology* 2007;46(3):740-748.
- 50 6. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular
51 classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin
52 Liver Dis* 2010;30(1):35-51.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
- 2
- 3 7. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A et al. Transcriptome classification of HCC is related to
- 4 gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45(1):42-52.
- 5 8. Berger KL, Cooper JD, Heaton NS et al. Roles for endocytic trafficking and
- 6 phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- 7 2009;106(18):7577-7582.
- 8 9. Borawski J, Troke P, Puyang X et al. Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are
- 9 novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* 2009;83(19):10058-10074.
- 10 10. Tai AW, Benita Y, Peng LF et al. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of
- 11 hepatitis C virus replication. *Cell host & microbe* 2009;5(3):298-307.
- 12 11. Trotard M, Lepere-Douard C, Regnard M et al. Kinases required in hepatitis C virus entry and
- 13 replication highlighted by small interference RNA screening. *Faseb J* 2009;23(11):3780-3789.
- 14 12. Vaillancourt FH, Pilote L, Cartier M et al. Identification of a lipid kinase as a host factor
- 15 involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 2009;387(1):5-10.
- 16 13. Minogue S, Waugh MG. The Phosphatidylinositol 4-Kinases: Don't Call it a Comeback. *Subcell*
- 17 *Biochem* 2012;58:1-24.
- 18 14. Blumental-Perry A, Haney CJ, Weixel KM, Watkins SC, Weisz OA, Aridor M.
- 19 Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Developmental cell*
- 20 2006;11(5):671-682.
- 21 15. Farhan H, Weiss M, Tani K, Kaufman RJ, Hauri HP. Adaptation of endoplasmic reticulum exit
- 22 sites to acute and chronic increases in cargo load. *Embo J* 2008;27(15):2043-2054.
- 23 16. Balla A, Kim YJ, Varnai P et al. Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in
- 24 the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Molecular biology of*
- 25 *the cell* 2008;19(2):711-721.
- 26 17. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*
- 27 2006;443(7112):651-657.
- 28 18. Waugh MG. Phosphatidylinositol 4-kinases, phosphatidylinositol 4-phosphate and cancer. *Cancer Lett*
- 29 2012;325(2):125-131.
- 30 19. Nault JC, de Reynies A, Villanueva A et al. A Hepatocellular Carcinoma 5-Gene Score
- 31 Associated with Survival of Patients Following Liver Resection. *Gastroenterology* 2013.
- 32 20. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O et al. Genetic alterations associated with hepatocellular
- 33 carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*
- 34 2001;120(7):1763-1773.
- 35 21. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl*
- 36 *Acad Sci U S A* 2005;102(26):9294-9299.
- 37 22. Gripon P, Rumin S, Urban S et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.
- 38 *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(24):15655-15660.
- 39 23. Rebouissou S, Imbeaud S, Balabaud C et al. HNF1alpha inactivation promotes lipogenesis in
- 40 human hepatocellular adenoma independently of SREBP-1 and carbohydrate-response
- 41 element-binding protein (ChREBP) activation. *J Biol Chem* 2007;282(19):14437-14446.
- 42 24. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB et al. Control of pancreas and liver gene expression by
- 43 HNF transcription factors. *Science* 2004;303(5662):1378-1381.
- 44 25. Reiss S, Rebhan I, Backes P et al. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C
- 45 virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell host &*
- 46 *microbe* 2011;9(1):32-45.
- 47 26. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal
- 48 copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat*
- 49 *Genet* 2012;44(6):694-698.
- 50 27. Sainz B, Jr., Chisari FV. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated,
- 51 growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* 2006;80(20):10253-10257.
- 52 28. Parent R, Marion MJ, Furio L, Trepo C, Petit MA. Origin and characterization of a human
- 53 bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 2004;126(4):1147-1156.
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
29. Lee JS, Chu IS, Heo J et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004;40(3):667-676.
30. Li J, Lu Y, Zhang J, Kang H, Qin Z, Chen C. PI4KIIalpha is a novel regulator of tumor growth by its action on angiogenesis and HIF-1alpha regulation. *Oncogene* 2010;29(17):2550-2559.
31. Ishikawa S, Egami H, Kurizaki T et al. Identification of genes related to invasion and metastasis in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22(2):299-306.

For Peer Review

Table 1: univariate and multivariate analysis of clinical, pathological and molecular variables for disease specific survival in 214 HCC

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95 % CI	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>
Cirrhosis	1.45	0.90-2.31	0.119	-	-	-
Multiple tumors	1.952	1.09-3.49	0.024	3.53	1.83-6.81	0.000167
HCC > 5 cm	1.705	1.04-2.80	0.035	1.88	1.01-3.47	0.044943
AFP > 20 ng/ml	2.04	1.25-3.32	0.0043	1.58	0.90-2.76	0.107818
Microvascular invasion	2.98	1.86-4.78	5.83e-06	1.98	1.09-3.60	0.024328
Tumor portal thrombosis	3.59	2.14-6.01	1.21e-06	1.92	1.01-3.66	0.045599
Differentiation: Edmonson III/IV	1.60	1.01-2.52	0.0436	0.88	0.50-1.54	0.653579
PI4KA high level	2.22	1.39-3.54	0.000823	2.36	1.27-4.36	0.006415

Bold values represent *P* values considered as statistically significant at <0.05

HR: hazard ratio; CI: confidence interval

FIGURE LEGENDS**Fig. 1: Expression levels of PI4KA transcript in different subtypes of human liver samples.**

Scatter graphs show the mRNA expression of PI4KA measured by real time PCR in characterized human liver tissues. All values represent the gene expression of each sample (S) relative to the mean of 2 controls (C) issued from normal tissues. The 18S RNA levels were used for normalization. Means with their respective standard deviation are indicated for each sample categories. *P* values from a Mann-Whitney U-test (two groups, panel C) or Kruskal-Wallis (more than two groups, panels A and B) are indicated (*ns*: not significant). (A) Comparison between normal (n = 5) and different pathological hepatic tissues including cirrhosis (n = 21), benign (HCA, n = 101) and malignant (HCC, n = 217) hepatocellular tumors. (B) Expression in different hepatocellular adenoma (HCA) groups subdivided into adenomas inactivated for HNF1A (n = 27), inflammatory adenomas (n = 44), β -Catenin activated adenomas (n = 10), inflammatory and β -Catenin activated adenomas (n = 13) and unclassified adenomas (n = 7). (C) Expression compared according to the differentiation grade of HCC sorted from the Edmonson classification (Grades I-II, n= 118; Grades III-IV, n = 88).

Fig. 2: Regulation in *in vitro* models of the PI4KA mRNA expression levels by the hepatic differentiation state.

Determination by real time PCR of copy numbers of PI4KA transcripts in sub-confluent cultures of Huh-7.5.1 (n = 3) or HepaRG (n = 3) and in normal human liver tissues (n = 31)

1
2
3 (A). *P* values from a Mann-Whitney U-test are indicated. Huh-7.5.1 (B) and HepaRG (C) cell
4
5 lines were subjected to specific differentiation protocols over several days (see details in
6
7 supplemental experimental procedures). Expression levels of PI4KA and hepato-specific
8
9 (albumin and aldolase b) transcripts were measured at the different indicated time points by a
10
11 real time PCR approach in 3 independent experiments. Results are expressed in relative
12
13 amounts to those measured for their respective first time points. The mRNA levels of the
14
15 succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA) were used for normalization. The top
16
17 panels show the comparative expression of PI4KA and albumin. The bottom panels present
18
19 the correlations between PI4KA and albumin or aldolase B expression levels. Spearman's
20
21 rank order coefficients and *P* values are indicated at the upper part of graphs.
22
23
24
25
26
27
28

29 **Fig. 3: Correlation between PI4KA expression level, proliferative markers and**
30 **molecular status of HCC**
31
32

33
34 Correlation between PI4KA expression level and PCNA and MKI67 expression level was
35
36 performed in 60 HCC and 6 normal liver tissues analysed using HG-U133A Affymetrix
37
38 GeneChip™ microarray. Pearson's rank order coefficients and *P* values are indicated (A).
39
40 Scatter graphs show the PI4KA mRNA expression measured by real time PCR in HCC
41
42 specimens which was stratified according to transcriptomic classification (G1-G3, n= 58; G4-
43
44 G6, n = 149). All values represent the gene expression of each sample (S) relative to the mean
45
46 of 2 controls (C) issued from normal tissues. The 18S RNA levels were used for
47
48 normalization. Means with their respective standard deviation are indicated for each sample
49
50 categories. *P* value from a Mann-Whitney U-test is indicated.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Fig. 4: Mantel-Cox survival curves.**
4

5
6 Kaplan Meier method and Log-Rank test were applied to 214 patients with HCC
7
8 dichotomized by the median expression value of PI4KA (low- or high-levels of PI4KA
9
10 mRNA expression). Left and right panels respectively present the disease-specific survival
11
12 (tumor related death) and the tumor recurrence free survival. Calculated *P* values are
13
14 indicated on graphs. Numbers at risk are indicated below each panel.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental experimental procedures

Differentiation procedures of cell lines

Huh-7.5.1 cells were seeded at a density of 6×10^4 per cm^2 in the regular medium consisting in complete DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 2 mM L-glutamine (Life Technologies), 10 mM HEPES, nonessential amino acid (Sigma-Aldrich) and 10% heat inactivated fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA). When the culture reached 95% confluence, this time point was defined as day 0 (D0). Then the regular culture medium was supplemented with 1% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) for 6 consecutive days. Cells were collected at days 0, 1, 3 and 6 (D0, D1, D3 and D6, respectively).

HepaRG cells were seeded at a density of 2.7×10^4 per cm^2 at day 0 and maintained for two weeks in a William's E medium supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 50 μM hydrocortisone hemisuccinate and 10% fetal bovine serum. Then, the culture medium was or not supplemented with 2% DMSO for two additional weeks. Cells were collected at days 4, 15 and 30 post-seeding (D4, D15 and D30, respectively). D30- and D30+ indicate that cells were respectively cultured either without DMSO for 30 days or without DMSO during the first 15 days and then with 2% DMSO the last 15 days.

Statistical analysis

Continuous data were compared using non parametric Mann-Whitney Test (two groups) or Kruskal-Wallis Test (more than two groups). Correlation analysis was performed using Spearman or Pearson test according to sample size. We used Mantel Cox log rank test and

1
2
3 Kaplan Meier method to assess post resection survival. Disease specific survival is defined by
4 the tumor related death and patients who died of another etiology were censored. The
5 recurrence-free survival was defined as the length of time after hepatectomy for HCC during
6 which a patient survives with no sign of HCC. The last follow-up recorded visit was in
7 February 2011. Univariate analysis using Cox model was performed to determine variable
8 associated with disease specific survival. Variables with a P value < 0.05 in the univariate
9 analysis were entered into a Cox multivariate model. P value < 0.05 was considered as
10 significant. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism and R statistical
11 software (<http://www.R-project.org/>).
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table S1: clinical and molecular features of hepatocellular adenomas

Parameters	Hepatocellular adenomas (n = 101)
Mean age ± SD	36 ± 10
Female	82% (83)
<i>HNF1A</i> mutations	27% (27)
Inflammatory HCA	44% (44)
<i>CTNNB1</i> mutations	10% (10)
Inflammatory + <i>CTNNB1</i> mutations	13% (13)
Non classified HCA	6% (7)

(): number of cases

For Peer Review

Table S2: characteristics of 217 patients with hepatocellular carcinoma

Variable		Total (n= 217)	
Age	>60 years	59%	(128)
Gender	Male	79%	(173)
Etiology	HCV	20%	(43)
	HBV	21%	(46)
	Alcohol	36%	(79)
	Hemochromatosis	9%	(19)
Tumor size	< 5 cm	37%	(81)
Tumor number	Single	87%	(189)
Vascular invasion	Microvascular	41%	(88)
	Macrovascular	12%	(26)
Differentiation	Edmonson I-II	57%	(118)
	Edmonson III-IV	43%	(88)
Metavir score (non tumor liver)	F0-F1	40%	(87)
	F2-F3	28%	(60)
	F4	31%	(68)
Preoperative AFP	> 20 ng/ml	42%	(92)
Child Pugh	A	96%	(203)
	B	4%	(9)
G1-G6 Classification*	G1	9%	(18)
	G2	7%	(14)
	G3	13%	(26)
	G4	36%	(76)
	G5	22%	(45)
	G6	13%	(28)
<i>CTNNB1</i>	Mutated	31%	(68)
<i>TP53</i>	Mutated	18%	(40)
Events	Median follow up (months) †	45 (18-60)	
	Tumor death < 5 years	36%	(78)
	Overall recurrence <5 years	57%	(122)

(): number of cases

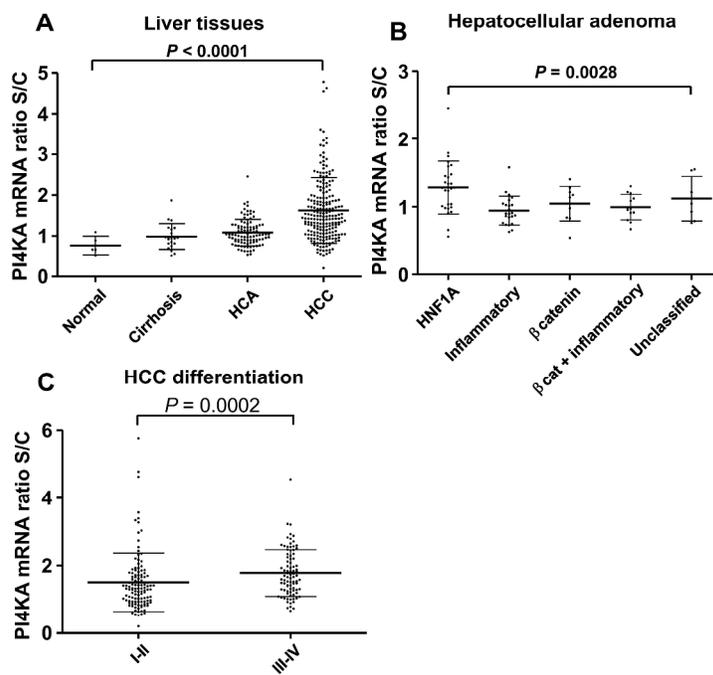
* G1-G6 molecular classification [7] was available for 207 HCC

† median (25th and 75th percentile). 214 HCC among 217 have available follow-up for survival analysis.

1
2
3
4 **Fig. 1S: Correlation between PI4KA expression level, proliferative markers and**
5
6 **molecular status of HCC**
7
8

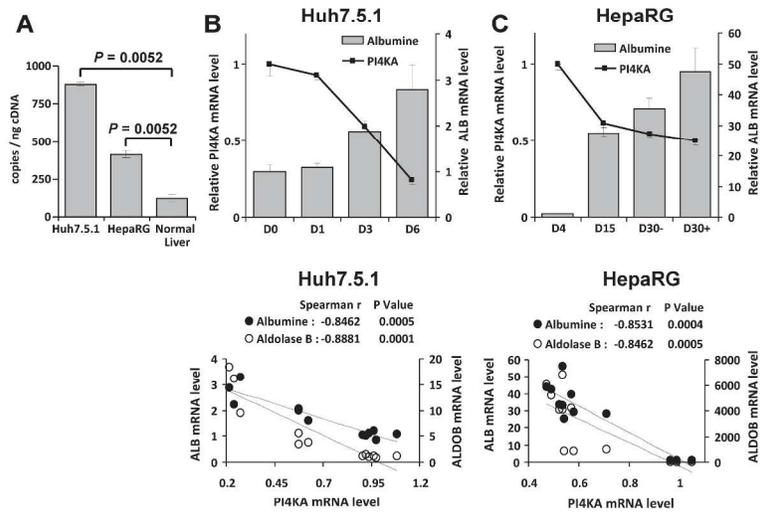
9 Scatter graphs show the mRNA expression of PI4KA measured by real time PCR in HCC
10 samples. All values represent the gene expression of each sample (S) relative to the mean of 2
11 controls (C) issued from normal tissues. The 18S RNA levels were used for normalization.
12 Means with their respective standard deviation are shown for each sample categories. *P*
13 values from a Mann-Whitney U-test are indicated. Expression compared according to *TP53*
14 mutation status (NM: not mutated, n = 175; M: mutated, n= 40) (A) or to serum AFP level
15 (AFP < 20ng/ml, n= 109; AFP > 20ng/ml, n= 85) (B).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1



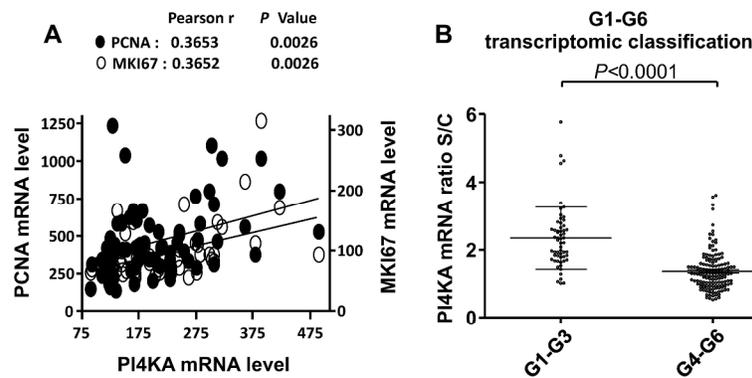
297x420mm (300 x 300 DPI)

Figure 2



297x420mm (300 x 300 DPI)

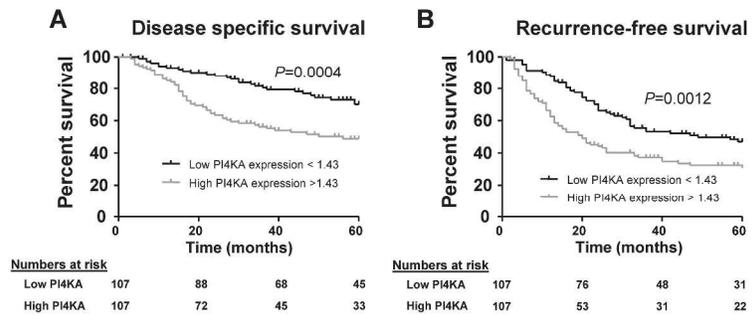
Figure 3



297x420mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

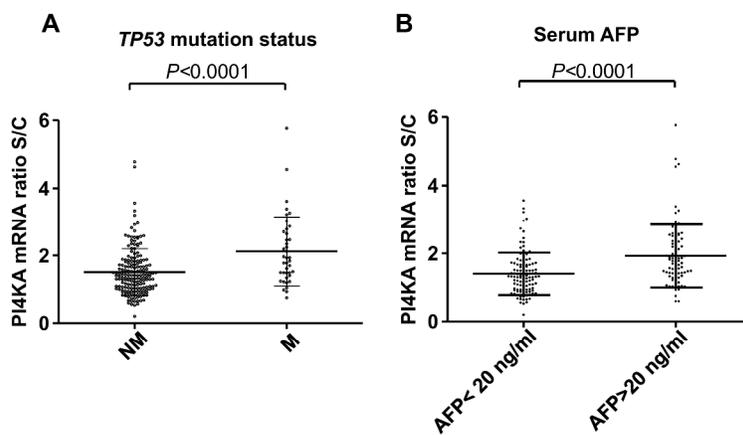
Figure 4



297x420mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure S1



297x420mm (300 x 300 DPI)

*Conclusions
générales et
perspectives*

« C'est au bout de la vieille corde qu'on tisse la nouvelle. »

Proverbe africain

Le principal objectif de mon travail de thèse était d'étudier l'éventuelle implication des PI4KIII α au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires, cibles naturelles du virus. Contrairement aux lignées hépatiques utilisées jusqu'ici, ces cellules présentent à la fois un état de différenciation hépatique plus proche de l'*in vivo* et une polarisation bien établie. Les approches chimiques et génétiques incitent à penser que PI4KIII β ne serait pas impliquée au cours de l'entrée virale. Par contre, ces mêmes approches suggèrent que l'activité enzymatique de PI4KIII α serait requise lors de l'étape d'entrée du virus dans les hépatocytes humains primaires. Cependant, des données expérimentales complémentaires sont nécessaires pour conclure définitivement sur sa réelle implication. Ainsi, la protection des cellules à l'infection par le VHCpp, induite par l'extinction partielle du gène *PI4KIII α* devra être restaurée par l'expression efficace d'une PI4KIII α exogène. Cette expérience est indispensable pour prouver que ce phénotype de protection est bien spécifique de la baisse d'expression de PI4KIII α .

Afin de palier aux problèmes d'expression efficace d'une PI4KIII α exogène active, différentes solutions sont envisageables. L'utilisation d'un autre vecteur viral, tel que l'adénovirus devrait permettre une meilleure expression. En effet, ces vecteurs assurent des niveaux d'expression élevés du transgène, et peuvent être produits avec des titres plus importants, évitant ainsi le recours aux multiples transductions. Une expérience pilote a déjà été menée au laboratoire, à l'aide d'un adénovirus comportant dans son génome le gène rapporteur codant pour la GFP. Ce virus a transduit de façon très efficace nos cultures primaires d'hépatocytes humains. Cependant, le coût élevé de production de ces adénovirus nous amènerait à envisager d'autres alternatives. Ainsi, en exploitant toujours les lentivirus, on pourrait tester une forme tronquée en N-terminale de PI4KIII α (Δ 1-872), de 130 kDa et qui conserve son activité kinase *in vitro*, contrairement à l'isoforme de 92 kDa (Heilmeyer *et al.*, 2003; Szentpetery *et al.*, 2011). La réduction de la taille du vecteur de transfert qui sera alors utilisé pour produire ces nouveaux lentivirus devrait permettre d'obtenir de meilleurs titres viraux, et peut-être une meilleure expression de la protéine. En outre, il faut noter que ce type de stratégie de restauration par transduction lentivirale a été utilisé avec succès pour confirmer l'implication de l'EGF-R au cours de l'infection d'hépatocytes humains primaires par le VHCpp (Lupberger *et al.*, 2011).

Ces données pourraient également être complétées par l'utilisation d'autres inhibiteurs chimiques partiellement sélectifs, récemment décrits. La firme pharmaceutique Boehringer Ingelheim a ainsi développé deux composés nommés A et B qui présentent une sélectivité

entre 15 et 20 fois supérieure pour PI4KIII α , par rapport à PI4KIII β . Enfin, une autre approche complémentaire consisterait à dépléter la cellule en PI4P, le produit des PI4KIII, grâce à la surexpression exogène de la phosphatase Sac1, dont l'ADNc ne mesure que 1763 pb et qui catalyse la déphosphorylation du PI4P en PtdIns (Roy & Levine, 2004). Cette stratégie a été utilisée avec succès dans des travaux démontrant que PI4KIII β était indispensable à l'entrée du SARS-CoV dans sa cellule cible (Yang *et al.*, 2012).

Mais déjà, on peut se poser la question de savoir comment PI4KIII α influencerait l'entrée du VHC. Une interaction directe avec le VHC au cours de l'entrée semble impossible car cette kinase est cytosolique. Mais le fait que Nakatsu *et al.* aient récemment montré que PI4KIII α pouvait être localisée à la face cytosolique de la membrane plasmique suggère qu'elle pourrait intervenir avant l'endocytose de la particule virale. La détermination de son éventuelle colocalisation avec les différents facteurs d'entrée déjà identifiés pourrait être informative. Il serait également intéressant d'évaluer son éventuelle contribution à la relocalisation de CD81 vers la Claudine-1, phénomène qui met en jeu les récepteurs à activité tyrosine kinase EGF-R et EphA2 (Lupberger *et al.*, 2011), mais aussi la GTPase HRas (Zona *et al.*, 2013). Or, une étude suggère que l'activation de l'EGF-R requiert le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PI(4,5)P₂), phosphoinositide dérivant du PI4P de la membrane plasmique produit par PI4KIII α (Balla *et al.*, 2005; Michailidis *et al.*, 2011).

Dans la suite des perspectives, il sera aussi pertinent d'évaluer l'importance des PI4KIII au cours de la réplication du VHC dans les hépatocytes humains primaires, car jusqu'à présent, toutes les études ayant fait cas du rôle de PI4KIII α et PI4KIII β dans la réplication du VHC ont été réalisées sur des lignées hépatiques. Cela s'explique en partie par la difficulté d'infecter les hépatocytes humains primaires avec du VHCcc. A ce jour, peu d'équipes l'ont réalisé (Lupberger *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2008; Podevin *et al.*, 2010). Cette difficulté pourrait être surmontée par l'utilisation de l'isolat Jc1 au lieu du J6/JFH1 qui, entre nos mains n'a pas permis d'initier une infection productive dans nos cultures primaires d'hépatocytes humains. En 2011, une étude a suggéré que la réponse IFN cellulaire jouait un rôle important dans la limitation de la propagation de l'infection par le VHC dans des cultures d'hépatocytes primaires. Les stratégies visant à endiguer cette réponse IFN pourraient être la clé pour le développement de systèmes de culture du VHC robustes, permettant des études de pathogénicité et des mécanismes par lesquels le VHC se propage dans sa cible naturelle (Andrus *et al.*, 2011).

L'importance de PI4KIII α au cours de la réplication du VHC dans des lignées hépatiques a fait l'objet de plusieurs publications. Son rôle a été déchiffré (Berger *et al.*, 2011; Lim & Hwang, 2011; Reiss *et al.*, 2011; Tai & Salloum, 2011). Si son implication au cours de l'entrée et la réplication virale dans les hépatocytes humains primaires venait à être confirmée, cela constituerait un argument supplémentaire dans le cadre de la recherche de nouvelles thérapies contre l'hépatite C. En effet, trouver une cible cellulaire qui influe sur l'entrée et la réplication du virus est particulièrement intéressant dans le cadre d'une greffe de foie, où un blocage efficace de l'entrée virale pourrait aider à prévenir la réinfection du greffon après une transplantation hépatique. Toutefois, envisager PI4KIII α comme une cible thérapeutique potentielle nécessitera des travaux supplémentaires pour mieux comprendre son rôle. En 2012, une étude a montré un effet létal avec une atteinte du tractus gastro-intestinal chez des souris présentant une invalidation conditionnelle du gène *PI4KIII α* . Le même phénotype était également développé par des souris surexprimant de façon conditionnelle la forme inactive de PI4KIII α , démontrant ainsi que l'activité kinase de PI4KIII α est essentielle à l'organisme. L'altération des voies gastro-intestinales suggère que PI4KIII α pourrait jouer un rôle important dans le renouvellement du tissu intestinal et potentiellement dans la division cellulaire, car les cellules intestinales sont renouvelées tous les 3-5 jours chez la souris. PI4KIII α pourrait donc agir directement sur le pool global des cellules souches, et dans la génération des cellules filles ou une différenciation et division ultérieures (Vaillancourt *et al.*, 2012). En accord avec cette hypothèse, une réduction du niveau d'expression de PI4KIII α au cours du développement du poisson zèbre conduit à un déséquilibre entre la prolifération et l'apoptose (Ma *et al.*, 2009). Ces rôles physiologiques essentiels pour l'hôte imposeront l'utilisation de stratégies thérapeutiques adaptées pour exploiter cette dépendance du VHC vis-à-vis de PI4KIII α , dans le traitement contre le VHC.

Les nombreux effets secondaires associés à l'injection d'IFN dans la thérapie actuellement utilisée chez les patients infectés par le VHC, amènent les chercheurs et les cliniciens à tenter de développer une multi-thérapie exempte d'IFN. Pour compléter l'attirail des molécules candidates, comportant principalement des inhibiteurs de facteurs viraux tels que la polymérase NS5B ou la protéase NS3A, il serait sans doute intéressant d'y ajouter des molécules ciblant des facteurs de l'hôte qui sont indispensables à la propagation du VHC. En effet, en raison de la grande plasticité génétique du VHC, des virus résistants émergent rapidement lors de l'utilisation de médicaments ciblant un facteur viral. Une meilleure barrière de résistance est théoriquement obtenue avec des drogues ciblant des facteurs de

l'hôte. La firme Novartis a ainsi développé des inhibiteurs de PI4KIII β qui, utilisés sur des réplicons n'ont permis qu'une lente sélection de virus résistants peu efficaces (Lamarche *et al.*, 2012). Cependant, l'idée qu'une telle approche orientée vers l'hôte puisse prévenir l'apparition de mutants devenus indépendants du facteur ciblé de l'hôte est illusoire. Ainsi, deux exemples viennent illustrer ce point. Le 1^{er} a été rapporté par Coelmont et ses collaborateurs en 2010 qui ont isolé un mutant du VHC comportant une mutation dans la protéine NS5A, qui lui conférait une résistance à l'alisporivir et à la cyclosporine A. Ces drogues inhibent les cyclophilines cellulaires qui modifient la protéine NS5A au cours du cycle viral. La mutation de résistance permettait à NS5A d'adopter une conformation qui n'était plus dépendante de l'activité d'isomérisation des cyclophilines, pour sa fonction (Coelmont *et al.*, 2010). Le 2nd exemple concerne le coxsackievirus B3 dont la réplication dépend de PI4KIII β . Une unique mutation dans la protéine non structurale 3A n'entravait pas le recrutement de PI4KIII β sur le site de réplication, mais permettait une réplication virale efficace, indépendante du PI4P produit par PI4KIII β (van der Schaar *et al.*, 2012).

Ces exemples de mutants démontrent que les virus peuvent acquérir une résistance à des composés qui ciblent les facteurs de l'hôte, qu'ils exploitent normalement pour leur propagation. Ces exemples révèlent ainsi la capacité du virus à utiliser des voies alternatives pour se répliquer efficacement dans un environnement sous pression de sélection imposée par des composés antiviraux. Ces données suggèrent qu'une combinaison de composés ciblant différents facteurs de l'hôte et du virus sera nécessaire pour développer une thérapie antivirale efficace, dépourvue d'IFN.

Références bibliographiques

« Aussi longtemps que les lions n'auront pas leur historien, les récits de chasse tourneront toujours à la gloire du chasseur. »

Proverbe africain

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. & Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518–520.
- Ahmed-Belkacem, A., Ahnou, N., Barbotte, L., Wychowski, C., Pallier, C., Brillet, R., Pohl, R.-T. & Pawlotsky, J.-M. (2010). Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology* **138**, 1112–1122.
- Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K. & other authors. (2008). Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* **82**, 5715–5724.
- Aizawa, Y., Shibamoto, Y., Takagi, I., Zeniya, M. & Toda, G. (2000). Analysis of factors affecting the appearance of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. A long term follow-up study after histologic diagnosis. *Cancer* **89**, 53–59.
- Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y. & Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **55**, 998–1007.
- Alter, H. J. & Seeff, L. B. (2000). Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* **20**, 17–35.
- Alter, M. J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **13**, 2436–2441.
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr, Zhu, L.-J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P. N., Maguire, M., Golovko, A. & other authors. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201–1204.
- Alvisi, G., Madan, V. & Bartenschlager, R. (2011). Hepatitis c virus and host cell lipids: An intimate connection. *RNA Biology* **8**, 258–269.
- Amako, Y., Sarkeshik, A., Hotta, H., Yates, J., 3rd & Siddiqui, A. (2009). Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* **83**, 9237–9246.
- Amako, Y., Syed, G. H. & Siddiqui, A. (2011). Protein kinase D negatively regulates hepatitis C virus secretion through phosphorylation of oxysterol-binding protein and ceramide transfer protein. *J Biol Chem* **286**, 11265–11274.
- Anand, N., Murthy, S., Amann, G., Wernick, M., Porter, L. A., Cukier, I. H., Collins, C., Gray, J. W., Diebold, J. & other authors. (2002). Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* **31**, 301–305.
- André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchet, C., Paranhos-Baccalà, G. & Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* **76**, 6919–6928.
- Andrus, L., Marukian, S., Jones, C. T., Catanese, M. T., Sheahan, T. P., Schoggins, J. W., Barry, W. T., Dustin, L. B., Trehan, K. & other authors. (2011). Expression of paramyxovirus V proteins promotes replication and spread of hepatitis C virus in cultures of primary human fetal liver cells. *Hepatology* **54**, 1901–1912.
- Antaki, N., Craxi, A., Kamal, S., Moucari, R., Van der Merwe, S., Haffar, S., Gadano, A., Zein, N., Lai, C. L. & other authors. (2010). The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int* **30**, 342–355.
- Appel, N., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2005). Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* **79**, 3187–3194.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2006). From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* **281**, 9833–9836.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. (2008). Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathog* **4**, e1000035.
- Arita, M., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., Wakita, T. & Shimizu, H. (2011). Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliiovirus activity. *J Virol* **85**, 2364–2372.

- Audhya, A. & Emr, S. D. (2002).** Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev Cell* **2**, 593–605.
- Bachmetov, L., Gal-Tanamy, M., Shapira, A., Vorobeychik, M., Giterman-Galam, T., Sathiyamoorthy, P., Golan-Goldhirsh, A., Benhar, I., Tur-Kaspa, R. & Zemel, R. (2012).** Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J Viral Hepat* **19**, e81–88.
- Balla, A. & Balla, T. (2006).** Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol* **16**, 351–361.
- Balla, A., Tuymetova, G., Tsiomenko, A., Várnai, P. & Balla, T. (2005).** A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1. *Mol Biol Cell* **16**, 1282–1295.
- Balla, A., Kim, Y. J., Varnai, P., Szentpetery, Z., Knight, Z., Shokat, K. M. & Balla, T. (2008).** Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol Biol Cell* **19**, 711–721.
- Balla, T. (1998).** Phosphatidylinositol 4-kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1436**, 69–85.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J. & other authors. (1997).** Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1200–1205.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H. & other authors. (2003).** Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **278**, 41003–41012.
- Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhardt, R. J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.-L., Patel, A. H., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2006).** Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* **80**, 10579–10590.
- Bartosch, B. & Dubuisson, J. (2010).** Recent advances in hepatitis C virus cell entry. *Viruses* **2**, 692–709.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. (2003a).** Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**, 633–642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. & Cosset, F.-L. (2003b).** Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* **278**, 41624–41630.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.-M., Lavillette, D. & Cosset, F.-L. (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**, 8217–8229.
- Barylko, B., Gerber, S. H., Binns, D. D., Grichine, N., Khvotchev, M., Südhof, T. C. & Albanesi, J. P. (2001).** A novel family of phosphatidylinositol 4-kinases conserved from yeast to humans. *J Biol Chem* **276**, 7705–7708.
- Barylko, B., Mao, Y. S., Wlodarski, P., Jung, G., Binns, D. D., Sun, H.-Q., Yin, H. L. & Albanesi, J. P. (2009).** Palmitoylation controls the catalytic activity and subcellular distribution of phosphatidylinositol 4-kinase II{alpha}. *J Biol Chem* **284**, 9994–10003.
- Beglova, N. & Blacklow, S. C. (2005).** The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem Sci* **30**, 309–317.
- Behrens, S. E., Tomei, L. & De Francesco, R. (1996).** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**, 12–22.

- Belov, G. A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C. L., Lippincott-Schwartz, J. & Ehrenfeld, E. (2007).** Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J Virol* **81**, 558–567.
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernández, A., Aldabe, R. & other authors. (2009).** The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* **83**, 8012–8020.
- Benhamou, Y., Afdhal, N. H., Nelson, D. R., Shiffman, M. L., Halliman, D. G., Heise, J., Chun, E. & Pockros, P. J. (2009).** A phase III study of the safety and efficacy of viremagine versus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C: ViSER1 results. *Hepatology* **50**, 717–726.
- Berger, K. L., Cooper, J. D., Heaton, N. S., Yoon, R., Oakland, T. E., Jordan, T. X., Mateu, G., Grakoui, A. & Randall, G. (2009).** Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 7577–7582.
- Berger, K. L., Kelly, S. M., Jordan, T. X., Tartell, M. A. & Randall, G. (2011).** Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J Virol* **85**, 8870–8883.
- Bianco, A., Reghellin, V., Donnici, L., Fenu, S., Alvarez, R., Baruffa, C., Peri, F., Pagani, M., Abrignani, S. & other authors. (2012).** Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase III α -dependent PI4P is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS Pathog* **8**, e1002576.
- Di Bisceglie, A. M. (1998).** Hepatitis C. *The Lancet* **351**, 351–355.
- Bishé, B., Syed, G. H., Field, S. J. & Siddiqui, A. (2012).** Role of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) and its binding protein GOLPH3 in HCV secretion. *The Journal of biological chemistry*.
- Biswal, B. K., Cherney, M. M., Wang, M., Chan, L., Yannopoulos, C. G., Bilimoria, D., Nicolas, O., Bedard, J. & James, M. N. G. (2005).** Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. *J Biol Chem* **280**, 18202–18210.
- Blagoveshchenskaya, A., Cheong, F. Y., Rohde, H. M., Glover, G., Knödler, A., Nicolson, T., Boehmelt, G. & Mayinger, P. (2008).** Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *J Cell Biol* **180**, 803–812.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouillé, Y. (2006).** Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**, 6964–6972.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000).** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972–1974.
- Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002).** Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**, 13001–13014.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2003).** Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* **77**, 3181–3190.
- Borawski, J., Troke, P., Puyang, X., Gibaja, V., Zhao, S., Mickanin, C., Leighton-Davies, J., Wilson, C. J., Myer, V. & other authors. (2009).** Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* **83**, 10058–10074.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R. & Cosset, F.-L. (2011).** A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1002144.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J.-P. (2005).** Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* **79**, 11353–11365.
- Boulant, S., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (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**, 2204–2213.
- Bourdon, J.-C. (2007).** p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* **97**, 277–282.

- Bradley, D. W. & Maynard, J. E. (1986).** Etiology and natural history of post-transfusion and enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Semin Liver Dis* **6**, 56–66.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2002).** An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **277**, 8130–8139.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M. & Crotta, S. (2008).** CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* **82**, 8316–8329.
- Brown, R. S. (2005).** Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* **436**, 973–978.
- de Bruijne, J., Bergmann, J. F., Reesink, H. W., Weegink, C. J., Molenkamp, R., Schinkel, J., Tong, X., Li, J., Treitel, M. A. & other authors. (2010).** Antiviral activity of narlaprevir combined with ritonavir and pegylated interferon in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* **52**, 1590–1599.
- Buendia, M. A. (2000).** Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* **10**, 185–200.
- Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R. E., Govindarajan, S., Shapiro, M., St Claire, M. & Bartenschlager, R. (2002).** Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 14416–14421.
- Burbelo, P. D., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Medina, J. L., Henriquez, J. A., Mishra, N., Wagner, J., Tokarz, R., Cullen, J. M. & other authors. (2012).** Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *J Virol* **86**, 6171–6178.
- Calland, N., Albecka, A., Belouzard, S., Wychowski, C., Duverlie, G., Descamps, V., Hober, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y. & Séron, K. (2012a).** (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* **55**, 720–729.
- Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y. & Séron, K. (2012b).** Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach? *Viruses* **4**, 2197–2217.
- Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.-L., Pawlotsky, J.-M., Penin, F. & Dubuisson, J. (2005).** Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* **79**, 15331–15341.
- Cantley, L. C. (2002).** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–1657.
- Carpenter, C. L. & Cantley, L. C. (1990).** Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* **29**, 11147–11156.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002).** Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* **76**, 3720–3730.
- Catanese, M. T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J. K., Paonessa, G., Rice, C. M., Cortese, R. & other authors. (2010).** Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol* **84**, 34–43.
- Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z. & Luo, G. (2007).** Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *J Virol* **81**, 13783–13793.
- de Chasse, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M. S., Aublin-Gex, A., Agaugué, S., Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B. F. & other authors. (2008).** Hepatitis C virus infection protein network. *Mol Syst Biol* **4**, 230.
- Chayama, K., Takahashi, S., Toyota, J., Karino, Y., Ikeda, K., Ishikawa, H., Watanabe, H., McPhee, F., Hughes, E. & Kumada, H. (2012).** Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* **55**, 742–748.
- Chen, C., Qiu, H., Gong, J., Liu, Q., Xiao, H., Chen, X.-W., Sun, B.-L. & Yang, R.-G. (2012).** (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the replication cycle of hepatitis C virus. *Arch Virol* **157**, 1301–1312.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362.

- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R. & Barr, P. J. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 2451–2455.
- Chu, D., Ren, S., Hu, S., Wang, W. G., Subramanian, A., Contreras, D., Kanagavel, V., Chung, E., Ko, J. & other authors. (2013). Systematic Analysis of Enhancer and Critical cis-acting RNA Elements in the Protein Encoding Region of the Hepatitis C Virus Genome. *J Virol*.
- Chu, K. M. E., Minogue, S., Hsuan, J. J. & Waugh, M. G. (2010). Differential effects of the phosphatidylinositol 4-kinases, PI4KII α and PI4KIII β , on Akt activation and apoptosis. *Cell Death Dis* **1**, e106.
- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pécheur, E.-I. & Dubuisson, J. (2007). Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *J Virol* **81**, 2372–2381.
- Ciesek, S., Steinmann, E., Iken, M., Ott, M., Helfritz, F. A., Wappler, I., Manns, M. P., Wedemeyer, H. & Pietschmann, T. (2010). Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**, 1875–1884.
- Ciesek, S., von Hahn, T., Colpitts, C. C., Schang, L. M., Friesland, M., Steinmann, J., Manns, M. P., Ott, M., Wedemeyer, H. & other authors. (2011). The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* **54**, 1947–1955.
- Clevers, H. & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–1205.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* **21**, 2893–2902.
- Cocquerel, L., Voisset, C. & Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* **87**, 1075–1084.
- Coelmont, L., Hanouille, X., Chatterji, U., Berger, C., Snoeck, J., Bobardt, M., Lim, P., Vliegen, I., Paeshuysse, J. & other authors. (2010). DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS ONE* **5**, e13687.
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T. & Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* **18**, 2244–2253.
- Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M. & Perret, C. (2004). Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 17216–17221.
- Connelly, M. A., Klein, S. M., Azhar, S., Abumrad, N. A. & Williams, D. L. (1999). Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem* **274**, 41–47.
- Conner, E. A., Lemmer, E. R., Omori, M., Wirth, P. J., Factor, V. M. & Thorgeirsson, S. S. (2000). Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene* **19**, 5054–5062.
- Craige, B., Salazar, G. & Faundez, V. (2008). Phosphatidylinositol-4-kinase type II alpha contains an AP-3-sorting motif and a kinase domain that are both required for endosome traffic. *Mol Biol Cell* **19**, 1415–1426.
- Cukierman, L., Meertens, L., Bertaux, C., Kajumo, F. & Dragic, T. (2009). Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *J Virol* **83**, 5477–5484.
- D'Angelo, G., Polishchuk, E., Di Tullio, G., Santoro, M., Di Campli, A., Godi, A., West, G., Bielawski, J., Chuang, C.-C. & other authors. (2007). Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* **449**, 62–67.
- D'Angelo, G., Vicinanza, M., Di Campli, A. & De Matteis, M. A. (2008). The multiple roles of PtdIns(4)P -- not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂. *J Cell Sci* **121**, 1955–1963.

- Date, T., Kato, T., Kato, J., Takahashi, H., Morikawa, K., Akazawa, D., Murayama, A., Tanaka-Kaneko, K., Sata, T. & other authors. (2012). Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol* **86**, 10805–10820.
- Delang, L., Paeshuyse, J. & Neyts, J. (2012). The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication. *Biochem Pharmacol* **84**, 1400–1408.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* **71**, 697–704.
- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M. & Bonifacino, J. S. (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* **149**, 81–94.
- Deming, P. & Arora, S. (2011). Taribavirin in the treatment of hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs* **20**, 1435–1443.
- Dennis, P. A. & Rifkin, D. B. (1991). Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 580–584.
- Dentzer, T. G., Lorenz, I. C., Evans, M. J. & Rice, C. M. (2009). Determinants of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 Protease Domain Required for Production of Infectious Virus. *J Virol* **83**, 12702–12713.
- Dev, A. T., McCaw, R., Sundararajan, V., Bowden, S. & Sievert, W. (2002). Southeast Asian patients with chronic hepatitis C: The impact of novel genotypes and race on treatment outcome. *Hepatology* **36**, 1259–1265.
- Diao, J., Pantua, H., Ngu, H., Komuves, L., Diehl, L., Schaefer, G. & Kapadia, S. B. (2012). Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J Virol* **86**, 10935–10949.
- Dippold, H. C., Ng, M. M., Farber-Katz, S. E., Lee, S.-K., Kerr, M. L., Peterman, M. C., Sim, R., Wiharto, P. A., Galbraith, K. A. & other authors. (2009). GOLPH3 Bridges Phosphatidylinositol-4- Phosphate and Actomyosin to Stretch and Shape the Golgi to Promote Budding. *Cell* **139**, 337–351.
- Divecha, N. & Irvine, R. F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* **80**, 269–278.
- Donato, F., Tagger, A., Gelatti, U., Parrinello, G., Boffetta, P., Albertini, A., Decarli, A., Trevisi, P., Ribero, M. L. & other authors. (2002). Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* **155**, 323–331.
- Dorner, M., Horwitz, J. A., Robbins, J. B., Barry, W. T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C. T., Schoggins, J. W., Catanese, M. T. & other authors. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**, 208–211.
- Dreux, M., Dao Thi, V. L., Fresquet, J., Guérin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D. & other authors. (2009a). Receptor Complementation and Mutagenesis Reveal SR-BI as an Essential HCV Entry Factor and Functionally Imply Its Intra- and Extra-Cellular Domains. *PLoS Pathogens* **5**, e1000310 (M. J. Evans, Ed.).
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S. F. & Chisari, F. V. (2009b). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 14046–14051.
- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L. & other authors. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1967–1976.
- Drummer, H. E., Boo, I. & Pombourios, P. (2007). Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *J Gen Virol* **88**, 1144–1148.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* **68**, 6147–6160.

- Dubuisson, J., Helle, F. & Cocquerel, L. (2008). Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* **10**, 821–827.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, 8463–8471.
- Dumaresq-Doiron, K., Savard, M.-F., Akam, S., Costantino, S. & Lefrançois, S. (2010). The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIIIalpha is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes. *J Cell Sci* **123**, 2273–2280.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**, 5974–5984.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. & Glenn, J. S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* **78**, 11288–11295.
- Einav, S., Sklan, E. H., Moon, H. M., Gehrig, E., Liu, P., Hao, Y., Lowe, A. W. & Glenn, J. S. (2008). The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology* **47**, 827–835.
- El-Serag, H. B. & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557–2576.
- Endemann, G., Dunn, S. N. & Cantley, L. C. (1987). Bovine brain contains two types of phosphatidylinositol kinase. *Biochemistry* **26**, 6845–6852.
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., Watts, L., Booten, S. L., Graham, M. & other authors. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* **3**, 87–98.
- Evans, M. J., Rice, C. M. & Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 13038–13043.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805.
- Everson, Sims K., Rodriguez-Torres M, & et al. (2012). An interferon-free, ribavirin-free 12-week regimen of Daclatasvir, Asunaprevir, and BMS-791325 yielded SVR4 of 94% in treatment-naive patients with genotype 1 chronic HCV infection. *The Liver Meeting, 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, 2012*.
- Failla, C., Tomei, L. & De Francesco, R. (1995). An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J Virol* **69**, 1769–1777.
- Farci, P., Alter, H. J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Cheung, L. C., Melpolder, J. C., Sacher, R. A., Shih, J. W. & Purcell, R. H. (1996). Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* **335**, 631–634.
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. & Donato, F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* **127**, S35–50.
- Feldman, G. J., Mullin, J. M. & Ryan, M. P. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 883–917.
- Ferenci, P., Scherzer, T.-M., Kerschner, H., Rutter, K., Beinhardt, S., Hofer, H., Schöniger-Hekele, M., Holzmann, H. & Steindl-Munda, P. (2008). Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. *Gastroenterology* **135**, 1561–1567.
- Field J., Jacobson I., Jensen D, & et al. (2012). Up to 100% SVR4 rates with ritonavir-boosted danoprevir, mericitabine, and ribavirin plus or minus peginterferon alfa-2a (40KD) in HCV genotype 1-infected partial and null responders: results from the MATTERHORN study. *The Liver Meeting, 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, 2012*.

- Fishman, S. L., Murray, J. M., Eng, F. J., Walewski, J. L., Morgello, S. & Branch, A. D. (2008).** Molecular and bioinformatic evidence of hepatitis C virus evolution in brain. *J Infect Dis* **197**, 597–607.
- Fletcher, N. F., Wilson, G. K., Murray, J., Hu, K., Lewis, A., Reynolds, G. M., Stamataki, Z., Meredith, L. W., Rowe, I. A. & other authors. (2012).** Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology* **142**, 634–643.e6.
- Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S. & McKeating, J. A. (1999).** Functional Analysis of Cell Surface-Expressed Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein. *J Virol* **73**, 6782–6790.
- Flint, M., Mullen, S., Deatly, A. M., Chen, W., Miller, L. Z., Ralston, R., Broom, C., Emini, E. A. & Howe, A. Y. M. (2009).** Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH 503034). *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 401–411.
- Fofana, I., Krieger, S. E., Grunert, F., Glauben, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C. & other authors. (2010).** Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 953–964, 964.e1–4.
- Fong, T. L., Shindo, M., Feinstone, S. M., Hoofnagle, J. H. & Di Bisceglie, A. M. (1991).** Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* **88**, 1058–1060.
- Ford, M. G. J., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J. K., Evans, P. R. & McMahon, H. T. (2002).** Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361–366.
- Forestier, N., Larrey, D., Marcellin, P., Guyader, D., Patat, A., Rouzier, R., Smith, P. F., Qin, X., Lim, S. & other authors. (2011).** Antiviral activity of danoprevir (ITMN-191/RG7227) in combination with pegylated interferon α -2a and ribavirin in patients with hepatitis C. *J Infect Dis* **204**, 601–608.
- Forns, X., Purcell, R. H. & Bukh, J. (1999).** Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* **7**, 402–410.
- Forton, D. M., Karayiannis, P., Mahmud, N., Taylor-Robinson, S. D. & Thomas, H. C. (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**, 5170–5183.
- De Francesco, R. & Migliaccio, G. (2005).** Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* **436**, 953–960.
- Franck, N., Le Seyec, J., Guguen-Guillouzo, C. & Erdtmann, L. (2005).** Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol* **79**, 2700–2708.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S. & other authors. (2000).** The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* **355**, 887–891.
- Fraser, C. S. & Doudna, J. A. (2007).** Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* **5**, 29–38.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. (2001).** Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* **75**, 12047–12057.
- Friebe, P. & Bartenschlager, R. (2002).** Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* **76**, 5326–5338.
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Gonçalves, F. L., Jr, Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G. & other authors. (2002).** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**, 975–982.
- Fried, M. W., Navarro, V. J., Afdhal, N., Belle, S. H., Wahed, A. S., Hawke, R. L., Doo, E., Meyers, C. M. & Reddy, K. R. (2012).** Effect of silymarin (milk thistle) on liver disease in patients with

- chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy: a randomized controlled trial. *JAMA* **308**, 274–282.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E. & Cantley, L. C. (1998).** Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**, 481–507.
- de la Fuente, C., Goodman, Z. & Rice, C. M. (2013).** Genetic and Functional Characterization of the N-Terminal Region of the Hepatitis C Virus NS2 Protein. *J Virol* **87**, 4130–4145.
- Fugmann, T., Hausser, A., Schöffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K. & Olayioye, M. A. (2007).** Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* **178**, 15–22.
- Gane E., Pockros P., Zeuzem S, & et al. (2012).** Interferon-free treatment with a combination of mericitabine and danoprevir/ r with or without ribavirin in treatment-naive HCV genotype 1- infected patients. *The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Society for the Study of the Liver, Barcelona, Spain, 2012.*
- Gane, E., Stedman, C., Hyland, R., Sorensen, R., Symonds, W., Hindes, R. & Berrey, M. (2012).** Once Daily GS-7977 Plus Ribavirin in HCV Genotypes 1-3: The ELECTRON Trial. In *Poster presentations of the International Liver Congress.*
- Gane, E. J., Roberts, S. K., Stedman, C. A. M., Angus, P. W., Ritchie, B., Elston, R., Ipe, D., Morcos, P. N., Baher, L. & other authors. (2010).** Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* **376**, 1467–1475.
- Gane, E. J., Stedman, C. A., Hyland, R. H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W. T., Hindes, R. G. & Berrey, M. M. (2013).** Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir plus Ribavirin for Hepatitis C. *New England Journal of Medicine* **368**, 34–44.
- Gao, J., Xie, L., Yang, W.-S., Zhang, W., Gao, S., Wang, J. & Xiang, Y.-B. (2012).** Risk factors of hepatocellular carcinoma--current status and perspectives. *Asian Pac J Cancer Prev* **13**, 743–752.
- Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Nguyen, V. N., Fridell, R. A., Serrano-Wu, M. H., Langley, D. R., Sun, J.-H. & other authors. (2010).** Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**, 96–100.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T. & Olson, W. C. (2003).** L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4498–4503.
- Gastaminza, P., Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2006).** Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* **80**, 11074–11081.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. & Chisari, F. V. (2008).** Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* **82**, 2120–2129.
- Gehrmann, T. & Heilmeyer, L. M., Jr. (1998).** Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur J Biochem* **253**, 357–370.
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y. (2000).** DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* **1**, 353–357.
- Giroux, V., Iovanna, J. & Dagorn, J.-C. (2006).** Probing the human kinome for kinases involved in pancreatic cancer cell survival and gemcitabine resistance. *FASEB J* **20**, 1982–1991.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D. & De Matteis, M. A. (1999).** ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* **1**, 280–287.
- Godi, A., Di Campi, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J. M. & De Matteis, M. A. (2004).** FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol* **6**, 393–404.

- Gonzalez, O., Fontanes, V., Raychaudhuri, S., Loo, R., Loo, J., Arumugaswami, V., Sun, R., Dasgupta, A. & French, S. W. (2009). The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* **50**, 1756–1764.
- Gordon, A., Hobbs, D. A., Bowden, D. S., Bailey, M. J., Mitchell, J., Francis, A. J. P. & Roberts, S. K. (2006). Effects of Silybum marianum on serum hepatitis C virus RNA, alanine aminotransferase levels and well-being in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* **21**, 275–280.
- Gordon, S. C., Bayati, N. & Silverman, A. L. (1998). Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology* **28**, 562–567.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J Virol* **77**, 5487–5492.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J. & Rouillé, Y. (2010). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **84**, 773–787.
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F. & Moradpour, D. (2009). An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. *J Virol* **83**, 11378–11384.
- de Graaf, P. (2004). Phosphatidylinositol 4-Kinase Is Critical for Functional Association of rab11 with the Golgi Complex. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 2038–2047.
- de Graaf, P., Klapisz, E. E., Schulz, T. K. F., Cremers, A. F. M., Verkleij, A. J. & van Bergen en Henegouwen, P. M. P. (2002). Nuclear localization of phosphatidylinositol 4-kinase beta. *J Cell Sci* **115**, 1769–1775.
- Graham, T. R. & Burd, C. G. (2011). Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol* **21**, 113–121.
- Greninger, A. L., Knudsen, G. M., Betegon, M., Burlingame, A. L. & Derisi, J. L. (2012). The 3A protein from multiple picornaviruses utilizes the golgi adaptor protein ACBD3 to recruit PI4KIIIβ. *J Virol* **86**, 3605–3616.
- Griffin, S. D. C., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. G. & Rowlands, D. J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* **535**, 34–38.
- Guan, M., Wang, W., Liu, X., Tong, Y., Liu, Y., Ren, H., Zhu, S., Dubuisson, J., Baumert, T. F. & other authors. (2012). Three different functional microdomains in the hepatitis C virus hypervariable region 1 (HVR1) mediate entry and immune evasion. *J Biol Chem* **287**, 35631–35645.
- Guedj, J., Dahari, H., Rong, L., Sansone, N. D., Nettles, R. E., Cotler, S. J., Layden, T. J., Uprichard, S. L. & Perelson, A. S. (2013). Modeling shows that the NS5A inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis C virus half-life. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 3991–3996.
- Guerreiro, A. S., Fattet, S., Kulesza, D. W., Atamer, A., Elsing, A. N., Shalaby, T., Jackson, S. P., Schoenwaelder, S. M., Grotzer, M. A. & other authors. (2011). A sensitized RNA interference screen identifies a novel role for the PI3K p110γ isoform in medulloblastoma cell proliferation and chemoresistance. *Mol Cancer Res* **9**, 925–935.
- Guevin, C., Manna, D., Belanger, C., Konan, K. V., Mak, P. & Labonte, P. (2010). Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology* **405**, 1–7.
- von Hahn, T., Ciesek, S. & Manns, M. P. (2011). Arrest all accessories--inhibition of hepatitis C virus by compounds that target host factors. *Discov Med* **12**, 237–244.
- Haid, S., Pietschmann, T. & Pécheur, E.-I. (2009). Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* **284**, 17657–17667.

- Haid, S., Novodomská, A., Gentsch, J., Grethe, C., Geuenich, S., Bankwitz, D., Chhatwal, P., Jannack, B., Hennebelle, T. & other authors. (2012). A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. *Gastroenterology* **143**, 213–222.e5.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M. & Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803–809.
- Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G. L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., Mee, C. J., McCaffrey, K., Young, S. & other authors. (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* **285**, 21092–21102.
- Hausser, A., Storz, P., Märten, S., Link, G., Toker, A. & Pfizenmaier, K. (2005). Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* **7**, 880–886.
- Hawke, R. L., Schrieber, S. J., Soule, T. A., Wen, Z., Smith, P. C., Reddy, K. R., Wahed, A. S., Belle, S. H., Afdhal, N. H. & other authors. (2010). Silymarin ascending multiple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pharmacol* **50**, 434–449.
- Heilmeyer, L. M. G., Jr, Vereb, G., Jr, Vereb, G., Kakuk, A. & Szivák, I. (2003). Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases. *IUBMB Life* **55**, 59–65.
- Helle, F. & Dubuisson, J. (2008). Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* **65**, 100–112.
- Heo, T.-H., Lee, S.-M., Bartosch, B., Cosset, F.-L. & Kang, C.-Y. (2006). Hepatitis C virus E2 links soluble human CD81 and SR-B1 protein. *Virus Res* **121**, 58–64.
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1993). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* **67**, 1953–1958.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49–53.
- Hope, R. G. & McLauchlan, J. (2000). Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* **81**, 1913–1925.
- Hsia, C. C., Axiotis, C. A., Di Bisceglie, A. M. & Tabor, E. (1992). Transforming growth factor-alpha in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. *Cancer* **70**, 1049–1056.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7271–7276.
- Hsu, N.-Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.-H., Takvorian, P. M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N. & other authors. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **141**, 799–811.
- Hu, T.-H., Huang, C.-C., Lin, P.-R., Chang, H.-W., Ger, L.-P., Lin, Y.-W., Changchien, C.-S., Lee, C.-M. & Tai, M.-H. (2003). Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **97**, 1929–1940.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr & Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 5848–5853.
- Huber, K. R., Sebesta, C. & Bauer, K. (1996). Detection of common hepatitis C virus subtypes with a third-generation enzyme immunoassay. *Hepatology* **24**, 471–473.
- Hügler, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Kräusslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **284**, 70–81.
- Icard, V., Diaz, O., Scholtes, C., Perrin-Cocon, L., Ramière, C., Bartenschlager, R., Penin, F., Lotteau, V. & André, P. (2009). Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS ONE* **4**, e4233.
- Ikegami, T., Zhang, Y. & Matsuzaki, Y. (2007). Liver fibrosis: possible involvement of EMT. *Cells Tissues Organs (Print)* **185**, 213–221.

- Ishikawa, S., Egami, H., Kurizaki, T., Akagi, J., Tamori, Y., Yoshida, N., Tan, X., Hayashi, N. & Ogawa, M. (2003). Identification of genes related to invasion and metastasis in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. *J Exp Clin Cancer Res* **22**, 299–306.
- Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* **68**, 403–429.
- Jackson, C. L. & Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60–67.
- Jacobson, I., Pockros, P., Lalezari, J., Lawitz, E., Rodriguez-Torres, M., DeJesus, E., Haas, F., Martorell, C., Pruitt, R. & Durham, K. (2009). 1052 ANTIVIRAL ACTIVITY OF FILIBUVIR IN COMBINATION WITH PEGYLATED INTERFERON ALFA-2A AND RIBAVIRIN FOR 28 DAYS IN TREATMENT NAIVE PATIENTS CHRONICALLY INFECTED WITH HCV GENOTYPE 1. *Journal of Hepatology* **50**, S382–S383.
- Janssen, H. L., Reesink, H. W., Zeuzem, S., Lawitz, E., Rodriguez-Torres, M., Chen, A., Davis, C., King, B., Levin, A. A. & Hodges, M. R. (2011). A randomized, doubleblind, placebo controlled safety and anti-viral proof of concept study of miravirsin, an oligonucleotide targeting miR-122, in treatment naive patients with genotype 1 chronic HCV infection. *Hepatology* **54**.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69–90.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J. Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* **6**, e1001233.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* **81**, 8374–8383.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577–1581.
- Kaito, M., Gabazza, E. C., Fujita, N., Tanaka, H., Watanabe, S. & Kohara, M. (2006a). Immune complex of hepatitis C virus particles detected by immunogold electron microscopy. *J Gastroenterol* **41**, 807–808.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tanaka, H., Fujita, N., Konishi, M., Iwasa, M., Kobayashi, Y., Gabazza, E. C., Adachi, Y. & other authors. (2006b). Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. *Int J Mol Med* **18**, 673–678.
- Kakuk, A., Friedlander, E., Vereb, G., Kasa, A., Balla, A., Balla, T., Heilmeyer, L. M. G., Gergely, P. & Vereb, G. (2006). Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various mammalian cells. *Cytom Part A* **69A**, 1174–1183.
- Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Kasahara, A., Fusamoto, H. & Kamada, T. (1995). Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts: implications for virus neutralization or persistence. *J Hepatol* **22**, 440–448.
- Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. A. & Chisari, F. V. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* **81**, 374–383.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J. A., Firth, C., Hirschberg, D. L., Rice, C. M. & other authors. (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 11608–11613.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Scheel, T. K. H., Hjelle, B., Cullen, J. M., Burbelo, P. D., Chauhan, L. V., Duraisamy, R., Sanchez Leon, M. & other authors. (2013). Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *MBio* **4**.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. & Shimotohno, K. (1990). Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 9524–9528.

- Kawate, S., Takenoshita, S., Ohwada, S., Mogi, A., Fukusato, T., Makita, F., Kuwano, H. & Morishita, Y. (1999). Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* **14**, 127–131.
- Ke, P.-Y. & Chen, S. S.-L. (2011). Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest* **121**, 37–56.
- Kew, M. C. (2002). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* **181-182**, 35–38.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M. D., Landro, J. A., Chambers, S. P., Markland, W., Lepre, C. A. & other authors. (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* **87**, 343–355.
- Kim, S., Ishida, H., Yamane, D., Yi, M., Swinney, D. C., Fong, S. & Lemon, S. M. (2013). Contrasting Roles of Mitogen-activated Protein Kinases in Cellular Entry and Replication of Hepatitis C Virus: MKNK1 Facilitates Cell Entry. *J Virol*.
- Kim, Y. K., Kim, C. S., Lee, S. H. & Jang, S. K. (2002). Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 105–112.
- Kiyosawa, K., Umemura, T., Ichijo, T., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., Gad, A. & Tanaka, E. (2004). Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan. *Gastroenterology* **127**, S17–26.
- Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A. & other authors. (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* **125**, 733–747.
- Koch, J. O. & Bartenschlager, R. (1999). Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* **73**, 7138–7146.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**, 3363–3371.
- Kopp, M., Murray, C. L., Jones, C. T. & Rice, C. M. (2010). Genetic analysis of the carboxy-terminal region of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* **84**, 1666–1673.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* **80**, 5308–5320.
- Krieger, N., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* **75**, 4614–4624.
- Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C. & other authors. (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144–1157.
- Kulkarni, G., Turbin, D. A., Amiri, A., Jeganathan, S., Andrade-Navarro, M. A., Wu, T. D., Huntsman, D. G. & Lee, J. M. (2007). Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **102**, 31–41.
- Kumada, H. (2002). Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neominophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* **62 Suppl 1**, 94–100.
- de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C. & other authors. (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8847–8851.
- Lalezari, J., Asmuth, D., Casiró, A., Vargas, H., Lawrence, S., Dubuc-Patrick, G., Chen, J., McCarville, J., Pietropaolo, K. & other authors. (2012). Short-term monotherapy with IDX184, a liver-targeted nucleotide polymerase inhibitor, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 6372–6378.

- Lamarche, M. J., Borawski, J., Bose, A., Capacci-Daniel, C., Colvin, R., Dennehy, M., Ding, J., Dobler, M., Drumm, J. & other authors. (2012). Anti-hepatitis C virus activity and toxicity of type III phosphatidylinositol-4-kinase beta inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 5149–5156.
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bös, M., Cameron, D. R., Cartier, M. & other authors. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **426**, 186–189.
- Lan, K.-H., Wang, Y.-W., Lee, W.-P., Lan, K.-L., Tseng, S.-H., Hung, L.-R., Yen, S.-H., Lin, H.-C. & Lee, S.-D. (2012). Multiple effects of honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver International* **32**, 989–997.
- Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S. & Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**, 198–201.
- Lanke, K. H. W., van der Schaar, H. M., Belov, G. A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C. L., Ehrenfeld, E. & van Kuppeveld, F. J. M. (2009). GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol* **83**, 11940–11949.
- Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* **17**, 107–115.
- Lavanchy, D. (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver Int* **29 Suppl 1**, 74–81.
- Lavie, M., Goffard, A. & Dubuisson, J. (2007). Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* **9**, 71–86.
- Lavillette, D., Tarr, A. W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A. H., Dubuisson, J., Ball, J. K. & Cosset, F.-L. (2005). Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**, 265–274.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.-L., Penin, F. & Pécheur, E.-I. (2006). Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* **281**, 3909–3917.
- Lavillette, D., Pécheur, E.-I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F. & Cosset, F.-L. (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**, 8752–8765.
- Lawitz, E. J., Gruener, D., Hill, J. M., Marbury, T., Moorehead, L., Mathias, A., Cheng, G., Link, J. O., Wong, K. A. & other authors. (2012). A phase 1, randomized, placebo-controlled, 3-day, dose-ranging study of GS-5885, an NS5A inhibitor, in patients with genotype 1 hepatitis C. *Journal of Hepatology* **57**, 24–31.
- Lenoir, M., Coskun, U., Grzybek, M., Cao, X., Buschhorn, S. B., James, J., Simons, K. & Overduin, M. (2010). Structural basis of wedging the Golgi membrane by FAPP pleckstrin homology domains. *EMBO Rep* **11**, 279–284.
- Lenz, O., Verbinnen, T., Lin, T.-I., Vijgen, L., Cummings, M. D., Lindberg, J., Berke, J. M., Dehertogh, P., Fransen, E. & other authors. (2010). In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 1878–1887.
- Lerat, H., Carmouse, S., Pellerin, M., Zucman-Rossi, J. & Pawlotsky, J. M. (2008). 77 FUNCTIONAL COMPARTMENTALIZATION OF HCV NS5A VARIANTS WITHIN THE TUMORAL AND NON-TUMORAL TISSUE FROM PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA. *Journal of Hepatology* **48**, S34.
- Lerat, H., Honda, M., Beard, M. R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.-Y. & other authors. (2002). Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* **122**, 352–365.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F. & Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* **6**, 937–943.
- Li, D. M. & Sun, H. (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15406–15411.

- Li, J., Lu, Y., Zhang, J., Kang, H., Qin, Z. & Chen, C. (2010). PI4KIIalpha is a novel regulator of tumor growth by its action on angiogenesis and HIF-1alpha regulation. *Oncogene* **29**, 2550–2559.
- Li, Q., Brass, A. L., Ng, A., Hu, Z., Xavier, R. J., Liang, T. J. & Elledge, S. J. (2009). A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 16410–16415.
- Li, X., Jeffers, L. J., Shao, L., Reddy, K. R., de Medina, M., Scheffel, J., Moore, B. & Schiff, E. R. (1995). Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *J Viral Hepat* **2**, 227–234.
- Li, Y.-P., Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Jensen, T. B. & Bukh, J. (2011). MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 4991–4996.
- Li, Y.-P., Ramirez, S., Jensen, S. B., Purcell, R. H., Gottwein, J. M. & Bukh, J. (2012). Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 19757–19762.
- Lim, P. J., Chatterji, U., Cordek, D., Sharma, S. D., Garcia-Rivera, J. A., Cameron, C. E., Lin, K., Targett-Adams, P. & Gallay, P. A. (2012). Correlation between NS5A Dimerization and Hepatitis C Virus Replication. *J Biol Chem* **287**, 30861–30873.
- Lim, Y.-S. & Hwang, S. B. (2011). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha and regulates viral propagation. *J Biol Chem* **286**, 11290–11298.
- Lin, C., Prágai, B. M., Grakoui, A., Xu, J. & Rice, C. M. (1994). Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *J Virol* **68**, 8147–8157.
- Lin, X., Mattjus, P., Pike, H. M., Windebank, A. J. & Brown, R. E. (2000). Cloning and expression of glycolipid transfer protein from bovine and porcine brain. *J Biol Chem* **275**, 5104–5110.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wölk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R. & other authors. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623–626.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. & Wang, T. (2009). Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *J Virol* **83**, 2011–2014.
- Liu, Y., Boukhelifa, M., Tribble, E., Morin-Kensicki, E., Uetrecht, A., Bear, J. E. & Bankaitis, V. A. (2008). The Sac1 Phosphoinositide Phosphatase Regulates Golgi Membrane Morphology and Mitotic Spindle Organization in Mammals. *Mol Biol Cell* **19**, 3080–3096.
- Liverton, N. J., Carroll, S. S., Dimuzio, J., Fandozzi, C., Graham, D. J., Hazuda, D., Holloway, M. K., Ludmerer, S. W., McCauley, J. A. & other authors. (2010). MK-7009, a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 305–311.
- Llinàs-Brunet, M., Bailey, M. D., Ghiro, E., Gorys, V., Halmos, T., Poirier, M., Rancourt, J. & Goudreau, N. (2004). A systematic approach to the optimization of substrate-based inhibitors of the hepatitis C virus NS3 protease: discovery of potent and specific tripeptide inhibitors. *J Med Chem* **47**, 6584–6594.
- Lo, S. Y., Selby, M. J. & Ou, J. H. (1996). Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* **70**, 5177–5182.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U. & Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* **71**, 8416–8428.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110–113.
- Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A. & Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* **75**, 1437–1449.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2003). Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* **77**, 3007–3019.

- Lok, A. S., Gardiner, D. F., Lawitz, E., Martorell, C., Everson, G. T., Ghalib, R., Reindollar, R., Rustgi, V., McPhee, F. & other authors. (2012).** Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* **366**, 216–224.
- Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M. & other authors. (2011).** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**, 589–595.
- Lupberger, J., Felmler, D. J. & Baumert, T. F. (2012).** Cholesterol uptake and hepatitis C virus entry. *J Hepatol* **57**, 215–217.
- Lyra, A. C., Fan, X. & Di Bisceglie, A. M. (2004).** Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res* **37**, 691–695.
- Ma, H.-C., Ke, C.-H., Hsieh, T.-Y. & Lo, S.-Y. (2002).** The first hydrophobic domain of the hepatitis C virus E1 protein is important for interaction with the capsid protein. *J Gen Virol* **83**, 3085–3092.
- Ma, H., Blake, T., Chitnis, A., Liu, P. & Balla, T. (2009).** Crucial role of phosphatidylinositol 4-kinase III α in development of zebrafish pectoral fin is linked to phosphoinositide 3-kinase and FGF signaling. *J Cell Sci* **122**, 4303–4310.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. & Yi, M. (2008).** NS3 Helicase Domains Involved in Infectious Intracellular Hepatitis C Virus Particle Assembly. *J Virol* **82**, 7624–7639.
- Maillard, P., Huby, T., Andréo, U., Moreau, M., Chapman, J. & Budkowska, A. (2006).** The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J* **20**, 735–737.
- Maillard, P., Walic, M., Meuleman, P., Roohvand, F., Huby, T., Le Goff, W., Leroux-Roels, G., Pécheur, E.-I. & Budkowska, A. (2011).** Lipoprotein lipase inhibits hepatitis C virus (HCV) infection by blocking virus cell entry. *PLoS ONE* **6**, e26637.
- Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M. & Albrecht, J. K. (2001).** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**, 958–965.
- Manns, M., Reesink, H., Berg, T., Dusheiko, G., Flisiak, R., Marcellin, P., Moreno, C., Lenz, O., Meyvisch, P. & other authors. (2011).** Rapid viral response of once-daily TMC435 plus pegylated interferon/ribavirin in hepatitis C genotype-1 patients: a randomized trial. *Antivir Ther (Lond)* **16**, 1021–1033.
- Manns, M. P., Gane, E., Rodriguez-Torres, M., Stoehr, A., Yeh, C.-T., Marcellin, P., Wiedmann, R. T., Hwang, P. M., Caro, L. & other authors. (2012).** Vaniprevir with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C: a randomized phase II study. *Hepatology* **56**, 884–893.
- Maqbool, M. A., Imache, M. R., Higgs, M. R., Carmouse, S., Pawlotsky, J.-M. & Lerat, H. (2013).** Regulation of Hepatitis C Virus Replication by Nuclear Translocation of Nonstructural 5A Protein and Transcriptional Activation of Host Genes. *J Virol* **87**, 5523–5539.
- Marcellin, P., Gish, R. G., Gitlin, N., Heise, J., Halliman, D. G., Chun, E. & Rodriguez-Torres, M. (2010).** Safety and efficacy of viremivir versus ribavirin in VISER2: randomized, double-blind study in therapy-naïve hepatitis C patients. *J Hepatol* **52**, 32–38.
- Martin, T. F. (1997).** Phosphoinositides as spatial regulators of membrane traffic. *Current Opinion in Neurobiology* **7**, 331–338.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T. & other authors. (2008).** Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *J Virol* **82**, 7964–7976.
- De Matteis, M. A. & Godi, A. (2004).** Protein–lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1666**, 264–274.

- De Matteis, M. A., Di Campli, A. & D'Angelo, G. (2007).** Lipid-transfer proteins in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**, 761–768.
- Mazzocca, A., Liotta, F. & Carloni, V. (2008).** Tetraspanin CD81-regulated cell motility plays a critical role in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **135**, 244–256.e1.
- McCauley, J. A., McIntyre, C. J., Rudd, M. T., Nguyen, K. T., Romano, J. J., Butcher, J. W., Gilbert, K. F., Bush, K. J., Holloway, M. K. & other authors. (2010).** Discovery of vaniprevir (MK-7009), a macrocyclic hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitor. *J Med Chem* **53**, 2443–2463.
- McLauchlan, J. (2000).** Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* **7**, 2–14.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002).** Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980–3988.
- McMahon, H. T. & Gallop, J. L. (2005).** Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590–596.
- Mee, C. J., Grove, J., Harris, H. J., Hu, K., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2008).** Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol* **82**, 461–470.
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. (2006).** Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* **80**, 11571–11578.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.-L. & Dragic, T. (2008).** The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* **82**, 3555–3560.
- Michailidis, I. E., Rusinova, R., Georgakopoulos, A., Chen, Y., Iyengar, R., Robakis, N. K., Logothetis, D. E. & Baki, L. (2011).** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulates epidermal growth factor receptor activation. *Pflugers Arch* **461**, 387–397.
- Michta, M. L., Hopcraft, S. E., Narbus, C. M., Kratovac, Z., Israelow, B., Sourisseau, M. & Evans, M. J. (2010).** Species-specific regions of occludin required by hepatitis C virus for cell entry. *J Virol* **84**, 11696–11708.
- Migliaccio, C. T., Follis, K. E., Matsuura, Y. & Nunberg, J. H. (2004).** Evidence for a polytopic form of the E1 envelope glycoprotein of Hepatitis C virus. *Virus Res* **105**, 47–57.
- Miller, R. H. & Purcell, R. H. (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 USA* **87**, 2057–2061.
- Minogue, S. & Waugh, M. G. (2012).** The Phosphatidylinositol 4-Kinases: Don't Call it a Comeback. *Subcell Biochem* **58**, 1–24.
- Minogue, S., Waugh, M. G., Matteis, M. A. D., Stephens, D. J., Berditchevski, F. & Hsuan, J. J. (2006).** Phosphatidylinositol 4-kinase is required for endosomal trafficking and degradation of the EGF receptor. *J Cell Sci* **119**, 571–581.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007).** The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**, 1089–1097.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P. & other authors. (2007).** The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* **46**, 411–419.
- Molina, S., Castet, V., Pichard-Garcia, L., Wychowski, C., Meurs, E., Pascussi, J.-M., Sureau, C., Fabre, J.-M., Sacunha, A. & other authors. (2008).** Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* **82**, 569–574.

- Monazahian, M., Böhme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S. & Thomssen, R. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* **57**, 223–229.
- Moradpour, D. & Penin, F. (2013). Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 113–142.
- Moreno, C., Berg, T., Tanwandee, T., Thongsawat, S., Van Vlierberghe, H., Zeuzem, S., Lenz, O., Peeters, M., Sekar, V. & De Smedt, G. (2012). Antiviral activity of TMC435 monotherapy in patients infected with HCV genotypes 2–6: TMC435-C202, a phase IIa, open-label study. *J Hepatol* **56**, 1247–1253.
- Morgan, T. R., Mandayam, S. & Jamal, M. M. (2004). Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**, S87–96.
- Morikawa, K., Lange, C. M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F. & Moradpour, D. (2011). Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* **18**, 305–315.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., Sone, S. & Wakita, T. (2007). The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* **79**, 714–723.
- Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T. & Koike, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* **4**, 1065–1067.
- Murakami, E., Tolstykh, T., Bao, H., Niu, C., Steuer, H. M. M., Bao, D., Chang, W., Espiritu, C., Bansal, S. & other authors. (2010). Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977. *J Biol Chem* **285**, 34337–34347.
- Murray, C. L., Jones, C. T., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007). Alanine scanning of the hepatitis C virus core protein reveals numerous residues essential for production of infectious virus. *J Virol* **81**, 10220–10231.
- Murray, J., Fishman, S. L., Ryan, E., Eng, F. J., Walewski, J. L., Branch, A. D. & Morgello, S. (2008). Clinicopathologic correlates of hepatitis C virus in brain: a pilot study. *J Neurovirol* **14**, 17–27.
- Nakagawa, T., Goto, K. & Kondo, H. (1996). Cloning, expression, and localization of 230-kDa phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* **271**, 12088–12094.
- Nakai, K., Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Ishii, K., Lim, C. K., Tani, H., Matsuo, E., Abe, T., Mori, Y. & other authors. (2006). Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with the Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. *J Virol* **80**, 11265–11273.
- Nakanishi, S., Catt, K. J. & Balla, T. (1995). A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5317–5321.
- Nakatsu, F., Baskin, J. M., Chung, J., Tanner, L. B., Shui, G., Lee, S. Y., Pirruccello, M., Hao, M., Ingolia, N. T. & other authors. (2012). PtdIns4P synthesis by PI4KIII α at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity. *J Cell Biol* **199**, 1003–1016.
- Neddermann, P., Clementi, A. & De Francesco, R. (1999). Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol* **73**, 9984–9991.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L. & De Francesco, R. (2004). Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol* **78**, 13306–13314.
- Nelson, D. R., Benhamou, Y., Chuang, W.-L., Lawitz, E. J., Rodriguez-Torres, M., Flisiak, R., Rasenack, J. W. F., Krczka, W., Lee, C.-M. & other authors. (2010). Albinterferon Alfa-2b was not inferior to pegylated interferon- α in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 2 or 3. *Gastroenterology* **139**, 1267–1276.

- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumeechockchai, W. & Toms, G. L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* **80**, 2418–2428.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S. & Devilee, P. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–708.
- Oehler, V., Filipe, A., Montserret, R., da Costa, D., Brown, G., Penin, F. & McLauchlan, J. (2012). Structural analysis of hepatitis C virus core-E1 signal peptide and requirements for cleavage of the genotype 3a signal sequence by signal peptide peptidase. *J Virol* **86**, 7818–7828.
- Okamoto, H., Kojima, M., Okada, S., Yoshizawa, H., Iizuka, H., Tanaka, T., Muchmore, E. E., Peterson, D. A., Ito, Y. & Mishiro, S. (1992). Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* **190**, 894–899.
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (2008). Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J Virol* **82**, 8349–8361.
- Okuda, H. (2007). Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **21**, 161–173.
- Ooi, C. E., Dell'Angelica, E. C. & Bonifacino, J. S. (1998). ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol* **142**, 391–402.
- Ozturk, M. (1999). Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis* **19**, 235–242.
- Pan, W., Choi, S.-C., Wang, H., Qin, Y., Volpicelli-Daley, L., Swan, L., Lucast, L., Khoo, C., Zhang, X. & other authors. (2008). Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. *Science* **321**, 1350–1353.
- Paolo, G. D. & Camilli, P. D. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74–108.
- Pawlotsky, J.-M. (2011). Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* **53**, 1742–1751.
- Peng, B., Yu, M., Xu, S., Lee, Y.-J., Tian, Y., Yang, H., Chan, K., Mo, H., McHutchison, J. & other authors. (2013). Development of robust hepatitis C virus genotype 4 subgenomic replicons. *Gastroenterology* **144**, 59–61.e6.
- Perz, J. F., Armstrong, G. L., Farrington, L. A., Hutin, Y. J. F. & Bell, B. P. (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* **45**, 529–538.
- Phan, T., Beran, R. K. F., Peters, C., Lorenz, I. C. & Lindenbach, B. D. (2009). Hepatitis C Virus NS2 Protein Contributes to Virus Particle Assembly via Opposing Epistatic Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. *J Virol* **83**, 8379–8395.
- Phan, T., Kohlway, A., Dimberu, P., Pyle, A. M. & Lindenbach, B. D. (2011). The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *J Virol* **85**, 1193–1204.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. & Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* **76**, 4008–4021.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M. & other authors. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7408–7413.
- Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Leroux-Roels, G., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2009). Production of infectious genotype 1b

- virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathog* **5**, e1000475.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D. & other authors. (1998).** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938–941.
- Pinke, D. E. & Lee, J. M. (2011).** The lipid kinase PI4KIII β and the eEF1A2 oncogene co-operate to disrupt three-dimensional in vitro acinar morphogenesis. *Exp Cell Res* **317**, 2503–2511.
- Ploss, A. & Dubuisson, J. (2012).** New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* **61 Suppl 1**, i25–35.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009).** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886.
- Pockros, P. J., Jensen, D., Tsai, N., Taylor, R., Ramji, A., Cooper, C., Dickson, R., Tice, A., Kulkarni, R. & other authors. (2013).** JUMP-C: A randomized trial of mericitabine plus peginterferon alfa-2a/ribavirin for 24 weeks in treatment-naïve HCV genotype 1/4 patients. *Hepatology*.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J.-F. & other authors. (2010).** Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 1355–1364.
- Pol, S., Ghalib, R. H., Rustgi, V. K., Martorell, C., Everson, G. T., Tatum, H. A., Hézode, C., Lim, J. K., Bronowicki, J. P. & Abrams, G. A. (2011).** First report of SVR12 for a NS5A replication complex inhibitor, BMS-790052, in combination with pegIFN α -2a and RBV: phase IIA trial in treatment-naïve HCV genotype 1 subjects.
- Prince, A. M., Huima-Byron, T., Parker, T. S. & Levine, D. M. (1996).** Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat* **3**, 11–17.
- Qin, Y., Li, L., Pan, W. & Wu, D. (2009).** Regulation of phosphatidylinositol kinases and metabolism by Wnt3a and Dvl. *J Biol Chem* **284**, 22544–22548.
- Ray, R. B. & Ray, R. (2001).** Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* **202**, 149–156.
- Reesink, H. W., Zeuzem, S., Weegink, C. J., Forestier, N., van Vliet, A., van de Wetering de Rooij, J., McNair, L., Purdy, S., Kauffman, R. & other authors. (2006).** Rapid Decline of Viral RNA in Hepatitis C Patients Treated With VX-950: A Phase Ib, Placebo-Controlled, Randomized Study. *Gastroenterology* **131**, 997–1002.
- Régeard, M., Trotard, M., Lepère, C., Gripon, P. & Le Seyec, J. (2008).** Entry of pseudotyped hepatitis C virus into primary human hepatocytes depends on the scavenger class B type I receptor. *J Viral Hepat* **15**, 865–870.
- Régeard, M., Lepère, C., Trotard, M., Gripon, P. & Le Seyec, J. (2007).** Recent contributions of in vitro models to our understanding of hepatitis C virus life cycle. *FEBS J* **274**, 4705–4718.
- Reiss, S., Harak, C., Romero-Brey, I., Rebhan, I., Radujkovic, D., Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2012).** 129 MODULATION OF PHOSPHORYLATION OF HEPATITIS C VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEIN 5A BY THE LIPID KINASE PI4KIII α . *Journal of Hepatology* **56**, S56–S56.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H. & other authors. (2011).** Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* **9**, 32–45.
- Rodriguez-Torres, M., Lalezari, J., Gane, E. J., DeJesus, E., Nelson, D. R. & Everson, G. T. (2008).** Potent antiviral response to the HCV nucleoside polymerase inhibitor R7128 for 28 days with peg-IFN and ribavirin: subanalysis by race/ethnicity, weight, and HCV genotype. *Hepatology* **48**, 1160A.
- Rodriguez-Torres, M., Lawitz, E., Conway, B., Kaita, K., Sheikh, A. M., Ghalib, R., Adrover, R., Cooper, C., Silva, M. & Rosario, M. (2010).** 31 SAFETY AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE HCV NON-NUCLEOSIDE POLYMERASE INHIBITOR VX-222 IN TREATMENT-NAIVE GENOTYPE 1 HCV-INFECTED PATIENTS. *Journal of Hepatology* **52**, S14–S14.

- Rohde, H. M., Cheong, F. Y., Konrad, G., Paiha, K., Mayinger, P. & Boehmelt, G. (2003). The human phosphatidylinositol phosphatase SAC1 interacts with the coatamer I complex. *J Biol Chem* **278**, 52689–52699.
- Roohvand, F., Maillard, P., Lavergne, J.-P., Boulant, S., Walic, M., Andréo, U., Goueslain, L., Helle, F., Mallet, A. & other authors. (2009). Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* **284**, 13778–13791.
- Ross-Thriepfand, D., Amako, Y. & Harris, M. (2013). The C-terminus of NS5A domain II is a key determinant of hepatitis C virus genome replication, but is not required for virion assembly and release. *J Gen Virol*.
- Roy, A. & Levine, T. P. (2004). Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of Osh2p. *J Biol Chem* **279**, 44683–44689.
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Zhang, M., Ihrig, M. M. & other authors. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**, 401–406.
- Rutter, K., Scherzer, T.-M., Beinhardt, S., Kerschner, H., Stättermayer, A. F., Hofer, H., Popow-Kraupp, T., Steindl-Munda, P. & Ferenci, P. (2011). Intravenous silibinin as ‘rescue treatment’ for on-treatment non-responders to pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Antivir Ther (Lond)* **16**, 1327–1333.
- Saeed, M., Gondeau, C., Hmwe, S., Yokokawa, H., Date, T., Suzuki, T., Kato, T., Maurel, P. & Wakita, T. (2013). Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology* **144**, 56–58.e7.
- Sainz, B., Jr, Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K. A., Yu, X., Chayama, K. & other authors. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* **18**, 281–285.
- Saito, T., Stopkova, P., Diaz, L., Papolos, D. F., Boussemart, L. & Lachman, H. M. (2003). Polymorphism screening of PIK4CA: possible candidate gene for chromosome 22q11-linked psychiatric disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **116B**, 77–83.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11646–11651.
- Santolini, E., Migliaccio, G. & La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* **68**, 3631–3641.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G. & Monica, N. (1995). The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* **69**, 7461–7471.
- Sasaki, J., Ishikawa, K., Arita, M. & Taniguchi, K. (2012). ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J* **31**, 754–766.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal* **21**, 5017–5025.
- van der Schaar, H. M., van der Linden, L., Lanke, K. H. W., Strating, J. R. P. M., Pürstinger, G., de Vries, E., de Haan, C. A. M., Neyts, J. & van Kuppeveld, F. J. M. (2012). Coxsackievirus mutants that can bypass host factor PI4KIIIβ and the need for high levels of PI4P lipids for replication. *Cell Res* **22**, 1576–1592.
- Schaff, Z., Hsia, C. C., Sarosi, I. & Tabor, E. (1994). Overexpression of transforming growth factor-α in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia from European patients. *Hum Pathol* **25**, 644–651.
- Shepard, C. W., Finelli, L. & Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **5**, 558–567.
- Shi, N., Hiraga, N., Imamura, M., Hayes, C. N., Zhang, Y., Kosaka, K., Okazaki, A., Murakami, E., Tsuge, M. & other authors. (2013). Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B

- inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *Gut*.
- Shi, S. T., Lee, K.-J., Aizaki, H., Hwang, S. B. & Lai, M. M. C. (2003).** Hepatitis C Virus RNA Replication Occurs on a Detergent-Resistant Membrane That Cofractionates with Caveolin-2. *J Virol* **77**, 4160–4168.
- Shih, C. M., Lo, S. J., Miyamura, T., Chen, S. Y. & Lee, Y. H. (1993).** Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* **67**, 5823–5832.
- Shih, C. M., Chen, C. M., Chen, S. Y. & Lee, Y. H. (1995).** Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J Virol* **69**, 1160–1171.
- Shih, I., Vliegen, I., Peng, B., Yang, H., Paeshuyse, J., Pürstinger, G., Fenaux, M., Mabery, E., Bahador, G. & Lehman, L. S. (2007).** Mechanistic characterization of GS-9190, a novel non-nucleoside inhibitor of HCV NS5B polymerase with potent antiviral activity and a unique mechanism of action. *status: published*.
- Shimakami, T., Welsch, C., Yamane, D., McGivern, D. R., Yi, M., Zeuzem, S. & Lemon, S. M. (2011).** Protease inhibitor-resistant hepatitis C virus mutants with reduced fitness from impaired production of infectious virus. *Gastroenterology* **140**, 667–675.
- Shimizu, Y. K., Feinstone, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1996).** Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* **23**, 205–209.
- Shimotohno, K. (2000).** Hepatitis C virus and its pathogenesis. *Semin Cancer Biol* **10**, 233–240.
- Shiraha, H., Yamamoto, K. & Namba, M. (2013).** Human hepatocyte carcinogenesis (review). *Int J Oncol* **42**, 1133–1138.
- Shrivastava, S., Raychoudhuri, A., Steele, R., Ray, R. & Ray, R. B. (2011).** Knockdown of autophagy enhances innate immune response in hepatitis C virus infected hepatocytes. *Hepatology* **53**, 406–414.
- Simmonds, P. (2004).** Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* **85**, 3173–3188.
- Sir, D., Kuo, C.-F., Tian, Y., Liu, H. M., Huang, E. J., Jung, J. U., Machida, K. & Ou, J.-H. J. (2012).** Replication of hepatitis C virus RNA on autophagosomal membranes. *J Biol Chem* **287**, 18036–18043.
- De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C. & Jirtle, R. L. (1995).** M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet* **11**, 447–449.
- Stapleford, K. A. & Miller, D. J. (2010).** Role of Cellular Lipids in Positive-Sense RNA Virus Replication Complex Assembly and Function. *Viruses* **2**, 1055–1068.
- Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. & Simmonds, P. (2011).** The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol* **92**, 233–246.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2007).** Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* **3**, e103.
- Strahl, T., Huttner, I. G., Lusin, J. D., Osawa, M., King, D., Thorner, J. & Ames, J. B. (2007).** Structural insights into activation of phosphatidylinositol 4-kinase (Pik1) by yeast frequenin (Frq1). *J Biol Chem* **282**, 30949–30959.
- Sulkowski et al. (2012a).** High rate of sustained virologic response with the all-oral combination of Daclatasvir (NS5A inhibitor) plus Sofosbuvir (nucleotide NS5B inhibitor), with or without Ribavirin, in treatment-naïve patients chronically infected with HCV genotype 1, 2, or 3. *The Liver Meeting, 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, 2012*.
- Sulkowski, M., Rodriguez-Torres, M., Lawitz, E., Shiffman, M., Pol, S., Herring, R., McHutchison, J. G., Pang, P. S., Wong, K. A. & Massetto, B. (2012b).** Interim sustained virologic response rates in treatment-naïve HCV genotype 1a and 1b patients treated for 12 or 24 weeks with an

- interferon-free all-oral quad regimen. In *Latebreaker poster presentations of the International Liver Congress*.
- Sun, H.-Y., Lin, C.-C., Lee, J.-C., Wang, S.-W., Cheng, P.-N., Wu, I.-C., Chang, T.-T., Lai, M.-D., Shieh, D.-B. & Young, K.-C. (2012). Very low-density lipoprotein/lipo-viro particles reverse lipoprotein lipase-mediated inhibition of hepatitis C virus infection via apolipoprotein C-III. *Gut*.
- Susser, S., Welsch, C., Wang, Y., Zettler, M., Domingues, F. S., Karey, U., Hughes, E., Ralston, R., Tong, X. & other authors. (2009). Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* **50**, 1709–1718.
- Suzuki, R., Suzuki, T., Ishii, K., Matsuura, Y. & Miyamura, T. (1999). Processing and functions of Hepatitis C virus proteins. *Intervirology* **42**, 145–152.
- Suzuki, R., Sakamoto, S., Tsutsumi, T., Rikimaru, A., Tanaka, K., Shimoike, T., Moriishi, K., Iwasaki, T., Mizumoto, K. & other authors. (2005). Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol* **79**, 1271–1281.
- Suzuki, T. (2011). Assembly of hepatitis C virus particles. *Microbiology and Immunology* **55**, 12–18.
- Suzuki, Y., Ikeda, K., Suzuki, F., Toyota, J., Karino, Y., Chayama, K., Kawakami, Y., Ishikawa, H., Watanabe, H. & other authors. (2012). Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol*.
- Syder, A. J., Lee, H., Zeisel, M. B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T. F. & other authors. (2011). Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* **54**, 48–55.
- Syed, G. H., Amako, Y. & Siddiqui, A. (2010). Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **21**, 33–40.
- Szentpetery, Z., Szakacs, G., Bojjireddy, N., Tai, A. W. & Balla, T. (2011). Genetic and functional studies of phosphatidylinositol 4-kinase type III α . *Biochim Biophys Acta* **1811**, 476–483.
- Tai, A. W., Benita, Y., Peng, L. F., Kim, S.-S., Sakamoto, N., Xavier, R. J. & Chung, R. T. (2009). A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* **5**, 298–307.
- Tai, A. W. & Salloum, S. (2011). The Role of the Phosphatidylinositol 4-Kinase PI4KA in Hepatitis C Virus-Induced Host Membrane Rearrangement. *PLoS ONE* **6**, e26300.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**, 3307–3312.
- Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y. & Miyamura, T. (2000). Selective Binding of Hepatitis C Virus Core Protein to Synthetic Oligonucleotides Corresponding to the 5' Untranslated Region of the Viral Genome. *Virology* **270**, 229–236.
- Tannapfel, A., Busse, C., Weinans, L., Benicke, M., Katalinic, A., Geissler, F., Hauss, J. & Wittekind, C. (2001). INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **20**, 7104–7109.
- Targett-Adams, P., Boulant, S. & McLauchlan, J. (2008). Visualization of Double-Stranded RNA in Cells Supporting Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* **82**, 2182–2195.
- Tedbury, P., Welbourn, S., Pause, A., King, B., Griffin, S. & Harris, M. (2011). The subcellular localization of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. *J Gen Virol* **92**, 819–830.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* **279**, 48576–48587.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., Treadaway, J. C. & Rice, C. M. (2008). Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* **82**, 1073–1083.
- Teterina, N. L., Pinto, Y., Weaver, J. D., Jensen, K. S. & Ehrenfeld, E. (2011). Analysis of poliovirus protein 3A interactions with viral and cellular proteins in infected cells. *J Virol* **85**, 4284–4296.

- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C. & Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **194**, 1395–1406.
- Thompson, A. A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., Cronin, C. N. & Wells, P. A. (2009). Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry* **48**, 906–916.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Köchel, H. G. & Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* **181**, 293–300.
- Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* **3**, D1134–1147.
- Toker, A. & Cantley, L. C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**, 673–676.
- Tolias, K. F. & Cantley, L. C. (1999). Pathways for phosphoinositide synthesis. *Chemistry and Physics of Lipids* **98**, 69–77.
- Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R. & La Monica, N. (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* **67**, 4017–4026.
- Tomlinson, V. A. L., Newbery, H. J., Wray, N. R., Jackson, J., Larionov, A., Miller, W. R., Dixon, J. M. & Abbott, C. M. (2005). Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer* **5**, 113.
- Tong, M. J., el-Farra, N. S., Reikes, A. R. & Co, R. L. (1995). Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* **332**, 1463–1466.
- Tóth, B., Balla, A., Ma, H., Knight, Z. A., Shokat, K. M. & Balla, T. (2006). Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi. *J Biol Chem* **281**, 36369–36377.
- Trotard, M., Lepère-Douard, C., Régeard, M., Piquet-Pellorce, C., Lavillette, D., Cosset, F.-L., Gripon, P. & Le Seyec, J. (2009). Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB J* **23**, 3780–3789.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* **80**, 1734–1741.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**, 1476–1483.
- Vaillancourt, F. H., Pilote, L., Cartier, M., Lippens, J., Liuzzi, M., Bethell, R. C., Cordingley, M. G. & Kukolj, G. (2009). Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* **387**, 5–10.
- Vaillancourt, F. H., Brault, M., Pilote, L., Uyttersprot, N., Gaillard, E. T., Stoltz, J. H., Knight, B. L., Pantages, L., McFarland, M. & other authors. (2012). Evaluation of phosphatidylinositol-4-kinase III α as a hepatitis C virus drug target. *J Virol* **86**, 11595–11607.
- Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campli, A. & De Matteis, M. A. (2008). Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J* **27**, 2457–2470.
- Vivanco, I. & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489–501.
- Vliegen, I., Paeshuyse, J., Mabery, E., Peng, B., Shih, I., Lehman, L. S., Dutartre, H., Selisko, B., Canard, B. & Bondy, S. (2007). GS-9190, a novel substituted imidazo-pyridine analogue, is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro and remains active against known drug-resistant mutants. *status: published*.
- Vousden, K. H. & Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275–283.
- Wagoner, J., Negash, A., Kane, O. J., Martinez, L. E., Nahmias, Y., Bourne, N., Owen, D. M., Grove, J., Brimacombe, C. & other authors. (2010). Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* **51**, 1912–1921.
- Wagoner, J., Morishima, C., Graf, T. N., Oberlies, N. H., Teissier, E., Pécheur, E.-I., Tavis, J. E. & Polyak, S. J. (2011). Differential in vitro effects of intravenous versus oral formulations of silibinin on the HCV life cycle and inflammation. *PLoS ONE* **6**, e16464.

- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G. & other authors. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791–796.
- Wang, J., Sun, H.-Q., Macia, E., Kirchhausen, T., Watson, H., Bonifacino, J. S. & Yin, H. L. (2007). PI4P Promotes the Recruitment of the GGA Adaptor Proteins to the Trans-Golgi Network and Regulates Their Recognition of the Ubiquitin Sorting Signal. *Mol Biol Cell* **18**, 2646–2655.
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. & Yin, H. L. (2003). Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299–310.
- WARIS, G., SARKER, S. & SIDDIQUI, A. (2004). Two-step affinity purification of the hepatitis C virus ribonucleoprotein complex. *RNA* **10**, 321–329.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y. & Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* **19**, 111–122.
- Waugh, M. G. (2012). Phosphatidylinositol 4-kinases, phosphatidylinositol 4-phosphate and cancer. *Cancer letters*.
- Weiner, A. J., Brauer, M. J., Rosenblatt, J., Richman, K. H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q. L. & Houghton, M. (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **180**, 842–848.
- Wilkinson, J., Radkowski, M., Eschbacher, J. M. & Laskus, T. (2010). Activation of brain macrophages/microglia cells in hepatitis C infection. *Gut* **59**, 1394–1400.
- Willars, G. B., Nahorski, S. R. & Challiss, R. A. (1998). Differential regulation of muscarinic acetylcholine receptor-sensitive polyphosphoinositide pools and consequences for signaling in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **273**, 5037–5046.
- Wong, K. & Cantley, L. C. (1994). Cloning and characterization of a human phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* **269**, 28878–28884.
- Wong, K., Meyers ddR & Cantley, L. C. (1997). Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. *J Biol Chem* **272**, 13236–13241.
- Wu, S.-F., Lin, C.-K., Chuang, Y.-S., Chang, F.-R., Tseng, C.-K., Wu, Y.-C. & Lee, J.-C. (2012). Anti-hepatitis C virus activity of 3-hydroxy caruillignan C from *Swietenia macrophylla* stems. *J Viral Hepat* **19**, 364–370.
- Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. & Panayotou, G. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* **16**, 1722–1733.
- Yagnik, A. T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R. M., Ercole, B. B., Nicosia, A. & Tramontano, A. (2000). A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **40**, 355–366.
- Yamada, T., De Souza, A. T., Finkelstein, S. & Jirtle, R. L. (1997). Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10351–10355.
- Yamashita, T., Kaneko, S., Shirota, Y., Qin, W., Nomura, T., Kobayashi, K. & Murakami, S. (1998). RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J Biol Chem* **273**, 15479–15486.
- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2291–2295.
- Yang, F., Robotham, J. M., Nelson, H. B., Irsigler, A., Kenworthy, R. & Tang, H. (2008). Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol* **82**, 5269–5278.

- Yang, N., Ma, P., Lang, J., Zhang, Y., Deng, J., Ju, X., Zhang, G. & Jiang, C. (2012). Phosphatidylinositol 4-kinase III β is required for severe acute respiratory syndrome coronavirus spike-mediated cell entry. *J Biol Chem* **287**, 8457–8467.
- Yi, M. & Lemon, S. M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**, 3557–3568.
- Yuan, T. L. & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497–5510.
- Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K., Haberstroh, A., Blum, H. E., Cosset, F.-L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M. & other authors. (2007). Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**, 1722–1731.
- Zeuzem, S., Arora, S., Bacon, B., Box, T., Charlton, M., Diago, M., Dieterich, D., Mur, R. E., Everson, G. & Fallón, M. (2011). Pegylated Interferon-lambda (PegIFN- λ) shows superior viral response with improved safety and tolerability versus PegIFN α -2a in HCV patients (G1/2/3/4): Emerge Phase IIB through week 12. *J Hepatol* **54**, S538–S539.
- Zeuzem, S., Sulkowski, M. S., Lawitz, E. J., Rustgi, V. K., Rodriguez-Torres, M., Bacon, B. R., Grigorescu, M., Tice, A. D., Lurie, Y. & other authors. (2010). Albinterferon Alfa-2b was not inferior to pegylated interferon- α in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1. *Gastroenterology* **139**, 1257–1266.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* **78**, 1448–1455.
- Zhang, L., Hong, Z., Lin, W., Shao, R.-X., Goto, K., Hsu, V. W. & Chung, R. T. (2012). ARF1 and GBF1 generate a PI4P-enriched environment supportive of hepatitis C virus replication. *PLoS ONE* **7**, e32135.
- Zhang, Y.-Y., Zhang, B.-H., Ishii, K. & Liang, T. J. (2010). Novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. *J Virol* **84**, 3396–3407.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. & Deng, H. (2007). Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **81**, 12465–12471.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9294–9299.
- Zhou, X.-J., Pietropaolo, K., Chen, J., Khan, S., Sullivan-Bólyai, J. & Mayers, D. (2011). Safety and Pharmacokinetics of IDX184, a Liver-Targeted Nucleotide Polymerase Inhibitor of Hepatitis C Virus, in Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 76–81.
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H. J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R. G., Xiao, F. & other authors. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* **13**, 302–313.

ANNEXE 2 (Modèle dernière page de thèse)

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINÉAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

Phosphatidylinositol 4-kinases de type III hépatiques : implication au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C et lien avec le carcinome hépatocellulaire

Le virus de l'hépatite C (VHC) est l'un des principaux facteurs étiologiques du carcinome hépatocellulaire. Le traitement des hépatites virales C a été récemment amélioré grâce à une trithérapie (interféron, ribavirine et anti-protéase virale). Néanmoins l'importance des effets secondaires et l'émergence de mutants résistants nécessitent de découvrir de nouveaux antiviraux. Dans ce contexte, notre équipe a récemment découvert que les phosphatidylinositol 4-kinases de type III (PI4KIII α et PI4KIII β) étaient indispensables à la propagation du virus dans une lignée hépatique humaine, et ce, à 2 étapes de son cycle biologique : l'entrée et la réplication. L'objectif du présent travail était de poursuivre la validation de ces nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, en approfondissant nos connaissances sur la dépendance du virus à l'égard de ces kinases au cours de son entrée. Pour cela, nous avons utilisé le modèle des hépatocytes humains primaires, système *in vitro* plus proche du contexte physiologique que les modèles utilisés jusqu'à présent et qui étaient basés sur l'exploitation de lignées. Deux axes ont été développés :

- Vérification de l'importance de l'activité kinase des PI4KIII α au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires, à travers une approche chimique ;
- Validation de l'implication de ces kinases et de leur activité enzymatique au cours de l'entrée virale grâce à une approche génétique basée sur l'ARN interférence et la restauration de phénotype.

En parallèle, nous avons étudié l'expression de PI4KIII α au cours de pathologies hépatiques.

Nos résultats suggèrent une implication de PI4KIII α au cours de l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains primaires, mais restent à confirmer quant à l'implication de PI4KIII β . Par ailleurs, l'analyse de l'expression de PI4KIII α dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) conduit à proposer cette kinase comme un nouveau marqueur moléculaire, qui pourrait améliorer les modèles de pronostic déjà établis et pourrait conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les patients atteints d'un CHC, quelque soit l'étiologie.

Type III Phosphatidylinositol 4-kinases in the liver: involvement during Hepatitis C Virus infection and link with hepatocellular carcinoma

Hepatitis C virus (HCV) is one of the leading causes of hepatocellular carcinoma. Therapeutic treatment against the virus has been recently improved by a tritherapy including pegylated interferon, ribavirin and antiviral protease. Nevertheless, the importance of side effects and the emergence of resistant mutants require the development of new antivirals. In this context, our team has recently discovered that Type III phosphatidylinositol 4-kinases (PI4KIII α and PI4KIII β) are essential for the propagation of the virus in a human hepatic cell line at the entry and replication steps. To further characterize these potential therapeutic targets, we investigate the implication of these kinases during the HCV entry, using primary human hepatocytes, a model closer to the *in vivo* conditions. Two lines of research were developed:

- Verification of the importance of the kinase activity of PI4KIII α during HCV entry in primary human hepatocytes, through a chemical approach;
- Validation of the involvement of these kinases and their enzymatic activity during viral entry through a genetic approach based on RNA interference and phenotype rescue.

In parallel, we studied the expression of PI4KIII α in liver diseases.

Our results suggest the involvement of PI4KIII α in HCV entry; the involvement of PI4KIII β needs to be confirmed. The analysis of PI4KIII α expression in hepatocellular carcinoma led us to propose this kinase as a new molecular marker, which could improve the already established prognosis models and could lead to the development of new therapeutic approaches.