



HAL
open science

Etude du rôle des protéines cellulaires RACK1 et TIP47 dans l'infection par le virus de l'hépatite C

Mohamed Lamine Hafirassou

► **To cite this version:**

Mohamed Lamine Hafirassou. Etude du rôle des protéines cellulaires RACK1 et TIP47 dans l'infection par le virus de l'hépatite C. Virologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ131 . tel-01232638

HAL Id: tel-01232638

<https://theses.hal.science/tel-01232638>

Submitted on 23 Nov 2015

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.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé ED_414
UMR1110 Interactions virus-hôte et maladies hépatiques

THÈSE

présentée par :

Mohamed Lamine HAFIRASSOU

soutenue le : **20 Juin 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

Etude du rôle des protéines cellulaires RACK1 et TIP47 dans l'infection par le virus de l'hépatite C

THÈSE dirigée par :

Directeur de thèse : Dr. Catherine SCHUSTER, HDR, DR Inserm, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Rapporteur externe : Dr. Isabelle IMBERT, HDR, MCU, Université Aix-Marseille

Rapporteur externe : Dr. Camille SUREAU, HDR, DR CNRS, Université Paris Descartes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Examineur Prof. Philippe GEORGEL, HDR, PU, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail de longue haleine qui a duré trois années et demi. A l'issue de ce travail, je suis plus que jamais convaincu que, bien que présentée à titre personnel, la thèse est avant tout un travail d'équipe. Je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse malgré leurs emplois du temps chargés : Le Dr. Isabelle IMBERT et Dr. Camille SUREAU en qualité de rapporteurs externes et le Prof. Philippe GEORGEL en tant qu'examinateur.

Merci au Prof. Thomas BAUMERT, Directeur de l'UMR1110, de m'avoir accueilli au sein de son unité et de m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse dans un environnement aussi favorable.

J'aimerais remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé durant ces années à commencer par Catherine Schuster, ma Directrice de thèse, qui a su me prodiguer conseils et soutient tout au long de ce travail doctoral. J'aimerais la remercier de m'avoir fait confiance pour intégrer son équipe. J'espère avoir été à la hauteur de ses espérances. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension. Elle a toujours été disponible malgré ses nombreuses responsabilités.

Merci à Marie, la technicienne la plus appliquée et la plus rigoureuse que je connaisse, pour son encadrement précieux lors des premiers mois de mon arrivée au labo. Je la remercie également pour sa contribution importante à ce projet.

Merci à Mathieu, Emilie, Emma et Tonia, mes voisins de paillasse avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, tant au labo qu'en dehors. Merci pour leur générosité, leurs encouragements et leur bonne humeur. C'était un vrai plaisir de les côtoyer tous les jours. Je n'oublierai jamais tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Merci à Eric S pour sa disponibilité et ses nombreux conseils notamment en qRT-PCR. Mais également pour tous les moments qu'on a passé à papoter, pour les nombreux fous rires que nous avons eus et toutes les expressions et mots qu'on a inventé.

Merci à Anne, notre gestionnaire de choc, pour son aide précieuse, notamment pour mes démarches administratives et dieu sais que j'en ai eu.

Merci à tous les membres de l'UMR1110 que j'ai pu côtoyer au cours de mon parcours : Cathy, Catherine F, Charlotte, Christine, Dan, Daniel, Éloi, Emilie H, Éric R, Fei, Françoise, Heidi, Joachim, Jochen, Laura, Laurent, Laetitia, Marine, Mirjam, Nauman, Nicolaas, Nicolas, Olga, Quentin, Rajeev, Richard, Roxane, Rémy, Samira, Sarah, Simonetta, Sophie et Tao.

Merci aux membres de l'équipe HIV : Alysée, Bin, Camille, Christiane, Géraldine, Marina, Maryse, Mélanie, Thomas D et Sylvie.

Merci à Catherine C, Sigis, Dominique, Jérémy et Patricia pour leur disponibilité, leur gentillesse et pour leur travail remarquable essentiel au fonctionnement de l'unité au quotidien.

Merci à tous nos collaborateurs sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour.

Un grand merci à mon Papa et à ma Maman pour leur soutien tout au long de ces années, ainsi qu'à toute ma famille et mes amis.

Un dernier merci à ma femme Hadia pour s'être occupé de moi et surtout de m'avoir supporté durant ces derniers mois de stress intense, et à ma fille Majda d'avoir apporté la gaité et le bonheur dans ma vie.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	1
PREAMBULE.....	1
INTRODUCTION.....	1
I. L'hépatite C.....	1
1. Découverte du virus de l'hépatite C.....	1
2. Épidémiologie.....	2
3. Modes de transmission.....	3
4. Le foie, un organe cible.....	5
4.1. Physiopathologie du foie.....	5
4.2. Histoire naturelle de l'hépatite C.....	10
4.2.1. Hépatite aigüe.....	11
4.2.2. Hépatite chronique.....	11
4.2.3. Manifestations extra-hépatiques.....	12
5. Réponse Immunitaire de l'hôte.....	14
5.1. Réponse immunitaire innée.....	14
5.2. Réponse immunitaire adaptative.....	19
5.2.1. La réponse humorale.....	19
5.2.2. La réponse cellulaire.....	21
6. Techniques de diagnostic.....	23
7. Traitements actuels.....	26
7.1. Les DAAs.....	26
7.1.1. Les inhibiteurs de la protéase NS3-4A.....	27
7.1.2. Les inhibiteurs de NS5B.....	29
7.1.3. Les inhibiteurs de NS5A.....	30
7.2. Les HTAs.....	31
II. Le virus de l'hépatite C.....	32
1. Classification et variabilité génomique.....	32
2. Propriétés biophysiques de la particule virale.....	35
3. Organisation génomique.....	37
3.1. Les régions non-traduites.....	38
3.1.1. La région 5'UTR.....	38
3.1.2. La région 3'UTR.....	38
3.2. Les protéines virales.....	39
3.2.1. La protéine Core.....	39
3.2.3. Les protéines E1 et E2.....	41
3.2.4. La protéine p7.....	43
3.2.5. La protéine NS2.....	44
3.2.6. Le complexe NS3/NS4A.....	46
3.2.7. La protéine NS4B.....	48
3.2.8. La protéine NS5A.....	49
3.2.9. La protéine NS5B.....	51
III. Les modèles d'études.....	54
1. Les modèles animaux.....	54
1.1. Le chimpanzé.....	54
1.2. Les souris.....	55
1.2.1. Le modèle uPA-SCID.....	55
1.2.2. Les souris FRG.....	55
1.2.3. Autres modèles de souris.....	56

1.3. Autres petits modèles animaux	57
2. Les modèles <i>in vitro</i>	58
2.1. Les pseudo-particules du VHC	58
2.2. Les réplicons subgénomiques et génomiques	60
2.3. Les particules VHC produites en culture cellulaire	62
IV. Le cycle viral	64
1. L'entrée virale.....	65
2. La traduction	68
2.1. Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes	68
2.1.1. Initiation de la traduction coiffe-dépendante.....	70
2.1.2. Initiation de la traduction IRES-dépendante.....	72
2.1.3. La traduction IRES-dépendante du VHC.....	75
2.1.4. Contribution de la région 3'UTR dans la traduction IRES-dépendante.....	77
2.1.5. Utilisation de facteurs d'initiation alternatifs	78
2.1.6. Contribution des facteurs non-canoniques (ITAFs) dans la traduction IRES-dépendante	79
2.1.7. Rôle du miR-122.....	84
3. La maturation de la polyprotéine	87
4. La réplication de l'ARN viral.....	88
5. L'assemblage et la sécrétion des particules virales	93
5.1. L'assemblage des particules virales	93
5.2. Maturation et export des particules virales	95
OBJECTIFS	97
PARTIE I	99
1. La protéine ribosomale RACK1 est un facteur de l'hôte requis pour la traduction IRES-dépendante du VHC	100
1.1. Introduction.....	100
1.2. Outils biologiques	103
1.3. Résultats	105
1.4. Discussion - perspectives.....	119
PARTIE II	127
2. La protéine TIP47 joue un rôle important dans la morphogenèse et l'export des particules virales infectieuses du VHC.....	128
2.1. Introduction.....	128
2.2. Résultats	130
2.3. Discussion - perspectives.....	136
CONCLUSION GENERALE	141
REFERENCES.....	142
Annexe I	170
Annexe II	171
Annexe III	172

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1. Différents types de cellules hépatiques et leurs fonctions dans le foie adulte	7
Tableau 2. Les DAAs et les HTAs en développement clinique à l'aube de 2014.	28
Figure 1. Prévalence de l'hépatite C dans le monde en 2010	2
Figure 2. Architecture et organisation du foie.	6
Figure 3. Altération matricielle et cellulaire dans la fibrose hépatique.	9
Figure 4. Cinétique des marqueurs virologiques durant l'infection par le VHC.	10
Figure 5. Le VHC atténue la réponse immunitaire innée.	15
Figure 6. Arbre phylogénétique des membres de la famille des <i>Flaviviridae</i>	32
Figure 7. Répartition mondiale des différents génotypes du VHC	34
Figure 8. Particules du VHC interagissent avec les lipoprotéines de faible densité.	36
Figure 9. Organisation génétique et maturation de la polyprotéine du VHC.	37
Figure 10. Représentation schématique de la protéine Core du VHC.	40
Figure 11. Structure de la glycoprotéine E2 du VHC.	43
Figure 12. Structure 3D d'un hexamère de p7 du VHC formant un canal ionique.	44
Figure 13. Structure et topologie de la protéine NS2.	45
Figure 14. Structure tridimensionnelle et topologie du complexe NS3/4A.	46
Figure 15. Topologie membranaire de NS4B et formation du MW.	49
Figure 16. Structure et topologie membranaire de NS5A.	50
Figure 17. Structure de la protéine NS5B du VHC.	53
Figure 18. Production de pseudo-particules du VHC.	59
Figure 19. Représentation schématique du système réplicon du VHC.	61
Figure 20. Représentation schématique du système HCVcc.	63
Figure 21. Schéma présentant les étapes majeures du cycle viral du VHC.	64
Figure 22. L'entrée du VHC dans les hépatocytes.	67
Figure 23. Modèle de l'initiation de la traduction canonique chez les eucaryotes.	69
Figure 24. Représentation schématique des éléments IRES des différentes classes.	73
Figure 25. Voie d'initiation de la traduction du VHC.	75
Figure 26. Facteurs non-canoniques modulant la traduction du VHC.	80
Figure 27. Représentation schématique de la réplication du VHC.	89
Figure 28. Modèle d'assemblage des particules virales du VHC.	94
Figure 29. Structure de RACK1 associée à la sous-unité 40S du ribosome eucaryote.	101
Figure 30. Représentation schématique des différents virus recombinants utilisés	104
Figure 31. RACK1 est nécessaire à l'infection du VHC recombinant Luc-Jc1.	106
Figure 32. RACK1 est nécessaire à l'infection par le virus recombinant Jc1.	107
Figure 33. RACK1 est requise pour les étapes de réplication et/ou de traduction virale.	108
Figure 34. RACK1 est requise pour la traduction IRES du VHC et de l'EMCV.	111
Figure 35. Le miR-122 exprimé de manière ectopique dans les cellules HEK-293T stimule la traduction IRES du VHC.	112
Figure 36. L'inhibition de RACK1 diminue la traduction IRES _{VHC} indépendamment de l'expression du miR-122.	113
Figure 37. RACK1 et miR-122 affectent l'étape de la traduction du VHC par des mécanismes différents.	115
Figure 38. L'inhibition de RACK1 n'affecte ni la viabilité, ni la prolifération des cellules Huh7.5.1	116
Figure 39. Répartition des ARNm dont la traduction est modifiée par l'absence de RACK1	118
Figure 40. TIP47 interagit spécifiquement avec la protéine virale NS5A.	131
Figure 41. Le domaine de liaison à Rab9 n'est pas essentiel pour l'interaction de TIP47 avec NS5A.	132
Figure 42. TIP47 interagit avec NS5A via son <i>PAT domain</i>	133
Figure 43. Le domaine I de NS5A est important pour l'interaction avec TIP47 et apoE.	134
Figure 44. L'interaction entre TIP47 et NS5A n'est pas abolie en présence d'un inhibiteur de NS5A, le Daclatasvir.	135

ABBREVIATIONS

aa	Aminoacides
AEV	<i>Avian encephalomyelitis virus</i>
ALAT	Alanine aminotransférase
Apo	Apolipoprotéine
ARNdb	ARN double brin
ARNsb	ARN simple brin
AUF1	<i>ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1</i>
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>
CD81	<i>Cluster of Differentiation 81</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CLDN1	Claudin-1
CM	Cryoglobulinémie mixte
CrPV	<i>Cricket paralysis virus</i>
CSFV	<i>Classical swine fever virus</i>
CypA	Cyclophiline A
DAAs	<i>Direct-Acting Antivirals</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin</i>
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DCV	<i>Drosophila C virus</i>
DGAT1	<i>Diacylglycerol acyltransferase-1</i>
DTM	Domaine transmembranaire
EGFR	<i>Endothelial growth factor receptor</i>
EIAs	<i>Enzyme ImmunoAssays</i>
eIF4E-BP1	<i>eIF4E binding protein 1</i>
eIFs	<i>Eukaryotic translation initiation factors</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
FAH	Fumarylacétoacétate hydrolase

FFU	<i>Focus forming unit assay</i>
FHV	<i>Flock House Virus</i>
FMDV	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HCVcc	<i>Cell culture-derived HCV</i>
HCVpp	<i>Hepatitis C virus pseudoparticles</i>
HEK-293T	<i>Human embryonic kidney cells 293T</i>
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HSPGs	Héparanes sulfates protéoglycanes
HTAs	<i>Host-Targeting Agents</i>
hVAP	<i>Human VAMP-associated protein</i>
HVRs	<i>Hypervariable regions</i>
Ig	Immunoglobuline
IGR	<i>Intergenic region</i>
IMP-1	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1</i>
INF	Interféron
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISGs	<i>Interferon stimulated genes</i>
ISREs	<i>Interferon-stimulated response elements</i>
ITAFs	<i>IRES Trans Acting Factors</i>
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
JFH1	<i>Japanese fulminant hepatitis 1</i>
L-SIGN	<i>Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
LCS	<i>Low Complexity Sequence</i>
LDLR	<i>LDL Receptor</i>
LDLs	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LSm	<i>Like Sm</i>
luLDs	<i>Luminal lipid droplets</i>
LVP	<i>Lipo-viral particle</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation antigen 5</i>
MEH	Manifestation extra-hépatique

miR	micro-ARN
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
MLV	<i>Murine leukemia virus</i>
MPR	<i>Mannose-6-phosphate receptor</i>
MTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
MW	<i>Membranous Web</i>
NANBH	<i>non-A, non-B hepatitis</i>
Neo	Néomycine phosphotransférase
NK	<i>Natural killer</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like 1</i>
NPHV	<i>Non-primate hepacivirus</i>
NSAP1	<i>Mice minute virus NS1-associated protein 1</i>
nts	Nucléotides
OAS1	<i>Oligoadenylate synthase 1</i>
OCLN	Occludin
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PABP	<i>Poly(A) Binding Protein</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
Pb	Paires de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT1</i>
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PTB	<i>Polypyrimidine tract-binding protein</i>
PTV	<i>Porcine teschovirus</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
RACK1	<i>The Receptor for Activated C Kinase 1</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLRs	<i>RIG-I-like receptors</i>
NTPs	Nucléotides tri-phosphates
RdRp	<i>RNA-dependant RNA-polymerase</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i>

SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SMA	<i>Spinal Muscular Atrophy</i>
SMN	<i>Survival of Motor Neurons</i>
SNC	Système nerveux central
snRNAs	<i>Small nuclear ribonucleic acids</i>
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein</i>
SP	<i>Signal peptidase</i>
SPP	<i>Signal peptide peptidase</i>
SPV	<i>Simian picornavirus</i>
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B member 1</i>
SU	Sous-unité
SVF	Sérum de veau foetal
SVR	<i>Sustained Virological Response</i>
SYNCRIP	<i>Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein</i>
TBK1	<i>TNF receptor-associated factor family member-associated NF-κB activator-binding kinase-1</i>
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infectious dose 50</i>
Th	<i>T helper</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TRIF	<i>Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
TYK2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
UI	Unité internationale
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator transgene</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDLs	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculeuse

PREAMBULE

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est l'une des causes majeures d'infections chroniques du foie dans le monde. Conformément aux estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 130 à 170 millions de personnes seraient infectées de façon persistante par le VHC et seraient par conséquent exposées à un risque accru de développer des complications hépatiques, comme la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. L'existence d'un aussi grand réservoir de sujets porteurs du virus s'explique par une évolution asymptomatique de la maladie, avec 50 à 80% des personnes infectées qui évoluent vers la chronicité, car incapables d'éliminer le virus.

Malgré les efforts de la communauté scientifique, aucun vaccin n'est disponible à ce jour. De plus, le traitement de base de l'hépatite C chronique, largement prescrit depuis la fin des années 1990, est limité par sa toxicité, son coût très élevé et par son inefficacité chez un grand nombre de patients.

Ces dernières années, des thérapies antivirales nouvelles, telles que les antiviraux à action directe, ont vu le jour. Ce sont des molécules qui ciblent les protéines virales et, de ce fait, interfèrent avec des étapes clés de la réplication du VHC. Cependant, en raison du taux élevé de la variabilité génétique de ce virus, des cas de résistance ont déjà été rapportés suscitant des efforts supplémentaires pour la découverte de nouvelles pistes thérapeutiques.

L'une des stratégies adoptées au sein de notre laboratoire consiste à étudier de manière approfondie le réseau d'interactions virus-hôte, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques cellulaires et développer des antiviraux plus efficaces pour vaincre la résistance virale. En effet, le VHC comme d'autres virus, dépend de facteurs cellulaires pour accomplir son cycle viral et persister chez l'hôte. Certains de ces facteurs, indispensables pour le virus, pourraient constituer des cibles thérapeutiques de choix, à condition que leur inhibition n'altère pas les fonctions normales ou, du moins, vitales de la cellule hôte.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'étude de deux protéines cellulaires qui interagissent avec le VHC durant deux étapes différentes de son cycle viral. La première protéine est requise pendant l'étape de la traduction alors que la

deuxième est nécessaire à l'étape de l'assemblage. Dans ce manuscrit, est présentée une introduction faisant le point sur les connaissances actuelles se rapportant à l'hépatite C et aux protéines cellulaires nécessaires à la biologie du virus. Ensuite sont exposés les résultats de mes travaux. La dernière partie, comprend la conclusion et les perspectives liées à mes travaux.

INTRODUCTION

I. L'hépatite C

1. Découverte du virus de l'hépatite C

Durant les années 1970, suite au développement de tests sérologiques pour le diagnostic des virus de l'hépatite A (VHA) et de l'hépatite B (VHB), on s'est rendu compte qu'un grand nombre de cas d'hépatites résultant d'une transfusion sanguine n'était pas causé par ces virus. On a alors conclu qu'il y avait un troisième agent qui était responsable de ces hépatites, dites non-A non-B (NANBH pour *non-A, non-B hepatitis*) (Feinstone et al., 1975). Malgré les efforts de la communauté scientifique, l'agent étiologique de cette infection n'a pas pu être identifié par les méthodes de biologie et d'immunologie conventionnelles.

Le développement du modèle chimpanzé a constitué une phase de progrès importante ; en effet, l'injection de sérum de malades atteints d'hépatite NANBH à ces animaux a permis de reproduire les formes aiguë et chronique de cette hépatite (Alter et al., 1978). Dix années plus tard Choo et al, grâce à une approche de biologie moléculaire, ont établi, à partir de sérum de chimpanzés infectés, une banque d'expression d'ADNc. L'immunocriblage de cette banque par les sérums de patients atteints d'une hépatite NANBH a permis d'identifier un clone qui code pour un antigène associé à cette infection (Choo et al., 1989). Cette découverte a servi d'une part à identifier la séquence complète du génome à ARN du virus responsable de cette hépatite, aujourd'hui appelée hépatite C et d'autre part, à mettre au point, dès 1990, la première génération de tests sanguins ; ce qui a considérablement limité la propagation du VHC, transmis essentiellement par transfusion (Houghton, 2009).

2. Épidémiologie

L'hépatite C est une pandémie. Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 185 millions de personnes possèdent des anticorps anti-VHC ce qui représente environ 2,8 % de la population mondiale (Mohd Hanafiah et al., 2013).

On estime à 170 millions le nombre de personnes chroniquement infectées par le VHC. Cependant, il y a des différences marquées dans la prévalence selon les régions (Figure 1), mais également selon l'âge et les groupes à risques dans une même région. La prévalence estimée est de 400000 sujets chroniquement infectés en Australie et en Océanie, 14 millions dans les Amériques, 16 millions au Moyen-Orient, 17,5 millions en Europe, 28 millions en Afrique, et 83 millions en Asie. Les données publiées suggèrent que la plupart des populations en Amérique, en Europe occidentale et en Asie du Sud-Est ont des taux de prévalence inférieurs à 2,5%. Pour l'Europe de l'Est le taux de prévalence varie de 1,5% à 5%, celui de la région du Pacifique occidental de 2,5% à 4,9%, et celui du Moyen-Orient et l'Asie centrale de 1% à plus de 12%. En termes de chiffres absolus, la majorité des personnes infectées vivent en Asie centrale/ Asie du Sud-Est et les régions du Pacifique occidental. En France, environ 815 000 personnes sont porteuses du VHC, soit 1,3% de la population (Lavanchy, 2011).

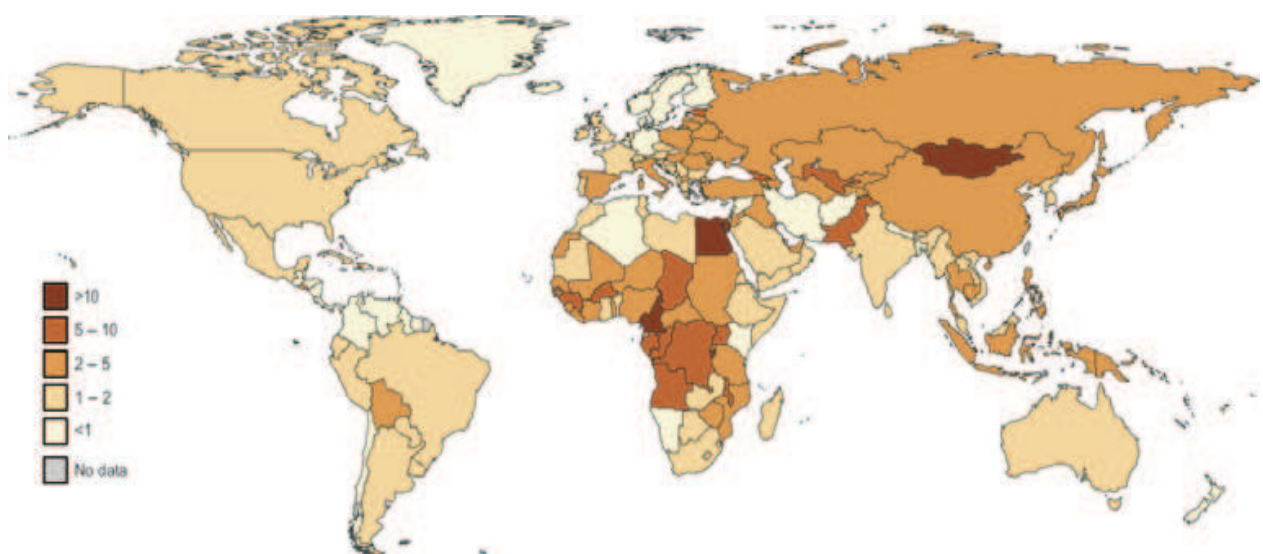


Figure 1. Prévalence de l'hépatite C dans le monde en 2010 d'après (Lavanchy, 2011).

3. Modes de transmission

La transmission du virus de l'hépatite C s'effectue le plus souvent par exposition à du sang contaminé dans les situations suivantes :

- La réception d'une transfusion sanguine, de produits sanguins ou d'un greffon contaminés étaient autrefois les voies majeures de transmission du VHC. Cependant, ce mode de transmission a été pratiquement éradiqué dans les régions du monde où les dons de sang sont testés pour les anticorps spécifiques et l'ARN du VHC (Thomas, 2013).
- Les injections réalisées avec des seringues contaminées ou blessures par piqûre d'aiguille en milieu médical. L'OMS a estimé que chaque année, dans les régions en voie de développement, il y a 3,4 piqûres accidentelles par personne. 39% de ces injections sont réalisées avec des équipements médicaux réutilisés, causant environ 330000 nouvelles infections par le VHC chaque année (Schreiber et al., 1996).

De même, d'autres pratiques percutanées comme le tatouage, les rites de scarification, circoncision et l'acupuncture ont transmis l'infection par le VHC dans le passé, et ils continuent à être d'importants modes de transmission lorsque les techniques de stérilisation appropriées ne sont pas respectées.

L'utilisation de drogues injectables est le mode de transmission dominant dans les régions économiquement développées. Par exemple, dans la dernière décennie aux États-Unis, l'injection de drogues représente plus des deux tiers des infections par le VHC (Williams et al., 2011).

Dans des situations beaucoup plus rares, l'hépatite C peut également se transmettre :

- De la mère à l'enfant pendant l'accouchement chez une mère infectée par l'hépatite C (Floreani, 2013).
- Lors de rapports sexuels avec une personne infectée, mais de manière beaucoup moins efficace que d'autres virus sexuellement transmissibles, tels que le VHB et le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine). La transmission sexuelle du VHC peut être augmentée par d'autres infections sexuellement transmissibles concomitantes avec des lésions génitales érosives ou par des

rapports sexuels traumatiques avec abrasion de la muqueuse génitale (Ghosn et al., 2005).

Bien que l'ARN du VHC ait été amplifié à partir de sperme, de salive, de larmes ou d'urines, il y a peu de preuves que ces fluides soient une source de transmission du virus. Sans doute parce qu'ils contiennent peu de virus intacts et/ ou une exposition percutanée à ces fluides est peu fréquente (Thomas, 2013). L'hépatite C n'est pas propagée par le lait maternel, les aliments ou l'eau ou encore par un simple contact tel qu'une étreinte, un baiser ou le partage de nourriture ou de boissons avec une personne infectée (OMS 2013).

4. Le foie, un organe cible

4.1. Physiopathologie du foie

Le foie est le plus grand organe du corps humain, il représente à lui seul 2 à 5% de la masse corporelle. Il a, à la fois, des propriétés endocrines et exocrines. Les fonctions endocrines comprennent la sécrétion d'angiotensinogène, de thrombopoïétine et de plusieurs hormones comme les facteurs de croissance. Tandis que la plus grande sécrétion exocrine est la bile. Le foie est également essentiel pour le stockage de glycogène, la détoxification, le contrôle du métabolisme, la régulation de la synthèse et le transport du cholestérol, le métabolisme de l'urée, et la sécrétion d'une vaste gamme de protéines plasmatiques, y compris l'albumine et les apolipoprotéines. Comme le foie est un tel régulateur important de processus physiologiques, les maladies hépatiques, comme la fibrose, la cirrhose ou encore le carcinome hépatocellulaire, entraînent des taux élevés de morbidité et de mortalité (Si-Tayeb et al., 2010).

Le foie possède une architecture tissulaire extrêmement complexe qui est essentielle pour une fonction hépatique normale. L'unité de base de l'architecture du foie est le lobule hépatique (Figure 2A et 2B). Le lobule est constitué de plaques d'hépatocytes bordés par des capillaires sinusoidaux qui rayonnent vers une veine centrale. Les lobules du foie ont une forme hexagonale. A chacun des six coins on retrouve l'espace porte qui contient une triade de vaisseaux constitués d'une veine porte, d'un canal biliaire et d'une artère hépatique (Figure 2C). La veine porte et l'artère hépatique permettent l'approvisionnement du lobule en sang qui s'écoule à travers un réseau de capillaires sinusoidaux avant de quitter le lobule à travers la veine centrale.

Bien que les hépatocytes représentent environ 70% du volume du foie, d'autres types cellulaires sont également présents tels que les cholangiocytes (cellules épithéliales biliaires), les cellules endothéliales, les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie), les cellules de Pit (cellules tueuses naturelles), et les cellules stellaires hépatiques (voir le tableau 1).

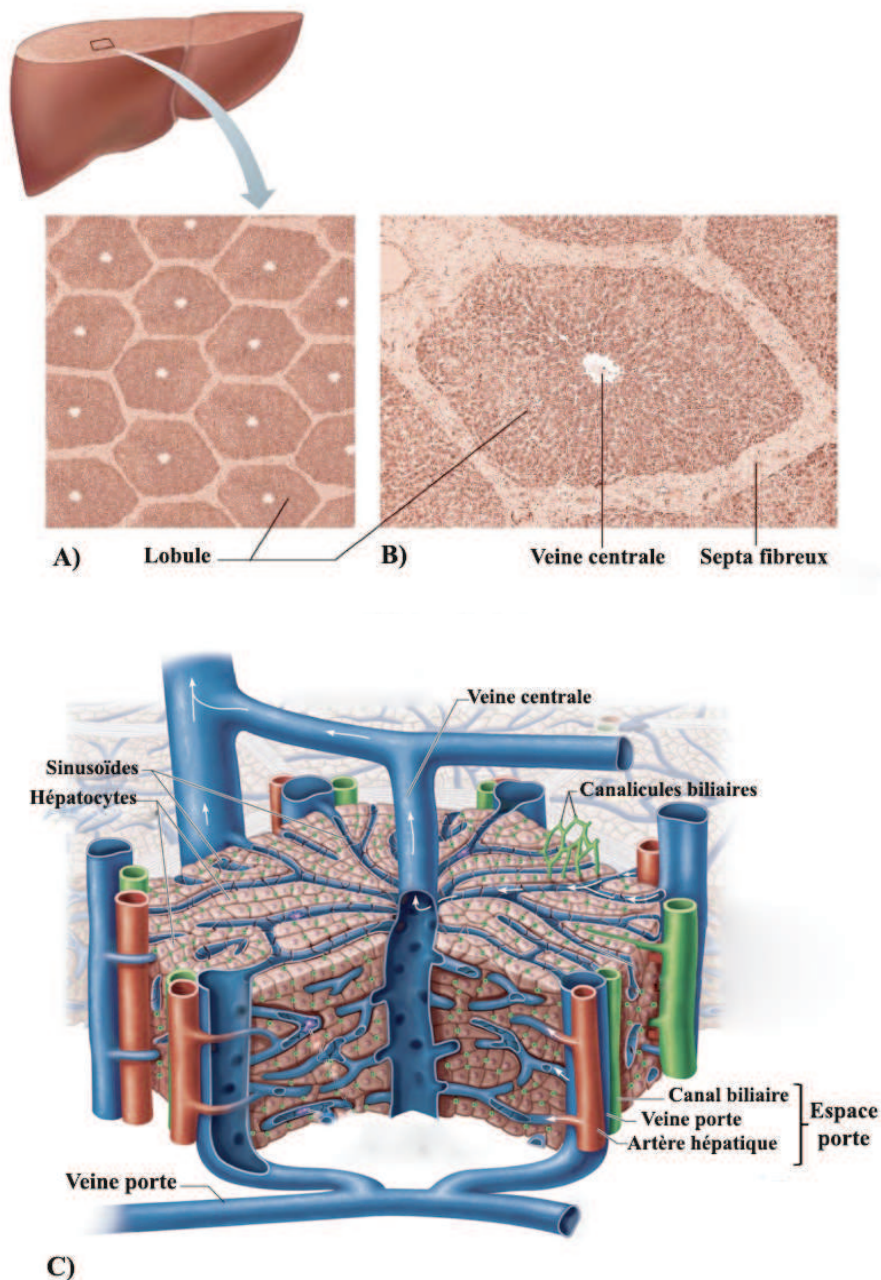


Figure 2. Architecture et organisation du foie.

A) Les cellules parenchymateuses du foie, les hépatocytes, se groupent en lobules. **B)** Les lobules sont limités par de fins septa de tissu collagénique de soutien. Ils sont grossièrement de forme hexagonale et renferment à chaque angle un espace porte. **C)** Les espaces portes renferment trois structures principales ; celle de plus grand calibre est une branche de la veine porte, les branches de l'artère hépatique et les canaux biliaires collecteurs. Le sang venant des espaces portes converge, par les sinusoides situés entre les travées hépatocytaires, vers la veine centrale dans chaque lobule. La bile est sécrétée à travers un réseau de minuscules canalicules biliaires situés entre les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes adjacents. Le réseau canaliculaire se draine ensuite dans un système de canaux biliaires collecteurs situés dans les espaces portes.

Tableau 1. Différents types de cellules hépatiques et leurs fonctions dans le foie adulte d'après (Si-Tayeb et al., 2010).

Type Cellulaire	Position dans le foie	Fonction
Hépatocytes ~ 70% des cellules hépatiques	Parenchyme	Sécrétion de protéines Sécrétion de la bile Métabolisme du cholestérol Détoxification Métabolisme de l'urée Métabolisme du glucose/ glycogène Coagulation sanguine
Cholangiocytes/cellules des canaux biliaires ~ 3% des cellules hépatiques	Epithélium du canal biliaire	Formation des canaux biliaires pour Transport de la bile Contrôle du débit d'écoulement de la bile Sécrétion d'eau et de bicarbonate Contrôle du pH de la bile
Cellules endothéliales	Système vasculaire	Formation des veines, des artères, des veinules et des artérioles Contrôle du débit sanguin Contribution à la zonation parenchymateuse
Cellules endothéliales sinusoïdales ~ 2,5% du parenchyme lobulaire	Sinusoïdes hépatique	Formation le plexus sinusoïdal Facilitation de la circulation sanguine Transfert de molécules et de protéines entre le sérum et les hépatocytes Fixation des déchets macromoléculaires Sécrétion de cytokines Présentation de l'antigène Coagulation sanguine
Cellules de Pit Rares	Cellules tueuses naturelles du foie	Activité cytotoxique
Cellules de Kupffer ~ 2% des cellules hépatiques	Sinusoïdes	Capturer les matières étrangères Sécrétion de cytokines, de proteases, etc.
Cellules stellaires hépatiques ~ 1,4% des cellules hépatiques	Périsinusoïdales	Maintien de la matrice extracellulaire, de la vitamine A, et le stockage des rétinoïdes Contrôle du tonus microvasculaire Sont activées pour devenir des myofibroblastes Contribuer à la réponse régénérative aux blessures La sécrétion de cytokines

Le sinusoiide est l'unité microvasculaire hépatique. Il a un revêtement endothélial qui se distingue par une fenestration de pores. Il est séparé des hépatocytes par l'espace de Disse, où se trouvent les cellules hépatiques stellaires (Figure 3A). Cet espace est une zone d'échange importante entre le sang circulant et les hépatocytes (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

Les jonctions serrées formées entre les hépatocytes voisins génèrent un canalicule qui entoure chacun des hépatocytes et est responsable de la collecte des acides biliaires et des sels biliaires qui sont transportés à travers la surface apicale de l'hépatocyte. La bile recueillie par les canalicules est conduite à des voies biliaires au niveau de l'espace porte et ensuite transportée pour le stockage dans la vésicule biliaire (Figure 2C) (Si-Tayeb et al., 2010).

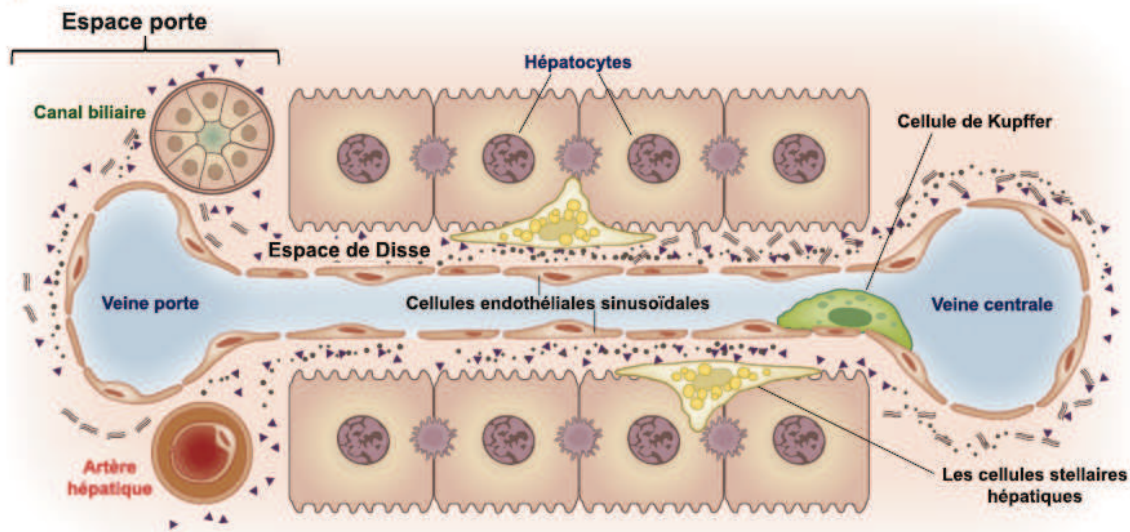
Distorsion de l'architecture hépatique normale : cirrhose

La fibrose hépatique est une réponse de cicatrisation réversible caractérisée par l'accumulation de matrice extracellulaire suite à une lésion du foie. Si la lésion est spontanée et limitée dans le temps, ces changements sont temporaires, et l'architecture du foie est restaurée. Toutefois, si la lésion est continue, l'inflammation chronique et l'accumulation de la matrice extracellulaire persistent, conduisant au remplacement progressif du parenchyme du foie par du tissu cicatriciel (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). La fibrose est principalement causée par l'hépatite B et C, les lésions hépatiques dues à la consommation excessive d'alcool, les maladies auto-immunes et la stéatose hépatique (Ishibashi et al., 2009).

Le dépôt de la matrice extracellulaire dans l'espace de Disse conduit à la perte des fenestrations normales qui sont caractéristiques de la paroi endothéliale (Figure 3B), ce qui provoque la dégradation de l'échange métabolique bidirectionnel entre le sang circulant et les hépatocytes. Ce processus est appelé capillarisation des sinusoides (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

La progression de la fibrose conduit à une cirrhose qui est caractérisée par le remplacement des tissus du foie par du tissu cicatriciel fibreux dense ainsi que la formation de nodules de régénération qui conduisent à une distorsion généralisée de l'architecture hépatique normale (Ishibashi et al., 2009). Le carcinome hépatocellulaire complique souvent la cirrhose (Ishibashi et al., 2009).

A) Foie normal



B) Foie fibrotique

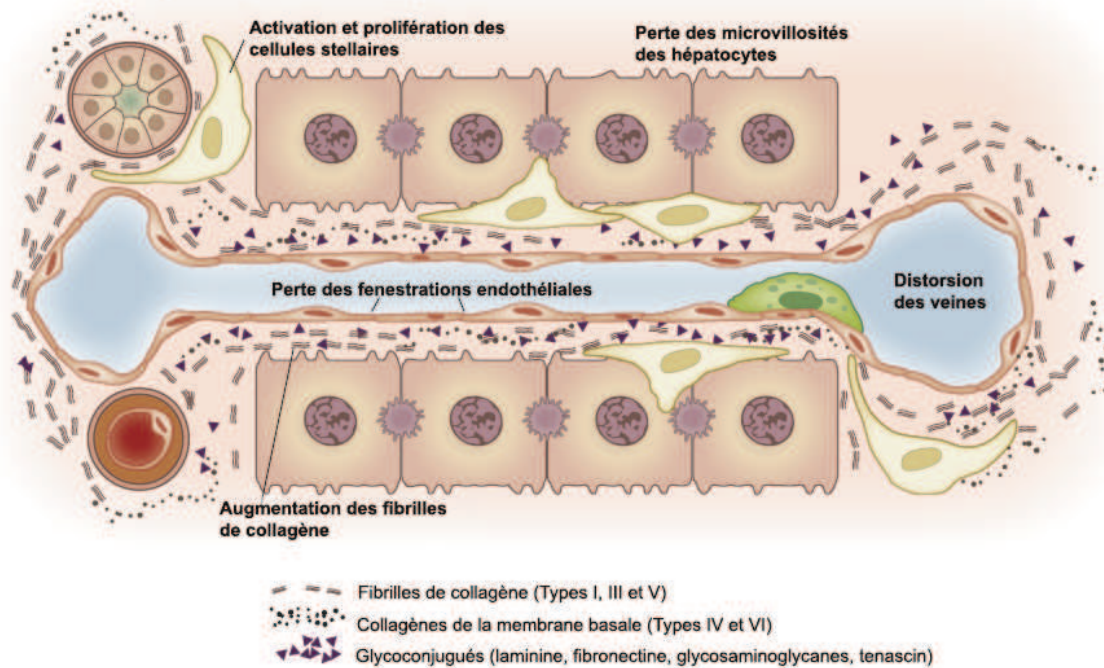


Figure 3. Altération matricielle et cellulaire dans la fibrose hépatique.

Un parenchyme normal du foie contient des cellules épithéliales (hépatocytes) et des cellules non parenchymateuses : Les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules stellaires hépatiques et les cellules de Kupffer. **A)** Les sinusoides sont séparées des hépatocytes par une membrane basale de faible densité qui permet un échange métabolique. Suite à une blessure, les cellules stellaires hépatiques sont activées et secrètent de grandes quantités de matrice extracellulaire (MEC), ce qui entraîne un épaississement progressif des septa. **B)** Le dépôt de la matrice extracellulaire dans l'espace de Disse conduit à la perte des fenestrations endothéliales et à la perte des microvillosités des hépatocytes, ce qui se traduit à la fois par la perte de l'échange métabolique bidirectionnel normal entre le débit de la veine porte et les hépatocytes et le développement de l'hypertension portale (Adapté de Hernandez-Gea and Friedman, 2011)

4.2. Histoire naturelle de l'hépatite C

Chez certains patients infectés par le VHC, la maladie est spontanément résolutive et l'ARN du VHC devient indétectable dans la plupart des cas dans les trois à quatre mois après le début de l'infection aiguë. Malheureusement, la clairance spontanée du VHC ne se produit que dans une minorité de cas, puisque 54 à 86% des patients adultes vont développer une infection chronique (Maasoumy and Wedemeyer, 2012).

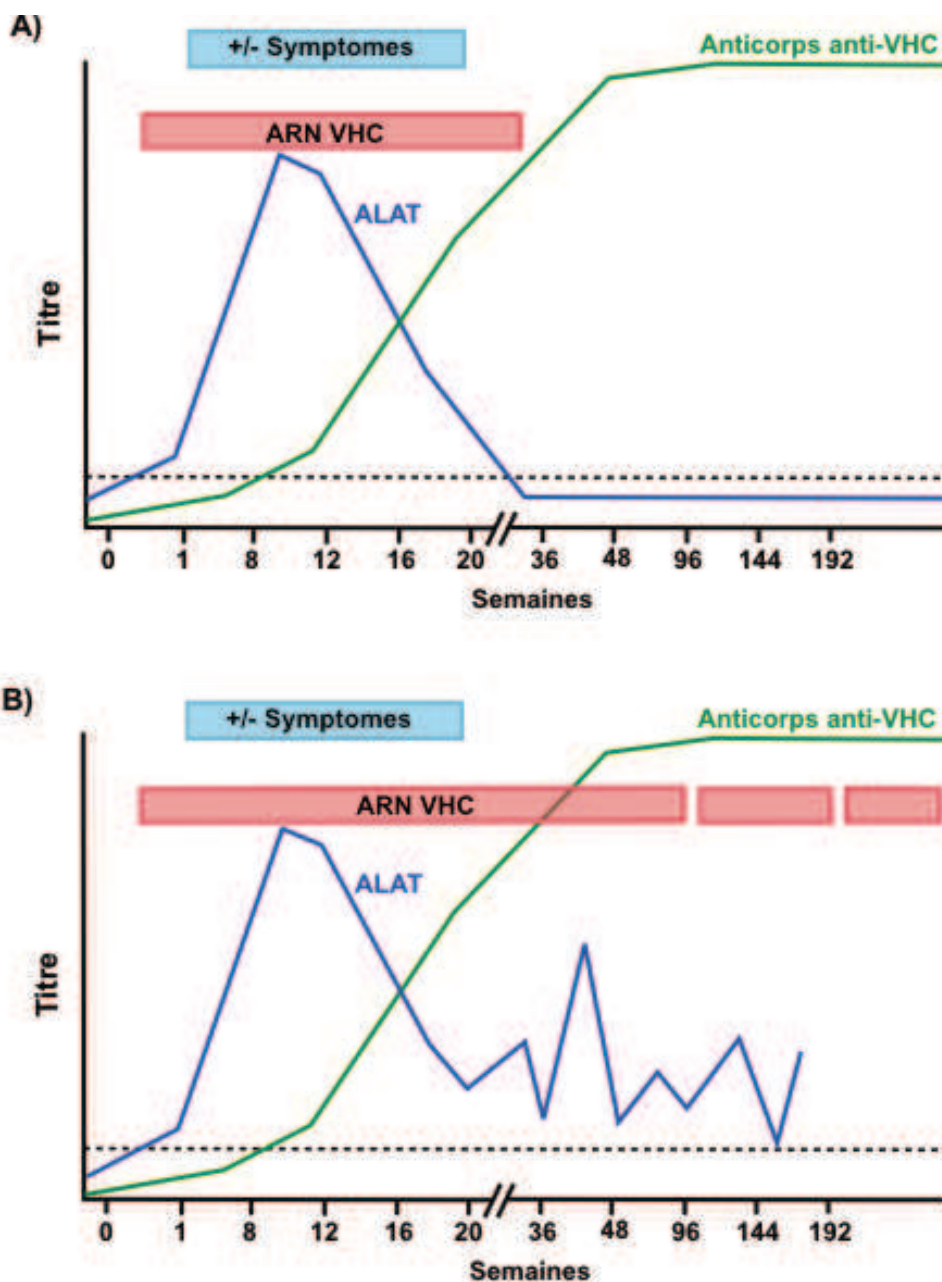


Figure 4. Cinétique des marqueurs virologiques durant l'infection par le VHC. A) Infection aiguë. B) Infection chronique (Adapté de Chevaliez, 2011).

4.2.1. Hépatite aigüe

La phase aigüe est définie par une virémie positive, (détection d'ARN VHC dans le sang du patient) et par une sérologie négative (absence d'anticorps anti-VHC dans le sérum du patient). L'ARN viral devient détectable dans le sérum dès 1 à 3 semaines après l'infection (Mosley et al., 2005). Les niveaux d'ARN du VHC augmentent rapidement après l'infection, suivis d'une augmentation retardée du taux d'alanine aminotransférase (ALAT) dans le sérum, 4 à 12 semaines après l'infection, indiquant une atteinte hépatique (Figure 4). Les taux d'ALAT atteignent souvent des valeurs dix fois supérieures à la normale, avec des hausses concomitantes de la bilirubine sérique.

Bien que la phase aigüe soit le plus souvent asymptomatique, certains patients développent des symptômes cliniques 2 à 12 semaines après la transmission virale. Les symptômes fréquemment rapportés sont la fatigue, des nausées, des douleurs abdominales, la perte d'appétit, une fièvre légère, des démangeaisons ou des myalgies. La jaunisse du foie, symptôme le plus spécifique, n'est pas observée chez 50 à 84% des patients atteints d'une infection aigüe. Des cas d'hépatite C aigüe fulminante ont été rapportés mais sont rares comparés à des infections par d'autres virus hépatotropes (Maasoumy and Wedemeyer, 2012).

4.2.2. Hépatite chronique

L'infection chronique est établie lorsque la réponse immunitaire de l'hôte n'est pas assez forte pour éliminer le virus. L'hépatite C chronique peut causer des dommages hépatiques conduisant à une cirrhose du foie et à un carcinome hépatocellulaire (CHC). L'évolution de la maladie hépatique est très variable. Les patients peuvent signaler des symptômes tels que l'inconfort abdominal du côté droit, des nausées, de la fatigue, des myalgies, des arthralgies ou une perte de poids. Cependant, tous ces signes cliniques sont peu caractéristiques et ne sont pas associés à la gravité des lésions du foie (Maasoumy and Wedemeyer, 2012). Seule la biopsie permet d'établir la gravité de l'atteinte du tissu hépatique. Chez les patients atteints d'une hépatite C chronique, l'histoire naturelle de la maladie évoluera dans 25% des cas vers une cirrhose, sur une période de 20 ans en moyenne, dont une proportion significative (environ 4% des cas) va développer un CHC (Lavanchy, 2009).

La cirrhose peut provoquer une ascite, une encéphalopathie et/ ou hémorragie variqueuse, une constellation d'événements appelée maladie hépatique en phase terminale se traduisant par une insuffisance hépatique. Le CHC peut provoquer les mêmes symptômes, plus la perte de poids, la jaunisse, ou la fièvre et il se produit généralement chez les personnes déjà atteintes d'une cirrhose. Sans traitement, la cirrhose et le CHC sont mortelles et expliquent la mortalité qui est directement attribuée à l'infection par le VHC (Thomas, 2013).

Les risques de cirrhose et CHC augmentent avec un certain nombre de facteurs de risque tels que l'âge, la durée de l'infection, le sexe (plus fréquents chez les hommes), la consommation excessive d'alcool et sont plus élevés chez les personnes co-infectées par le VHB ou le VIH (Maasoumy and Wedemeyer, 2012).

4.2.3. Manifestations extra-hépatiques

L'infection chronique par le VHC peut également causer des manifestations extra-hépatiques. 40 à 74% des patients infectés par le VHC développent au moins une manifestation extra-hépatique (MEH) au cours de leur vie. Pour certaines MEHs une relation de cause à effet est bien établie alors que d'autres associations sont beaucoup plus faibles. Les MEHs pourraient être la principale manifestation clinique de l'infection par le VHC et peuvent déterminer le pronostic global de la maladie.

La maladie qui est fortement liée à l'infection par le VHC est la cryoglobulinémie mixte (CM). La CM est définie par la présence de cryoglobulines dans le sang, qui sont des immunoglobulines qui précipitent à des températures inférieures à 37°C. Le dépôt de complexes immuns contenant la cryoglobuline dans les petits et moyens vaisseaux sanguins provoque une inflammation de la peau, des reins et / ou d'autres tissus (Thomas, 2013).

Le VHC semble également influencer le système métabolique. La prévalence globale de la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 est augmentée chez les patients atteints d'une infection chronique par le VHC. La résistance à l'insuline a un impact considérable sur l'évolution naturelle de cette infection et conduit à une progression plus rapide de la fibrose hépatique et une prévalence plus élevée du carcinome hépatocellulaire (Maasoumy and Wedemeyer, 2012).

Il existe également des associations complexes entre le VHC et le système nerveux central (SNC). Environ 20 à 80% des patients atteints d'une infection

chronique par le VHC se plaignent de fatigue qui est souvent prédominante et réduit considérablement leur qualité de vie. Les patients peuvent également développer une dépression ou une déficience cognitive générale, quel que soit le stade de la maladie du foie ([Maasoumy and Wedemeyer, 2012](#)). D'autres MEHs ont également été rapportées telles que les néphropathies, thyroépathies, le syndrome de Sjögren, la fibrose pulmonaire idiopathique, la porphyrie cutanée tardive, le lichen plan, la polyarthrite chronique, des cardiopathies et l'athérosclérose ([Zignego et al., 2007](#)).

5. Réponse Immunitaire de l'hôte

5.1. Réponse immunitaire innée

La première ligne de défense immunitaire contre le VHC repose sur l'immunité innée dans les hépatocytes. Cette réponse immunitaire sert à reconnaître le VHC comme « non-soi » et induit des défenses antivirales locales dans la cellule et dans le tissu infecté en recrutant et modulant l'action des cellules du système immunitaire pour mettre en place la réponse immunitaire adaptative. L'immunité innée est donc essentielle pour contrôler l'issue de l'infection par le VHC (Horner and Gale, 2013).

Lors de la réplication virale des éléments viraux appelés PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) sont reconnus par des récepteurs spécifiques, conduisant les hépatocytes infectés à induire rapidement une réponse interféron de type I et III (IFN I et III). Ces récepteurs peuvent être membranaires ou cytoplasmiques et comprennent des membres de la famille des récepteurs TLRs (*Toll-like receptors*) et les récepteurs RLRs (*RIG-I-like receptors*) (Schoggins and Rice, 2013).

L'accumulation de preuves suggère que les RLRs, en particulier RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*), dominant la réponse cellulaire lors de l'infection par le VHC. Les RLRs sont constitués de RIG-I, MDA5 (*Melanoma differentiation antigen 5*), et LGP2. Tandis que RIG-I et MDA5 reconnaissent les PAMPs des virus à ARN, LGP2 est impliquée dans la régulation de leur fonction (Schoggins and Rice, 2013). Les PAMPs qui sont reconnus par RIG-I lors d'une infection par le VHC sont typiquement le triphosphate exposé à l'extrémité du 5'UTR et les séquences riches en poly U/UC (Uracile et pyrimidines) en 3'UTR de l'ARN génomique du VHC (Horner and Gale, 2013).

Les TLRs sont également impliqués dans la reconnaissance des PAMPs. Le TLR3 qui est exprimé dans différents types cellulaires du foie (hépatocytes, les cellules de Kupffer et les macrophages résidents), est spécifiquement activé par l'ARN double brin (ARNdb) du VHC dans les endosomes (Horner and Gale, 2013).

La liaison de RIG-I ou du TLR3 aux PAMPs déclenche une cascade de signalisation en aval. Alors que RIG-I activé, recrute la molécule adaptatrice MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling protein*), TLR3 quant à lui, recrute la molécule

adaptatrice TRIF (*Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β*). Les deux processus conduisent à la phosphorylation des molécules de signalisation IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) et l'IRF7, ce qui va déclencher leur translocation dans le noyau et la transcription d'IFN I et III (Figure 5).

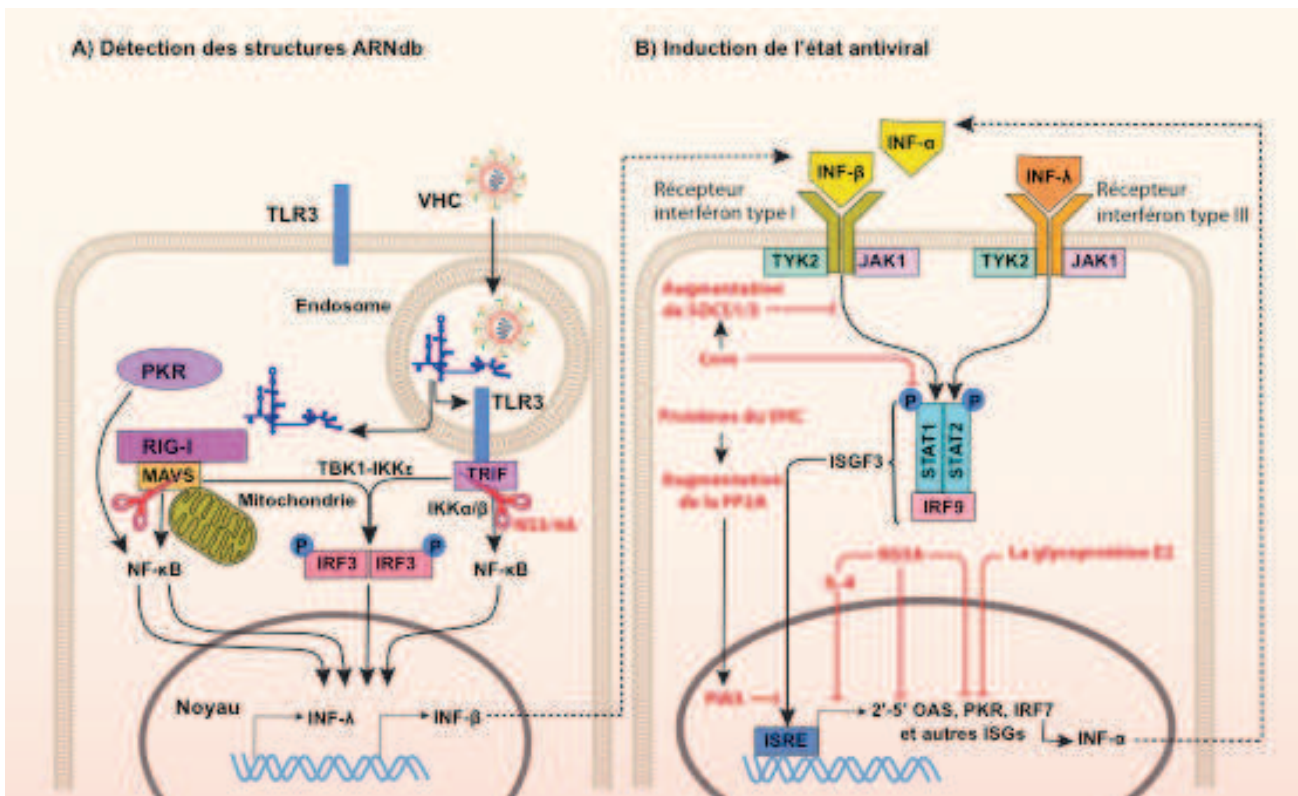


Figure 5. Le VHC atténue la réponse immunitaire innée.

A) Les hépatocytes détectent l'ARNdb du VHC via la PKR et les récepteurs RIG-I et TLR3. Les récepteurs RIG-I et TLR3 activent les molécules adaptatrices MAVS et TRIF, respectivement, NF-κB et les kinases IKKε et TBK1 qui phosphorylent le facteur de transcription IRF3, induisant sa dimérisation et sa translocation dans le noyau pour activer la transcription de l'IFN-β en synergie avec NF-κB. La protéase virale NS3/4A coupe les molécules adaptatrices MAVS et TRIF et bloque, par conséquent, les voies de signalisation RIG-I et TLR-3. **B)** La liaison de l'IFN-β au récepteur hétérodimérique IFNAR-1 et 2 (Récepteur d'IFN de type I), de même que la liaison de l'IFN-λ au récepteur hétérodimérique IL10RB et IL28RA (Récepteur d'IFN de type III) active la voie JAK/STAT. L'activation des kinases TYK2 et JAK1 induit la phosphorylation et l'assemblage du complexe de transcription trimérique ISGF3, constitué de l'hétérodimère STAT1-STAT2 et d'IRF9. Ce complexe se déplace dans le noyau et se lie au niveau de séquences spécifiques appelées ISREs (*IFN-stimulated response elements*) dans les régions promotrices des ISGs et induit la production de la 2'-5' OAS, PKR, IRF7, et autres ISGs. La protéine Core du VHC interfère avec la voie JAK/STAT en induisant SOCS1/3 et en inhibant la phosphorylation de STAT1. La polyprotéine du VHC induit la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui interfère avec la méthylation de STAT1, augmentant ainsi la liaison de STAT1 à son inhibiteur PIAS (*Protein inhibitor of activated STAT1*). L'interaction STAT1/PIAS altère la liaison du complexe ISGF3 aux ISREs et bloque la transcription des ISGs. Les protéines E2 et NS5A inhibent la fonction de plusieurs ISGs (Adapté de Horner and Gale, 2013; Rehmann, 2009).

Le génome humain code pour 14 gènes d'interféron de type I ; un pour l'IFN- β et 13 pour les différents sous-types de l'IFN- α . Pour l'interféron de type III, ou IFN- λ , les humains ont trois gènes ; *IL29* , *IL28A*, et *IL28B*, qui codent pour les protéines IFN- λ 1 , IFN- λ 2 , et IFN- λ 3, respectivement. En plus des IFNs, d'autres cytokines pro-inflammatoires peuvent être activées en fonction du virus entrant et de la voie d'activation. Une fois les IFNs produits, ils sont sécrétés par la cellule et agissent d'une manière autocrine ou paracrine pour promouvoir la signalisation antivirale ([Schoggins and Rice, 2013](#)).

Les IFNs de type I se lient à un récepteur hétérodimérique composé de IFNAR1 et IFNAR2, tandis que les IFNs de type III se lient à un récepteur hétérodimérique constitué de IL10RB et IL28RA. La liaison de l'IFN sur l'ectodomaine du récepteur induit le recrutement, au niveau de sa queue cytoplasmique, des kinases JAK1 et TYK2. L'activation des kinases et la phosphorylation conduit à la dimérisation de STAT1 et STAT2. Les hétérodimères STAT1/ STAT2 s'associent à IRF9 pour former le complexe transcriptionnellement actif ISGF3, entraînant ainsi la transcription de nombreux gènes spécifiques appelés ISGs (*Interferon stimulated genes*) ([Figure 5](#)). Collectivement, ces gènes facilitent à la fois l'élimination du virus par les cellules infectées et la protection des cellules voisines, non infectées, contre les virions nouvellement formés. Ils jouent un rôle également dans le recrutement de cellules immunitaires vers le site de l'infection et de favoriser la réponse immunitaire adaptative ([Schoggins and Rice, 2013](#)).

Parmi les ISGs on peut citer le système OAS1/ RNase L qui dégrade les ARNs viraux et cellulaires, et le système ADAR1 qui convertit les résidus d'adénosine en résidus inosine dans les ARNs double brins, déstabilisant ainsi les structures secondaires de l'ARN viral. Les ISGs comprennent également la protéine P56 et la PKR, qui inhibent la traduction des ARN viraux et cellulaires ([Rehermann, 2009](#)).

Un autre senseur de l'infection par le VHC, qui n'appartient ni à la famille des RLRs ni à celle des TLRs, est la protéine kinase PKR. Des études récentes ont permis de reconsidérer le rôle de cette protéine dans la réponse immunitaire innée. La PKR est initialement connue pour son activité kinase qui est activée lorsqu'elle se lie à un ARNdb, dont celui du VHC, et par conséquent inhibe la traduction coiffe-dépendante des ARNm cellulaires à travers la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2. Il a été montré récemment que la liaison de la PKR à l'ARNdb du VHC déclenche également une transduction de signal en cascade

indépendamment de son activité kinase et entraîne l'induction des ISGs et la production d'IFN- β à travers la signalisation par les molécules MAVS, TRAF3 et NF κ B, avant même l'activation de RIG-I (Horner and Gale, 2013).

Malgré la détection du VHC par RIG-I, TLR3 et PKR et le déclenchement d'une réponse immunitaire innée, environ 80% des personnes atteintes d'une infection aiguë par le VHC ne contrôlent pas efficacement le virus et développent une infection chronique. Cette fréquence élevée de l'infection chronique reflète le fait que le VHC a développé plusieurs mécanismes pour échapper à l'immunité innée.

La protéase virale NS3/4A est un élément central de la stratégie d'échappement viral au système immunitaire. En effet NS3/4A clive les molécules adaptatrices TRIF (Li et al., 2005a) et MAVS (Li et al., 2005b) et par conséquent bloque les voies de signalisation TLR3 et RIG-I (Figure 5).

Un second acteur clé est la protéine Core du VHC qui interfère avec la voie de signalisation JAK/ STAT et l'expression des ISGs à plusieurs niveaux par : (i) l'inhibition de l'activation de STAT1 et induisant sa dégradation (Lin et al., 2006), (ii) l'induction de SOCS3, un inhibiteur de la voie JAK/ STAT (Bode et al., 2003), et de la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui, par l'intermédiaire de l'induction d'autres molécules inhibitrices, réduit l'activité transcriptionnelle de ISGF3, et (iii) l'inhibition de la liaison de ISGF3 aux ISREs (*Interferon-stimulated response elements*).

D'autres protéines du VHC interfèrent également avec la fonction des ISGs. Par exemple, la protéine virale NS5A inhibe l'oligoadénylate synthétase (2'-5', OAS) et induit l'expression de l'IL-8, qui inhibe l'expression globale de tous les ISGs (Polyak et al., 2001). D'autre part, elle forme des hétérodimères avec la PKR et inhibe sa fonction (Gale et al., 1997). La glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC interagit également avec la PKR pour l'inhiber (Taylor et al., 1999).

Rôle des cellules NK

Les cellules NK (*Natural killer*) jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée, et peuvent contribuer à une immunité contre l'infection par le VHC. Elles sont connues pour leur cytotoxicité non spécifique contre les cellules qui sont reconnues comme non-soi, et sont recrutées au foie par l'IFN I sécrété peu de temps après l'infection. Les hépatocytes infectés par le VHC sont donc des cibles potentielles pour les cellules NK. Les cellules NK activées sont capables de tuer les

cellules cibles par l'intermédiaire de molécules cytotoxiques, tels que la perforine ou les granzymes, ou par l'intermédiaire des cytokines, telles que l'IFN- γ ou le TNF, conduisant à la suppression de la réplication virale et l'activation des réponses immunitaires adaptatives ultérieures (Spaan et al., 2012).

La fonction des cellules NK peut être directement affectée par la liaison de la protéine d'enveloppe E2 du VHC au récepteur CD81 présent à leur surface (Crotta et al., 2002). Néanmoins, des expériences *in vitro* ont montré que l'exposition des cellules NK de donneurs en bonne santé à des virions infectieux de VHC n'inhibait pas l'activation de ces cellules, ni la production d'IFN- γ (Yoon et al., 2009).

Rôle des cellules dendritiques

Outre les cellules NK, les cellules dendritiques (DCs pour *Dendritic Cells*) sont également des acteurs clés dans le déclenchement des réponses immunitaires. Les DCs sont des cellules présentatrices d'antigènes du système immunitaire des mammifères. Elles agissent comme des messagers entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif.

Lorsqu'elles rencontrent un agent pathogène, les DCs sont activées, ce qui se caractérise par la régulation positive de molécules du CMH II, de molécules co-stimulatrices et d'adhésion, ainsi que par la production de chimiokines et de cytokines. Les DCs activées vont alors migrer dans les ganglions lymphatiques, où elles établissent une interaction intime avec les cellules T auxiliaires appelées Th (*T helper*) et les cellules cytotoxiques CD8+, conduisant à l'activation du compartiment des cellules T (Spaan et al., 2012). La force de l'interaction entre les DCs et les cellules T, et la production de cytokines spécifiques telles que l'IFN- α ou d'IL-12 peut déterminer le développement des cellules T vers des cellules Th1 produisant l'IFN- γ ou vers des populations de cellules T alternatives.

Deux types de DCs humaines ont été identifiés ; Les DCs plasmacytoïdes et les DCs myéloïdes classiques. Elles diffèrent phénotypiquement et fonctionnellement. Tandis que les DCs myéloïdes sont considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes classiques. Elles sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs et faciliter leur développement en cellules Th1 via la sécrétion d'IL-12. Les DCs plasmacytoïdes sont, quant à elles, moins efficaces dans

l'activation des cellules T, mais sont spécialisées dans la production d'IFN I et III (Spaan et al., 2012).

Il a été suggéré que la fonction des DCs myéloïdes dans l'infection par le VHC est entravée en raison d'une diminution de la présentation des antigènes aux cellules T CD4+ causée par les protéines du VHC. De plus, la production d'IL-12 dans ces cellules serait inhibée par la protéine virale Core (Waggoner et al., 2007).

D'autre part, il a été observé chez les patients atteints d'une infection chronique par le VHC, que la fréquence des DCs plasmacytoïdes dans le sang, ainsi que leur capacité à produire de l'IFN- α est réduite (Rehermann, 2009). Deux mécanismes ont été proposés ; Le premier, implique les protéines virales NS3 et Core qui activent les monocytes *via* le TLR2 pour produire du TNF- α , qui a son tour inhibe la production d'IFN- α et induit l'apoptose des DCs (Dolganiuc et al., 2006). Le deuxième, implique que le VHC lui-même inhibe la production d'IFN- α dans les DCs. Ce mécanisme ne nécessite pas que ces cellules soient infectées, puisque le même effet est observé en présence de particules infectieuses ou inactivées et n'est pas abolit par des anticorps neutralisants (Shiina and Rehermann, 2008).

5.2. Réponse immunitaire adaptative

Les réponses immunitaires adaptatives comprennent les réponses immunitaires humorales et cellulaires.

5.2.1. La réponse humorale

Les patients immunocompétents développent des anticorps spécifiques du VHC à une phase précoce de l'infection, la plupart du temps autour du pic des enzymes hépatiques ou ALAT (Figure 4). Bien que les anticorps anti-VHC *in vivo* soient dirigés contre plusieurs protéines du virus (Chen et al., 1999), la plupart d'entre eux n'ont pas d'effet antiviral. En effet, seul un petit sous-ensemble d'anticorps spécifiques, appelés anticorps neutralisants, sont capables de prévenir l'infection et la propagation du virus en bloquant l'étape d'entrée et/ ou de post-entrée virale (Neumann-Haefelin and Thimme, 2013). Ils sont spécifiquement dirigés contre les protéines d'enveloppe du virus, en particulier la glycoprotéine d'enveloppe E2 (Fafi-Kremer et al., 2012).

Le rôle de la réponse humorale dans le contrôle de l'infection par le VHC est très controversé. En effet, il a été rapporté que le VHC pouvait être éliminé sans réponse immunitaire humorale chez des patients immunodéprimés (par exemple, chez les hypogammaglobulinémiques) (Christie et al., 1997), suggérant que les anticorps ne sont pas indispensables. De plus, un certain nombre d'études a rapporté l'absence d'association entre les anticorps neutralisants et la clairance virale (Logvinoff et al., 2004). Néanmoins ces études étaient basées sur l'utilisation d'un inoculum viral mal défini et des populations hétérogènes de patients. En effet, chez les patients immunocompétents, des anticorps neutralisants apparaissent tardivement et sont isolats spécifiques, ce qui nécessite la génération de particules virales avec des séquences spécifiques au patient pour détecter ces anticorps dans des essais de neutralisation *in vitro* (Rehermann, 2009).

Une autre étude, menée sur des patients infectés par un inoculum viral connu issu d'une seule source d'infection (VHC génotype 1b souche AD78, transmis par une préparation d'immunoglobulines contaminées), a quant à elle apporté des preuves claires du rôle important des anticorps neutralisants dans la clairance virale. En effet, il a été observé dans cette étude que la résolution spontanée de l'infection par le VHC est associée à un développement précoce d'anticorps neutralisants, alors que l'infection persistante est associée à une induction retardée d'anticorps neutralisants (Pestka et al., 2007).

Les anticorps neutralisants augmentent en titre et en ampleur, présentant généralement une réactivité croisée contre plusieurs génotypes du VHC une fois que l'infection chronique est établie. Bien qu'ils ne parviennent pas à se débarrasser du virus à ce stade, ils continuent à exercer une pression de sélection sur les variants viraux et contribuent donc à l'évolution des séquences d'enveloppe du VHC tout au long de l'infection. La concentration globale des immunoglobulines G (IgG) et la fréquence des cellules B sécrétant des IgG sont également augmentées dans l'hépatite C chronique (Rehermann, 2009). Cependant, le fait que les patients restent infectés de façon persistante, malgré la présence de titres élevés en anticorps neutralisants, indique que ces derniers ne sont pas efficaces. Probablement à cause de la grande variabilité génique du VHC et de la sélection de variants qui échappent sans cesse aux anticorps.

5.2.2. La réponse cellulaire

L'infection aiguë, définie comme la période de six mois suivant l'infection réelle, est caractérisé par une forte réponse des lymphocytes T contre le virus chez les patients qui résolvent l'infection. En effet, il a été observé que la diminution du titre viral coïncidait précisément avec l'apparition de cellules T spécifiques du VHC et de l'expression de l'IFN- γ dans le foie, suggérant clairement l'implication des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection et la clairance virale (Spaan et al., 2012).

Les preuves les plus convaincantes sur l'importance des cellules T dans la réponse antivirale, proviennent d'études réalisées sur le chimpanzé et montrent un rôle important aussi bien des cellules T CD4+ que T CD8+ dans le contrôle de l'infection par le VHC. La séquestration de cellules T CD4+ par injection d'anticorps neutralisants chez des chimpanzés infectés s'est traduite par la persistance de l'infection et l'émergence de variants d'échappement aux cellules T CD8+ (Grakoui et al., 2003). De même que l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre les cellules T CD8+, pour inhiber leur fonction, a conduit à une persistance virale mais qui diminue avec le rétablissement de la réponse des cellules T CD8+ spécifiques du VHC suite à leur régénération dans le foie (Shoukry et al., 2003).

Le phénomène d'épuisement des cellules T

Bien que initialement importante au cours de la phase aiguë de l'infection, la réponse des lymphocytes T est beaucoup plus faible au cours de la phase chronique, à cause de l'épuisement des cellules T. En effet, l'exposition continue à des niveaux élevés d'antigènes viraux conduit à une perte des fonctions effectrices des cellules T spécifiques du virus. La perte de fonction est progressive ; le potentiel de prolifération et la production d'IL-2 sont perdus en premier, suivis par la perte de la production de TNF, et dans les phases les plus extrêmes de l'épuisement, la production d'IFN- γ est également perdue (Wherry, 2011). L'état d'épuisement peut être déterminé par la présence d'un certain nombre de récepteurs d'inhibition à la surface des cellules T CD8+ tels que PD-1, CTLA-4, 2B4, BTLA, CD160 et TIM-3. Il a été montré que l'inhibition de ces récepteurs individuellement ou ensemble permet de restaurer la fonction de ces cellules *in vitro* (Barber et al., 2006).

De nombreuses études ont montré l'importance des cellules T régulatrices et des cytokines immunosuppressives dans la suppression de la réponse des cellules T spécifiques du VHC. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les cytokines IL-10 et TGF- β peuvent limiter la clairance virale dans les infections chroniques en inhibant la prolifération et la fonction des cellules T effectrices ou d'autres cellules immunitaires.

Les Treg sont des cellules T CD4⁺ caractérisées par l'expression de la molécule de surface CD25 et du facteur de transcription FoxP3. Elles régulent l'activité des cellules T soit directement ou indirectement en modulant les cellules présentatrices d'antigène. L'augmentation du nombre de Treg aussi bien circulants qu'intra-hépatiques a été rapportée chez les patients atteints d'une hépatite C chronique par rapport aux individus sains. Dans le sang, ces cellules sont capables de supprimer à la fois la prolifération des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques du VHC ainsi que la production d'IFN- γ par ces cellules ([Rushbrook et al., 2005](#)).

Outre les Treg, d'autres études ont montré que le blocage de l'IL-10 ou TGF- β peut améliorer la prolifération des cellules T spécifiques du VHC et la production d'IFN- γ . De plus, des niveaux plus élevés de l'IL-10 et TGF- β ont été détectés dans le sérum de patients ayant une hépatite C chronique par rapport à des individus en bonne santé ([Brady et al., 2003](#); [Rowan et al., 2008](#)). De nos jours, il est généralement admis que l'IL-10, TGF- β et Treg sont impliqués dans le contrôle et la régulation de l'immunité spécifique contre le VHC ([Spaan et al., 2012](#)).

6. Techniques de diagnostic

Le diagnostic virologique et la surveillance de l'infection par le VHC repose sur l'utilisation d'une variété de marqueurs virologiques. Quatre marqueurs du VHC peuvent être utilisés dans la pratique clinique : Les anticorps anti-VHC, l'antigène de la protéine de capsid Core, l'ARN du VHC et le génotype du VHC.

Détection des anticorps anti-VHC

Les anticorps anti-VHC apparaissent en moyenne 2 à 8 semaines après la phase aiguë de l'infection et persistent à vie chez les patients qui développent une infection chronique (Figure 4). La détection et la quantification d'anticorps spécifiques, dans les différents fluides, est basée sur l'utilisation de dosage immunologique en sandwich (EIAs pour *Enzyme ImmunoAssays*). Des antigènes recombinants sont utilisés pour capturer les anticorps circulants dans les puits de plaques de microtitration, de microbilles ou de portoirs spécifiques adaptés aux appareils automatiques. La présence des anticorps est révélée par des anti-anticorps marqués par une enzyme qui catalyse la transformation d'un substrat en un composé coloré (Chevaliez, 2011).

Détection et quantification de l'antigène de la capsid du VHC

L'antigène de la protéine de capsid Core est détecté dans le sang périphérique d'individus infectés et son niveau est proportionnel à celui de l'ARN viral. La quantification de l'antigène Core pourrait être utilisée comme alternative aux techniques de quantification de l'ARN car il est facile à réaliser dans un format de dosage immunologique, coûte moins cher, et est moins susceptible aux contaminations d'échantillons que les tests moléculaires basés sur l'amplification de l'ARN viral. Néanmoins, cette technique est moins sensible. De plus, le ratio de l'antigène Core sur l'ARN viral peut varier légèrement d'un patient infecté à un autre. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'antigène de capsid est présent à la fois dans les particules virales complètes et les particules vides (qui ne contiennent pas d'ARN) circulant dans le sang périphérique (Chevaliez, 2011).

Détection et quantification de l'ARN du VHC

La présence d'ARN du VHC dans le sang périphérique est un marqueur fiable de la réplication virale. L'ARN du VHC peut être détecté 1 à 3 semaines après l'infection (approximativement un mois avant l'apparition des anticorps anti-VHC). La présence d'ARN au delà de 6 mois après l'infection initiale indique l'établissement de la chronicité.

Les niveaux d'ARN du VHC sont exprimés en unité internationale (UI) qui est utilisée dans tous les tests de dosage quantitatifs commerciaux. Tous les tests disponibles ont une limite inférieure de détection de 10 à 15 UI/ ml et une spécificité satisfaisante (Chevaliez and Pawlotsky, 2012). La détection et la quantification de l'ARN du VHC est très utile en pratique clinique pour : (i) diagnostiquer une infection chronique ; (ii) identifier les patients qui ont besoin d'une thérapie antivirale ; (iii) surveiller la réponse virologique aux traitements antiviraux ; (iv) renseigner sur l'échec du traitement (Chevaliez, 2011).

Détermination du génotype du VHC

Le séquençage direct, également appelé séquençage de « population » fournit la séquence complète du fragment analysé et est considéré comme le « Gold standard » pour l'analyse de la séquence génomique. Le VHC étant classifié en 7 génotypes différents et en un grand nombre de sous-types. La région virale séquencée doit être choisie avec soin, afin de permettre un typage et un sous-typage précis. Néanmoins, des alternatives aux techniques de séquençage ont été développées pour une utilisation clinique de routine. Les tests couramment utilisés sont basés sur l'hybridation inverse ou sur la PCR en temps réel.

Alors que l'hybridation inverse consiste à hybrider l'amplicon PCR d'une région du génome du VHC à des séquences anti-sens de référence. La PCR en temps réel utilise des amorces et des sondes spécifiques des différents génotypes du VHC.

La détermination du génotype du VHC est nécessaire avant l'initiation du traitement, car elle permet de déterminer à la fois la dose et la durée de celui-ci (Chevaliez and Pawlotsky, 2012).

Des tests alternatifs aux tests de laboratoire

Ces tests sont directement utilisés sur les sites de soins des patients, en dehors des laboratoires de biologie, et nécessitent des échantillons de sang entier. Ils contiennent des dispositifs pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC à partir d'un échantillon de sang prélevé au bout du doigt du patient dans un tube capillaire. Ces essais peuvent être particulièrement utiles pour le dépistage à grande échelle et l'amélioration de l'accès aux soins dans les régions où il n'y a pas de laboratoires de biologie moléculaire ([Chevaliez and Pawlotsky, 2012](#)).

7. Traitements actuels

Depuis plus de 10 ans, le traitement de l'hépatite C chronique a été basé sur la combinaison d'interféron alfa (IFN- α) pégylé et la ribavirine, administrée pendant 24 ou 48 semaines. Le point final de la réussite du traitement est la réponse virologique soutenue (SVR ; *Sustained Virological Response*), caractérisée par l'absence d'ARN viral dans le sérum (<10 à 15 UI / mL), 24 semaines après la fin du traitement, correspondant dans plus de 99% des cas à l'élimination du virus à long terme (Pawlotsky, 2013). Ce schéma thérapeutique a abouti à des taux de SVR de 70 à 80% chez les patients atteints du génotype 2 ou 3, des taux de 50% chez les patients atteints du génotypes 1 ou 4, et des taux intermédiaires pour les génotypes 5 et 6 (Scheel and Rice, 2013).

La recherche fondamentale qui a permis de comprendre les mécanismes moléculaires du cycle viral du VHC et la résolution des structures tridimensionnelles de plusieurs protéines virales ont entraîné le développement de nouvelles molécules antivirales pour le traitement de l'infection par le VHC qui peuvent être regroupées en deux grandes catégories en fonction de leur cible d'action. La première catégorie regroupe les DAAs (*Direct-Acting Antivirals*) dont les agents antiviraux agissent directement sur les cibles virales. La deuxième catégorie comprend les HTAs (*Host-Targeting Agents*) qui ciblent les protéines de l'hôte qui sont essentielles à la réplication du VHC. Du fait que leur cible est une protéine de l'hôte, ces agents ont une activité antivirale plus large et une barrière de résistance plus élevée (Liang and Ghany, 2013).

7.1. Les DAAs

En ce qui concerne les DAAs, les premiers efforts se sont concentrés sur deux enzymes virales, la protéase à sérine NS3/4A, qui assure le clivage et la maturation de la polyprotéine du VHC, et l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B (Liang and Ghany, 2013).

7.1.1. Les inhibiteurs de la protéase NS3-4A

Les inhibiteurs de la protéase NS3-4A sont des composés peptidomimétiques. Ils se lient au site catalytique de l'enzyme et bloquent la maturation post-traductionnelle de la polyprotéine virale empêchant la libération de protéines non-structurales fonctionnelles (Pawlotsky, 2014).

Deux inhibiteurs de la protéase virale NS3-4A, le telaprevir (Vertex/Janssen) et le boceprevir (Merck), ont été approuvés en Europe et aux Etats-Unis en 2011, en association avec l'IFN- α et la ribavirine pour le traitement de l'hépatite C chronique liée au VHC du génotype 1, uniquement. Ces deux schémas de triple thérapie entraînent des réponses aux traitements similaires, ayant permis d'atteindre des taux de guérison de 70% (Sarrazin et al., 2012). En revanche, la combinaison d'IFN- α et de ribavirine reste la thérapie recommandée pour les infections dues aux autres génotypes (2 à 7) du VHC (Pawlotsky, 2013).

Bien que les régimes de triple thérapie soient plus efficaces que le régime classique (INF- α et ribavirine sans inhibiteur de protéase), ils ont plus d'effets secondaires et sont plus compliqués à respecter ; les patients doivent prendre un plus grand nombre de pilules et nécessite une prise de pilules toutes les 8 heures (Liang and Ghany, 2013). Les effets secondaires les plus communs avec le boceprevir sont l'anémie (un niveau de <10 g d'hémoglobine par décilitre), la neutropénie et la dysgueusie (altération du goût), et les effets secondaires les plus communs avec le telaprevir sont l'anémie, l'éruption cutanée, et l'inconfort ano-rectal. L'anémie qui est présente dans 36 à 50% des cas, est la complication la plus difficile à gérer (Liang and Ghany, 2013).

Le telaprevir aussi bien que le boceprevir ont une faible barrière de résistance. Ils font partie de ce qu'on appelle la première vague de la première génération des inhibiteurs de protéase NS3-4A. Un certain nombre de molécules de la deuxième vague, de la première génération ont atteint la phase II ou III de développement clinique (Tableau 2), y compris le simeprevir (Janssen) qui a été approuvé en Novembre 2013 aux Etats-Unis, et en Mai 2014 dans l'Union européenne. Ces médicaments sont administrés une ou deux fois par jour. Ils sont actifs au moins contre les génotypes 1, 2, et 4, mais aucun d'eux n'est efficace contre le génotype 3. Ils ont une faible barrière de résistance et partagent une vaste résistance croisée avec le telaprevir et le boceprevir (Pawlotsky, 2014).

Les inhibiteurs de la deuxième génération, tels que le MK-5172 (Merck) ou ACH-2684 (Achillion), sont censés avoir une activité antivirale pangénotypique, y compris sur le génotype 3. Toutefois, leur efficacité antivirale contre ce génotype est moindre comparé aux autres génotypes. Ils ont une barrière de résistance plus élevée que les médicaments de première génération (Pawlotsky, 2014).

Tableau 2. Les DAAs et les HTAs en développement clinique à l'aube de 2014 d'après (Pawlotsky, 2014).

Classe	Génération	Composé	Fabriqueur	Phase clinique
Les inhibiteurs de protéase NS3-4A	Première vague, première génération	Telaprevir	Vertex, Janssen, Mitsubishi	Approuvé
		Boceprevir	Merck	Approuvé
	Deuxième vague, première génération	Simeprevir	Janssen	Approuvé
		Faldaprevir	Boehringer-Ingelheim	III
		Asunaprevir	Bristol-Myers Squibb	III
		ABT-450/r	Abbvie	III
		Danoprevir/r	Roche	II
		Sovaprevir	Achillion	II
		Vedoprevir	Gilead	II
		IDX320	Idenix	II
		Vaniprevir	Merck	III (Japan)
	Deuxième génération	MK-5172	Merck	III
		ACH-2684	Achillion	II
Les analogues nucléosidiques/nucléotidiques	Les analogues nucléotidiques	Sofosbuvir	Gilead	Approuvé
		VX-135	Vertex	II
	Les analogues nucléosidiques	Mericitabine	Roche	II
Les inhibiteurs non nucléosidiques de NS5B	Inhibiteurs du domaine I du pouce	BMS-791325	Bristol-Myers Squibb	III
		TMC647055	Janssen	II
	Inhibiteurs du domaine II du pouce	Lomibuvir	Vertex	II
		GS-9669	Gilead	II
	Inhibiteurs du domaine I de la paume	ABT-333	Abbvie	III
		ABT-072	Abbvie	II
		Setrobuvir	Roche	II

Suite tableau 2. Les DAAs et les HTAs en développement clinique à l'aube de 2014 d'après (Pawlotsky, 2014).

Classe	Génération	Composé	Fabriquant	Phase clinique
Les inhibiteurs de NS5A	Première génération	Daclatasvir	Bristol-Myers Squibb	III
		Ledipasvir	Gilead	III
		ABT-267	Abbvie	III
		PPI-668	Presidio	II
		PPI-461	Presidio	II
		GSK2336805	GlaxoSmithKline	II
		BMS824393	Bristol-Myers Squibb	II
		Samatasvir	Idenix	II
	Deuxième génération	MK-8742	Merck	II
		ACH-3102	Achillion	II
GS-5816		Gilead	II	
Les inhibiteurs de la cyclophiline A	Première génération	Alisporivir	Novartis	II
		SCY-635	Scynexis	II
L'antagoniste du miR-122	Première génération	Miravirsén	Santaris	II

7.1.2. Les inhibiteurs de NS5B

Pour ce qui est de la polymérase NS5B, il y a deux sortes d'inhibiteurs ; les analogues nucléosidiques/ nucléotidiques et les inhibiteurs non nucléosidiques.

Les analogues nucléosidiques/ nucléotidiques agissent comme de faux substrats pour l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC. Ils conduisent à une terminaison de chaîne après avoir été incorporés dans l'ARN viral nouvellement synthétisé (Haudecoeur et al., 2013). Les analogues nucléosidiques, comme mericitabine (Roche), ont besoin de trois phosphorylations pour être activés. En revanche, les analogues nucléotidiques, tels que sofosbuvir (Gilead) et VX-135 (Vertex), n'ont besoin que de deux phosphorylations, les rendant plus rapidement actifs au niveau du site d'action (Tableau 2). En raison de leur mécanisme d'action, les analogues nucléosidiques/ nucléotidiques sont actifs contre tous les génotypes du VHC. Ils ont une forte barrière de résistance, parce que les variants viraux

sélectionnés n'arrivent pas à se répliquer à des niveaux élevés *in vitro* ou *in vivo* (Pawlotsky, 2014).

Les inhibiteurs non nucléosidiques se lient à l'un des quatre sites allostériques sur la surface de l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC. En modifiant la conformation de cette enzyme, ils bloquent sa fonction catalytique, inhibant ainsi indirectement la réplication de l'ARN. L'ARN polymérase du VHC a la forme d'une main droite, avec un pouce, une paume, et des doigts. Les inhibiteurs non nucléosidiques sont divisés en 4 groupes : les inhibiteurs de pouce domaine I, les inhibiteurs de pouce domaine II, de la paume domaine I, et la paume domaine II (Tableau 2) (Haudecoeur et al., 2013). Les inhibiteurs non nucléosidiques de première génération de NS5B sont généralement actifs contre le génotype 1 seulement et ont une faible barrière de résistance. La deuxième génération des inhibiteurs non nucléosidiques sont en phase de développement préclinique. Ils ont une activité génotypique plus large et une barrière de résistance plus élevée (Pawlotsky, 2014).

7.1.3. Les inhibiteurs de NS5A

Les inhibiteurs de la protéine NS5A se lient au domaine I de cette protéine et bloquent sa capacité à réguler la réplication du VHC. De plus, ils inhibent l'assemblage et la libération de particules virales (Kohler et al., 2014). Ce double mécanisme permet un arrêt efficace et rapide de la production du virus dès les premiers jours de leur administration.

Les inhibiteurs NS5A de première génération sont actifs contre les génotypes 1 et 4 ; tous ne sont pas actifs contre les génotypes 2 et/ ou 3. Ils ont une faible barrière de résistance. Les inhibiteurs de deuxième génération sont actifs contre tous les génotypes du VHC, mais certains d'entre eux sont moins actifs contre les génotypes 2 et 3 comparé aux autres génotypes. Leur barrière de résistance est améliorée par rapport aux inhibiteurs NS5A de première génération (Pawlotsky, 2014).

Des protéines virales supplémentaires, telles que la protéine de la capsid core, p7 , et NS4B, sont à l'étude en tant que cibles thérapeutiques (Liang and Ghany, 2013).

7.2. Les HTAs

Les cibles prometteuses pour les HTAs comprennent la cyclophiline A (CypA) et le micro-ARN 122 (miR-122).

Les inhibiteurs de CypA inhibent la réplication du VHC en bloquant l'activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase de cette enzyme, qui est nécessaire à la réplication efficace du VHC (Chatterji et al., 2009). Les médicaments en développement clinique comprennent alisporivir (Novartis) et SCY-635 (Scynexis) (Tableau 2).

Le miR-122 est un micro-ARN qui est exprimé abondamment dans le foie et se lie à l'ARN viral pour en faciliter la traduction et la réplication (Jopling, 2012). Le Miravirsén (Santaris Pharma) est un antagoniste du miR-122 qui a une activité antivirale *in vitro* et *in vivo* (Lanford et al., 2010). Ce composé est injecté et donc peu susceptible d'être utilisé à l'ère des thérapies orales. De plus, l'épuisement du miR-122 a été associé au développement de carcinomes hépatocellulaires chez la souris, ce qui soulève des questions quant à sa sécurité chez les humains (Pawlotsky, 2014).

Les facteurs d'entrée sont également des cibles potentielles de l'hôte ; les inhibiteurs de ces facteurs bloquent l'accès du VHC dans les cellules. Les inhibiteurs de l'entrée virale peuvent être particulièrement importants pour le traitement des patients ayant subi une transplantation du foie, puisque les patients infectés par le VHC sont invariablement réinfectés après une transplantation hépatique (Liang and Ghany, 2013).

En 2014 et 2015, de nouveaux schémas thérapeutiques dépendant ou pas de l'IFN seront disponibles. À partir de 2015 et au-delà, les traitements à base d'IFN seront remplacés par des traitements sans INF, administrés par voie orale, au moins dans les régions du monde où ces traitements sont approuvés et leur coût est couvert (Pawlotsky, 2014).

II. Le virus de l'hépatite C

1. Classification et variabilité génomique

Le virus de l'hépatite C est classé dans la famille des *Flaviviridae* dans le genre des *Hepacivirus* (Figure 6) qui comprend également deux autres virus étroitement apparentés : le GBV-B et les tout récemment découverts NPHV (*non-primate hepacivirus*). Alors que le GBV-B a été isolé chez le tamarin. Les NPHV ont quant à eux été identifiés chez les chevaux et chez les chiens (Simmonds, 2013).

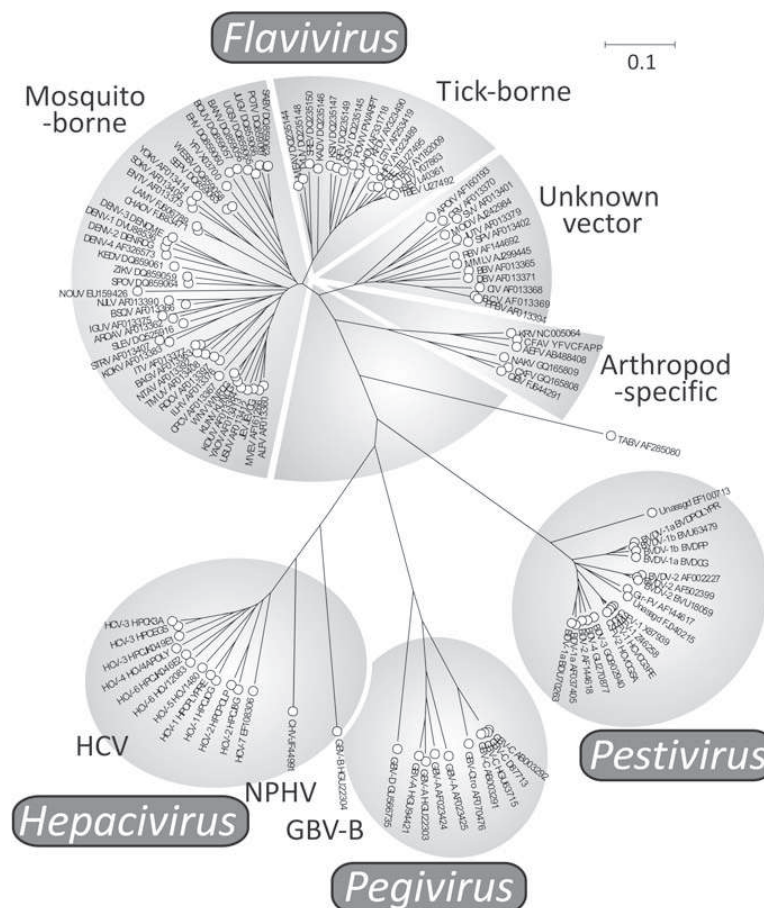


Figure 6. Arbre phylogénétique des membres de la famille des *Flaviviridae*.

La famille des *Flaviviridae* comprend quatre genres : Les *Flavivirus*, les *Pestivirus*, les *Hepacivirus* et les *Pegivirus*. Le GBV-B et les NPHV (*non-primate hepacivirus*) sont classés avec le VHC dans le genre des *Hepacivirus*. L'arbre a été basé sur la comparaison de régions conservées des séquences de l'ARN polymérase (positions 7704-8550 numérotées comme dans le génome du HCV-1, AF011751) de variants représentatifs au sein de chaque genre et espèce. L'arbre phylogénétique déraciné a été construit par neighbor-joining. Une divergence de 0,1 (10% de divergence de séquence en acides aminés) est représentée sur la barre d'échelle (Simmonds, 2013).

Le VHC présente une hétérogénéité génétique importante à travers le monde. Les analyses phylogénétiques ont permis d'établir sept génotypes majeurs (génotypes 1 à 7). Leurs génomes diffèrent de 31 à 33% au niveau des séquences nucléotidiques (Scheel and Rice, 2013; Simmonds, 2013). De plus, de nombreux sous-types ont été décrits (a, b, c,...etc) présentant une différence de 20 à 25% dans leurs séquences nucléotidiques. Un seul sous-type peut regrouper différents isolats ou souches dérivées d'individus différents, comme par exemple les isolats HCV-1 et H77 qui appartiennent au même sous-type 1a, leurs génomes diffèrent de seulement 2 à 4% au niveau de la séquence nucléotidique. Dans un individu infecté avec un même isolat, le VHC circule sous forme d'une population virale ayant des génomes étroitement apparentés, présentant 1 à 2% de variation de séquences. Il a été montré que la distribution de ces quasi-espèces pouvait influencer la progression de l'hépatite C vers la forme chronique, la progression de la fibrose du foie et la réponse à l'IFN (Gottwein and Bukh, 2008).

Les différents génotypes du VHC ont une prévalence et une répartition géographique variable (Figure 7). En occident, le génotype 1 est le plus fréquent, suivi par les génotypes 2 et 3 (Gottwein and Bukh, 2008).

Le sous-type 1a est le plus souvent détecté aux États-Unis et en Europe alors que le sous-type 1b, qui est transmis principalement par transfusion, est retrouvé dans le monde entier avec une prévalence élevée aux États-Unis et en Europe ainsi qu'au Japon, où il est responsable de plus de 70% des cas d'infection par le VHC.

Les sous-types 2a et 2b, représentant 10 à 30% des sous-types de VHC mondiaux, ils sont communs en Amérique du Nord, en Europe et au Japon, tandis que le génotype 2c se trouve dans le nord de l'Italie (Razavi et al., AASLD, 2013).

Le génotype 3 est le plus important dans le sous-continent indien, en Asie du Sud-Est et en Indonésie. Il est également répandu en Europe occidentale et aux États-Unis, notamment le sous-type 3a qui est particulièrement répandu chez les usagers de drogues. En combinaison avec le génotype 1a, ils représentent 70% des nouveaux cas d'infection par le VHC (Razavi et al., AASLD, 2013).

Le génotype 4 semble être répandu au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, notamment en Egypte, où près de 20% de la population est infectée.

Les génotypes 5 et 6 sont les plus fréquemment rapportés en Afrique du Sud et à Hong Kong, respectivement (Razavi et al., AASLD, 2013). Le génotype 7 quant à lui

est cantonnée dans certaines régions d'Afrique centrale et semble pour l'instant marginal (Scheel and Rice, 2013).

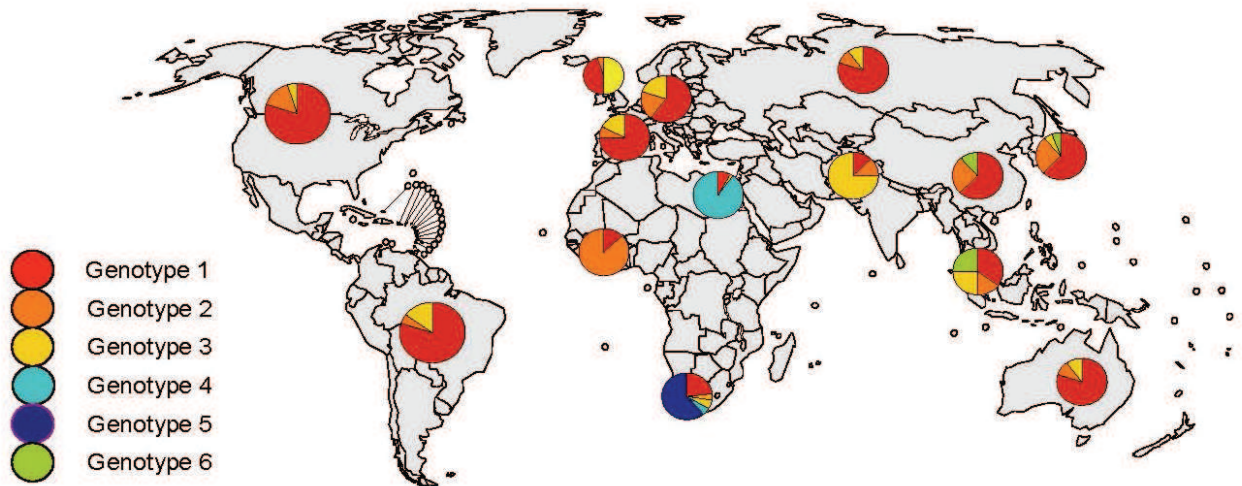


Figure 7. Répartition mondiale des différents génotypes du VHC (OMS, 2009).

2. Propriétés biophysiques de la particule virale

Le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé de 60 à 75 nm de diamètre. La capside virale qui contient l'ARN génomique, est enveloppée dans une membrane lipidique, dérivée du réticulum endoplasmique (RE), sur laquelle on retrouve les glycoprotéines de surface E1 et E2 (Figure 8A) (Lindenbach, 2013). Cependant, la structure de l'unité infectieuse du VHC est probablement plus complexe. Plusieurs éléments de preuves suggèrent que le VHC ne circule pas isolé dans le sang, mais en association avec les lipoprotéines sériques sous forme d'une molécule hybride appelée LVP (*lipo-viral particle*). En effet, les particules de VHC dérivés de sérum de patients infectés sont toujours associées à des composants des lipoprotéines tels que l'apolipoprotéine (apo) AI, ApoB, ApoC1, et ApoE. De plus, l'analyse du profil lipidique des particules virales a montré que celles-ci avaient une composition en lipides et en cholestérol comparable à celle des LDLs (*Low Density Lipoproteins*) et des VLDLs (*Very Low Density Lipoproteins*) (Figure 8B) (Merz et al., 2011).

En raison de leur association aux lipoprotéines de l'hôte, les particules du VHC présentent un large profil de densité, allant de 1,03 à 1,25 g/ml (André et al., 2002; Catanese et al., 2013). Alors que les fractions de faibles densité (1,03 - 1,10 g/ml) renferment des particules virales hautement infectieuses, les fractions de densité plus élevée sont moins infectieuses et peuvent souvent être immunoprécipitées par des IgG anti-humains, suggérant la présence de complexes immuns (Catanese et al., 2013).

L'interaction des particules virales avec les lipoprotéines de l'hôte servirait à les protéger de l'action des anticorps neutralisants. Cependant, la nature précise de cette association reste encore à établir (Figure 8C-E) (Lindenbach, 2013).

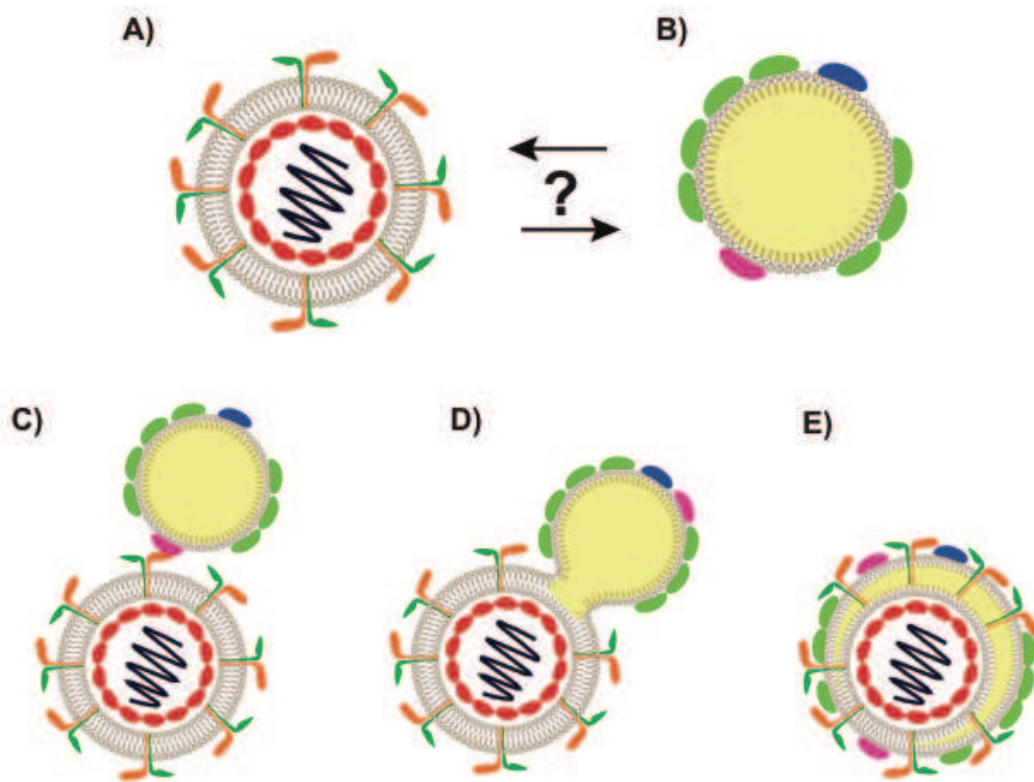


Figure 8. Particules du VHC interagissent avec les lipoprotéines de faible densité.

A) Modèle d'une particule du VHC ; La surface de la particule virale est enveloppée par une bicouche lipidique décorée avec les glycoprotéines virales E1-E2. A l'intérieur de l'enveloppe se trouve la nucléocapside formée par la protéine Core renfermant le génome viral qui est une molécule d'ARN simple brin de polarité positive. **B)** Représentation schématique d'une VLDL ; Le cœur hydrophobe de la VLDL est constitué de lipides entourés par une monocouche de phospholipides sur la quelle sont ancrées ou associées en périphérie les différentes apolipoprotéines. **C)** à **E)** Les illustrations montrent les interactions possibles entre des particules du VHC et les VLDLs (*Adapté de Lindenbach, 2013*).

3. Organisation génomique

Le génome du VHC est une molécule d'ARN simple brin (ARNsb) de polarité positive qui fait environ 9600 nucléotides (nts) de long. Il peut être subdivisé en trois régions, les régions non traduites 5' et 3'UTR (*Untranslated region*) et la région codante avec un seul ORF (*Open Reading Frame*) (Figure 9).

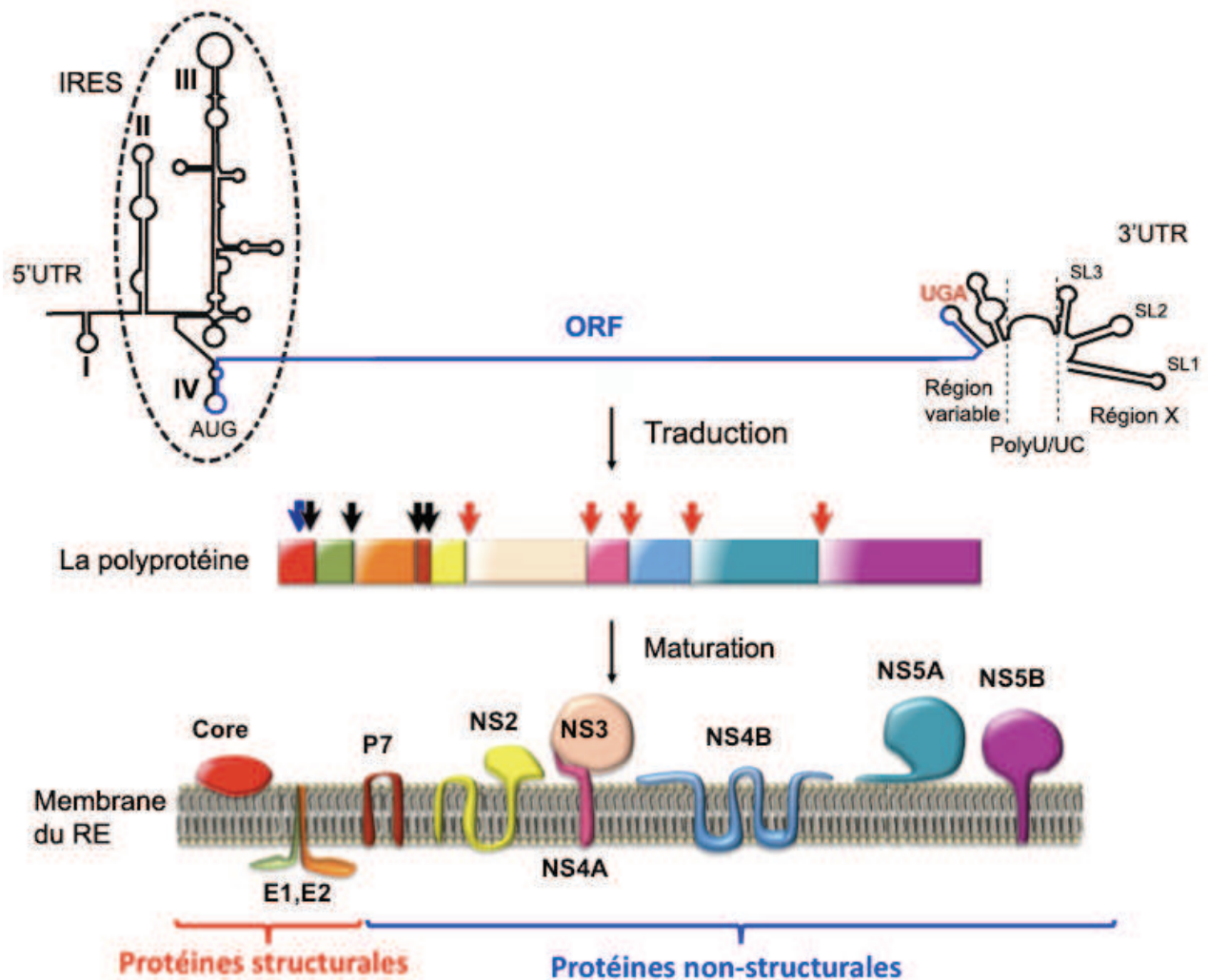


Figure 9. Organisation génétique et maturation de la polyprotéine du VHC.

Représentation schématique du génome viral (en haut). C'est un ARN simple brin de polarité positive de 9,6 kb. Les structures secondaires des régions 5' et 3'UTR sont représentées schématiquement. La traduction IRES-dépendante de l'ARN viral donne naissance à une polyprotéine qui est clivée en protéines structurales et non-structurales par les protéases cellulaires : la signal peptidase (flèche bleue) et la signal peptidase (flèches noires), et par les protéases virales : NS2 et NS3/4A (flèches rouges).

3.1. Les régions non-traduites

Les régions 5' et 3'UTR contiennent des structures secondaires et tertiaires essentielles à la traduction et la réplication du génome viral.

3.1.1. La région 5'UTR

La région 5'UTR d'une longueur de 341 nts est très structurée et très conservée chez les différents génotypes. Elle est composée de quatre domaines structuraux majeurs en forme de tige-boucles, numérotées de I à IV (Figure 9). Les domaines II à IV forment un IRES (*Internal ribosomal entry site*) permettant la traduction de l'ARN viral par un mécanisme d'initiation interne coiffe-indépendant (Fukushi et al., 1994). En plus de son rôle dans la traduction, la région 5'UTR est également importante pour la réplication, notamment l'extrémité 5' en amont de l'IRES (Friebe et al., 2001).

3.1.2. La région 3'UTR

La région 3'UTR qui fait environ 220 nts de long, joue un rôle très important dans la réplication. Elle n'est pas polyadénylée et est composée de trois régions distinctes (Figure 9) : Une région très faiblement conservée qui se trouve immédiatement en aval du codon stop appelée région variable (RV) (30 - 50 nts), une région interne poly uracile/ pyrimidine (poly (U/UC)) de longueur variable selon les génotypes (20 - 200 nts), et une région de 98 nucléotides de long, très structurée et très conservée, appelée région X. Cette région comporte trois tiges boucles stables SL1, 2 et 3, et joue un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin ARN (-) au cours de la réplication (Kolykhalov et al., 1996).

En plus de son rôle dans la réplication, la région 3'UTR contribue également à promouvoir la traduction de l'ARN viral (Bradrick et al., 2006; Song et al., 2006).

3.2. Les protéines virales

Le génome du VHC contient un seul ORF qui code pour une polyprotéine d'environ 3000 aminoacides (aa) de long. Cette polyprotéine est co- et post-traductionnellement clivée par des protéases cellulaires et virales donnant naissance à dix protéines différentes; les protéines structurales Core, E1 et E2 qui forment la particule virale, la protéine P7 et les protéines non-structurales (NS) 2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, qui sont impliquées dans la maturation, la réplication et l'assemblage des virions. Toutes les protéines virales sont directement ou indirectement (NS3) associées à des membranes dérivées du RE où elles exercent leurs fonctions (Figure 9) (Bartenschlager et al., 2010).

3.2.1. La protéine Core

Core est la première protéine structurale codée par l'ORF du VHC. Les monomères de cette protéine constituent la nucléocapside qui renferme le génome viral. La maturation de Core implique le clivage de la séquence signal située entre Core et E1 et la translocation du polypeptide naissant vers la membrane du RE (Santolini et al., 1994). Un premier clivage de la séquence signal est médié par une « signal peptidase » (SP) et donne naissance à une protéine immature de 191 aa de long. Celle-ci subit un deuxième clivage en C-terminale par une « signal peptide peptidase » (SPP) libérant la protéine Core mature de 177 aa de long (McLauchlan et al., 2002).

La protéine Core mature est constituée de deux domaines (Figure 10). Le domaine 1 (D1) hydrophile en N-terminal (aa 1 à 117), contient une forte proportion de résidus basiques et est impliqué dans la liaison à l'ARN et dans l'homooligomérisation de Core, et par conséquent dans l'assemblage de la nucléocapside virale. Le D1 présente également une activité chaperonne, une caractéristique générale des protéines de capsid, probablement nécessaire au remodelage structurel et l'encapsulation du génome ARN dans la particule virale (Kim et al., 2006). L'oligomérisation de Core peut être déclenchée par des changements conformationnels qui interviennent lorsque celle-ci se lie à l'ARN, permettant ainsi une plus grande stabilité d'interaction entre monomères. Le domaine D1 se comporte

comme une protéine intrinsèquement désordonnée mais se replie lorsqu'il interagit avec le domaine D2 de Core (Boulant et al., 2005).

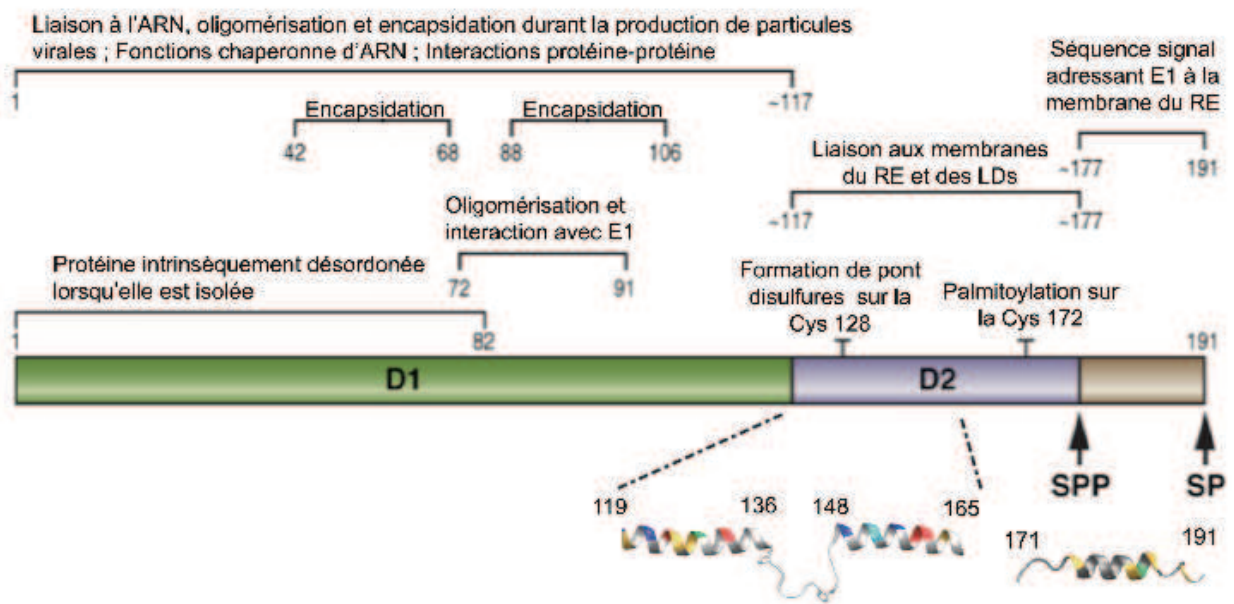


Figure 10. Représentation schématique de la protéine Core du VHC.

La protéine Core est libérée de la polyprotéine par la signal peptidase (SP). Ensuite le précurseur de Core de 191 aa est clivé par la signal peptidase (SPP), donnant naissance à une protéine mature de 177 aa composée de deux domaines D1 et D2. Le D1 est hydrophile et contient une forte proportion de résidus basiques, il est impliqué dans la liaison à l'ARN, dans l'oligomérisation de Core et par conséquent dans l'assemblage de la nucléocapside virale. Le D2 contient deux hélices amphipatiques (119-136 et 148-165) qui sont séparées par une boucle hydrophobe (Adapté de Gawlik and Gallay, 2014).

Le domaine C-terminal D2 (aa 118 à 177) est un domaine hydrophobe qui assure l'association de Core avec les gouttelettes lipidiques (LDs ; *Lipid Droplets*). D2 consiste en une boucle hydrophobe centrale reliant deux hélices α amphipathiques (aa 119 à 136 et 148 à 165) interagissant avec l'interface phospholipidique des LDs (Boulant et al., 2007). Ainsi, certaines délétions et plusieurs mutations ponctuelles dans le D2 abolissent l'association de Core avec les gouttelettes lipidiques, réduisant ainsi sa stabilité et conduisant à la perte de la production de particules virales infectieuses (Boulant et al., 2006; Miyanari et al., 2007).

Outre les protéines virales E1, P7 et NS2, il a été rapporté que Core interagit également avec une variété de protéines cellulaires, influençant de nombreuses fonctions des cellules hôtes infectées, telles que la transcription de gènes, le métabolisme des lipides, l'apoptose et la signalisation cellulaire (De Chasse et al., 2008). *In vivo*, Core est impliquée dans le développement de la stéatose et du carcinome hépatocellulaire (Gottwein and Bukh, 2008).

Des produits de traduction supplémentaires sont issus d'un cadre de lecture alternatif chevauchant la région codante de Core (ARFP, la protéine F ou Core +1) ainsi qu'une famille de « mini-Cores » dont la taille varie entre 8 et 14 kDa, ont été détectés. Cependant, le rôle de ces protéines dans le cycle viral et la pathogenèse du VHC reste à élucider (Moradpour and Penin, 2013).

3.2.3. Les protéines E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 jouent un rôle important à différentes étapes du cycle viral telles que l'assemblage de particules infectieuses, l'entrée du virus, et la fusion avec la membrane de l'endosome. Pour remplir ces fonctions, E1 et E2 adopteraient différentes conformations qui seraient étroitement contrôlées pour se produire au moment approprié au cours du cycle viral (Moradpour and Penin, 2013).

E1 et E2 sont des protéines transmembranaires de type I avec un ectodomaine en N-terminal (~ 160 et ~ 360 aa pour E1 et E2, respectivement) et un court domaine transmembranaire C-terminal (DTM) de ~ 30 aa. Au cours de leur synthèse, les ectodomains de E1 et E2 sont exposés vers la lumière du RE alors que leurs DTM sont insérés dans la membrane du RE (Cocquerel et al., 2002).

Les deux DTM sont composés de deux régions riches en aa hydrophobes séparées par une courte région polaire contenant des résidus chargés très conservés. Les DTM contribuent de manière importante aux fonctions de E1 et E2 en permettant leur ancrage à la membrane, leur rétention au niveau du RE, et la formation d'hétérodimères E1-E2 non covalents constitutifs de l'enveloppe virale (Voisset and Dubuisson, 2004). Cependant, il a été montré récemment que les hétérodimères E1-E2 associés aux virions forment des complexes covalents qui sont stabilisés par des liaisons disulfure (Vieyres et al., 2010). Ces interactions latérales entre les glycoprotéines d'enveloppe joueraient un rôle actif dans le bourgeonnement du VHC. Outre la formation de ponts disulfures, la glycosylation est également une modification post-traductionnelle très importante pour la fonction des glycoprotéines d'enveloppe. Elle est nécessaire pour un repliement correct des glycoprotéines et à l'évasion immunitaire (Khan et al., 2014). E1 et E2 possèdent 11 et 4 sites de N-glycosylation, respectivement. Les glycanes, constituant près de 50% du poids moléculaire de l'ectodomaine de ces protéines, sont essentiellement présents dans

des boucles indiquant que ces sites sont exposés au solvant et qu'ils sont flexibles (Kong et al., 2013).

Alors que la structure tridimensionnelle de E1 n'est toujours pas connue, celle de E2 en revanche a été récemment résolue par cristallographie (Khan et al., 2014; Kong et al., 2013) révélant une structure compacte avec une architecture bien définie qui consiste en un domaine central replié en β -sandwich flanqué à l'avant et à l'arrière par des boucles, des hélices α , et des feuillets β (Figure 11A). Contrairement, à ce qui a été prédit au paravent, E2 a une structure globulaire qui diffère nettement du repliement à trois domaines caractéristique des protéines de fusion de classe II, retrouvées chez d'autres membres de la famille des *Flaviviridae*. En effet, alors que E2 s'étend seulement sur ~ 50 Angstrom (Å), les protéines de fusion de classe II adoptent une conformation beaucoup plus étendue d'environ 120 Å (Figure 11B) (Kong et al., 2013). De plus, des analyses de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) indiquent que E2 ne subit aucun réarrangement structural à pH acide. Ainsi, il semble peu probable que E2 ait un rôle direct dans la fusion membranaire, contrairement aux protéines de fusion de classe II. Cependant, il est tout à fait possible que E1 seule ou l'hétérodimère E1-E2 aient un rôle dans ce processus (Khan et al., 2014).

Les gènes codant pour E1 et E2 sont particulièrement variables. Dans E2 par exemple, plusieurs régions hyper variables (HVRs ; *Hypervariable regions*) ont été identifiées. Elles peuvent présenter jusqu'à 80% de variation de séquences entre les différents génotypes du VHC. La région HVR1 comprend les 27 premiers aa de E2. C'est une région immunodominante qui induit un type spécifique d'anticorps neutralisants (Farci et al., 1996; McCaffrey et al., 2011). Malgré la grande variabilité de sa séquence, HVR1 est une région globalement basique avec des résidus chargés positivement situés à des positions spécifiques sur la séquence. Les propriétés de cette région intrinsèquement non structurée sont très conservées (Penin et al., 2001). HVR2 (aa 91 à 97) montre un maximum de 100% de variabilité de séquences et forme une structure en boucle. A l'inverse de HVR1, HVR2 n'est pas une cible de la réponse immunitaire humorale, mais est essentielle pour l'intégrité et la fonction de l'hétérodimère E1-E2 et peut moduler la liaison de E2 aux différents récepteurs (McCaffrey et al., 2011).

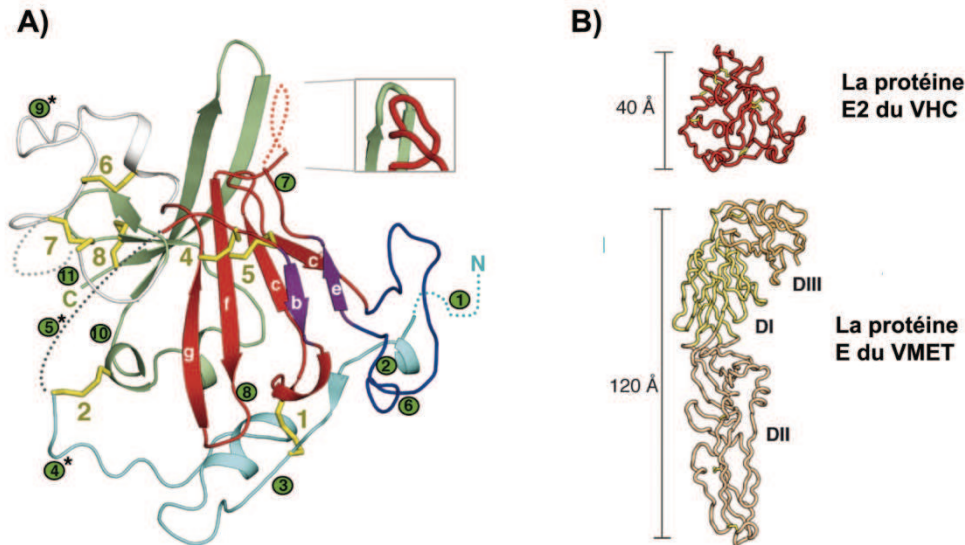


Figure 11. Structure de la glycoprotéine E2 du VHC.

A) Structure cristallographique de la protéine E2 du VHC est représentée en mode « cartoon » et colorée selon les éléments structuraux : la couche avant est formée par les résidus de la région N-terminale de 421 à 453 (cyan) ; les feuillets externes (rouge) et internes (violet) forment le beta sandwich des immunoglobulines (Ig) (492-566) ; la boucle de liaison au récepteur CD81 est une structure bilobée (bleu) (519-535) ; une région flexible (blanc) englobe la région variable 3 (VR3) (567-596) ; et la couche arrière (597 à 645) est formée par deux courtes hélices, des boucles, et un feuillet-β à quatre brins (vert clair). Annotations des brins beta sandwich selon les conventions des repliements des Ig. Les ponts disulfures sont présentés comme des bâtons jaunes et numérotés à partir de l'extrémité N-terminale. Les glycanes N-liés sont indiqués par des cercles verts et sont également numérotés à partir de l'extrémité N-terminale. Les astérisques indiquent les glycanes N-liés supprimés dans la construction. Les régions désordonnées de la structure sont représentées par des lignes en pointillés. **B)** Comparaison de la protéine E2 du VHC (en haut) et la protéine E du Virus de la méningo-encéphalite à tiques (VMET), un membre des *Flaviviridae* dont la protéine E appartient aux protéines de fusion de classe II (PDB ID 1SVB). DI à DIII indique les domaines I à III (Adapté de Kong et al., 2013).

3.2.4. La protéine p7

p7 est un polypeptide membranaire de 63 aa de long. Il comporte deux hélices α transmembranaires connectées par une boucle cytosolique chargée positivement, alors que les extrémités N et C-terminales sont orientées vers la lumière du RE (Carrère-Kremer et al., 2002). p7 appartient à la famille des viroporines. En effet, cette protéine forme des hexamères ou des heptamères ayant une activité de canal ionique qui facilite la production de virions (Chandler et al., 2012). La structure tridimensionnelle d'un hexamère de p7 dans une double couche de phospholipides (DHPC à queue courte) a été résolue par microscopie électronique, révélant une architecture des protéines en forme de fleur à six pétales protubérantes orientées vers la lumière du RE (Figure 12) (Luik et al., 2009).

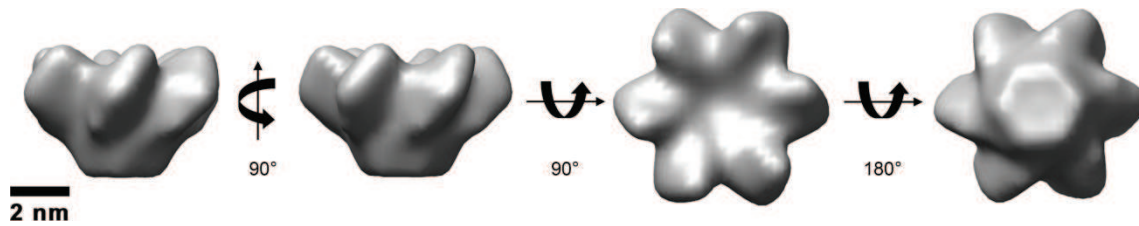


Figure 12. Structure 3D d'un hexamère de p7 du VHC formant un canal ionique.

Vues des volumes 3D du canal p7 du VHC filtrés à 16 Å. La structure en forme de cône est de 8,1 nm de diamètre au point le plus large et de 4,8 nm de hauteur. Six protubérances ou pétales se ramifient à partir de base résultant en un large pore au sommet du canal (Luik et al., 2009).

p7 n'est pas nécessaire à la réplication de l'ARN, mais semble être essentielle pour les étapes d'assemblage et de sécrétion de particules virales infectieuses (Steinmann and Pietschmann, 2010). Au niveau de l'assemblage p7 semble agir de concert avec Core, les glycoprotéines E1-E2 et NS2, indépendamment de son activité de canal ionique (Jones et al., 2007; Popescu et al., 2011; Stapleford and Lindenbach, 2011). En revanche, pour ce qui est de la sécrétion, p7 agirait en supprimant l'acidification de certains compartiments cellulaires acides, et protégerait ainsi les virions naissants de changements conformationnels induits par une acidification prématurée (Wozniak et al., 2010).

3.2.5. La protéine NS2

Le clivage de la polyprotéine virale à la jonction NS2/NS3 est réalisé par une protéase à cystéine codée par NS2 et dont la fonction est fortement augmentée par la partie N-terminal de NS3 (Grakoui et al., 1993; Schregel et al., 2009). NS2 est une protéine de 217 aa de long qui renferme dans sa partie N-terminale un domaine de liaison membranaire hautement hydrophobe et dans sa partie C-terminale le sous-domaine protéase. Tandis que le domaine membranaire est composé de trois segments transmembranaires putatifs (Figure 13) (Jirasko et al., 2010), la protéase en C-terminale est capable de former des dimères créant un site actif composite, tel qu'il a été révélé par la structure cristallographique (Figure 13) (Lorenz et al., 2006). L'activité protéase de NS2 n'est pas indispensable pour la réplication de l'ARN, mais le clivage à la jonction NS2/NS3 est essentiel pour la libération de la protéine NS3 entièrement fonctionnelle et, par conséquent, la libération des protéines non-structurales du VHC favorisant la réplication de l'ARN viral (Jirasko et al., 2010).

NS2 joue un rôle central dans l'assemblage de particules virales infectieuses indépendamment de son activité protéase. Elle permet de coordonner le processus d'assemblage à travers un réseau complexe d'interactions impliquant à la fois les protéines structurales (E1-E2) et non structurales (P7, NS3/4A et NS5A) (Jones et al., 2007; Popescu et al., 2011; Stapleford and Lindenbach, 2011).

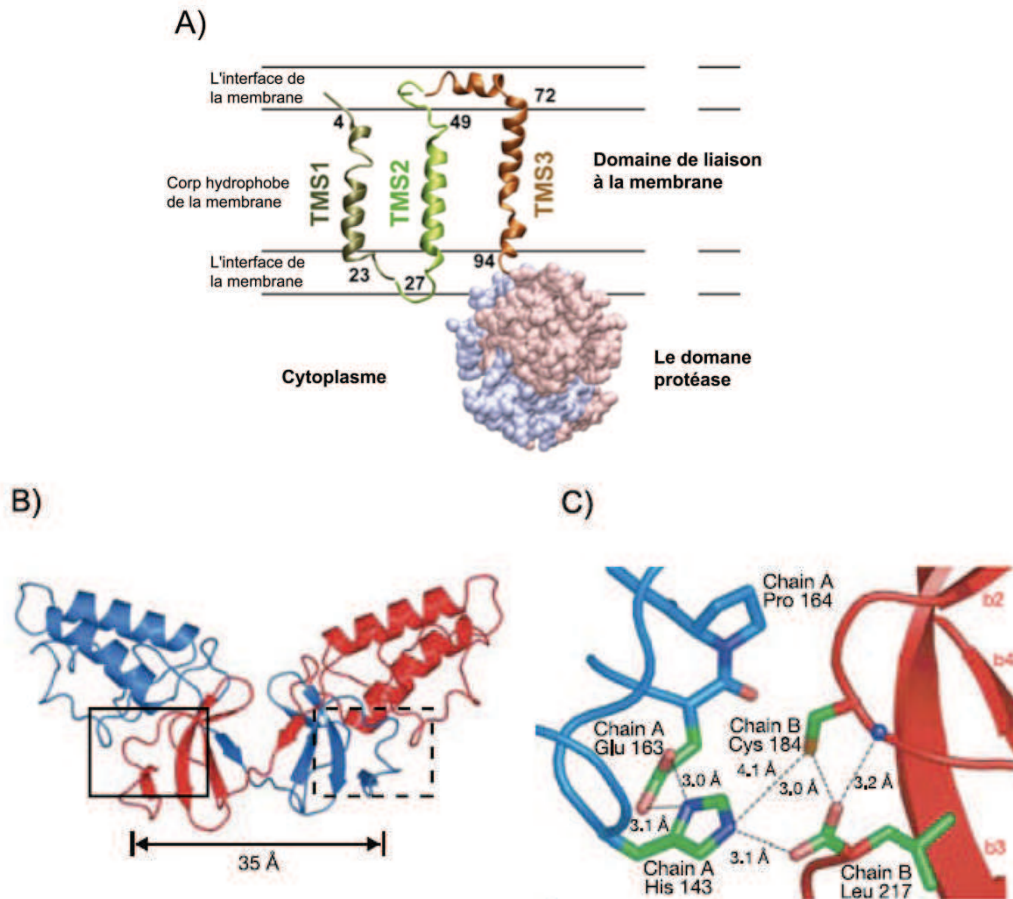


Figure 13. Structure et topologie de la protéine NS2.

A) Modèle de la topologie de NS2 au niveau de la membrane du RE. Dans le panneau à gauche les hélices transmembranaires TMS1, 2 et 3 sont représentées en ruban et colorées en bronze, en vert ou en cuivre, respectivement. Les TMS sont positionnées dans la membrane et les extrémités des hélices transmembranaires sont précisées (TMS1, 4-23 ; TMS2, 27-49 ; TMS3, 72-94). Les trois TMS sont représentés comme des entités séparées, puisque leurs interactions intramoléculaires et/ ou intermoléculaires ne sont pas connues. Le domaine protéase de NS2 est représenté à la surface (vue latérale) sous forme d'un dimère (PDB : 2HD0) coloré en bleu clair et rose. Pour plus de simplicité, le domaine de liaison à la membrane d'une seule sous-unité est représenté (Adapté de Jirasko et al., 2010). **B)** Structure cristallographique d'un dimère de NS2. Les régions encadrées montrent l'emplacement des deux sites actifs dans le dimère NS2. La distance entre les deux sites actifs est indiquée. **C)** Le site actif de NS2. Les résidus His 143, Glu 163, Pro 164, Cys 184 et Leu 217 sont représentés en bâtonnets. Le site actif est composé de l'His 143 et Glu 163 à partir d'une molécule du dimère (chaîne A, dessinée en bleu), et Cys 184 à partir de l'autre molécule (chaîne B, dessinée en rouge). Le résidu C-terminal, Leu 217, provient de la même chaîne que la Cys 184. Les pointillés indiquent les contacts entre les résidus sélectionnés (Lorenz et al., 2006).

3.2.6. Le complexe NS3-4A

NS3-4A est un complexe non covalent composé de NS3 et de son cofacteur NS4A. NS3 est une protéine multifonctionnelle de 70 kDa, avec une activité sérine-protéase située à l'extrémité N-terminale (aa 1 à 180) et une activité hélicase à ARN/NTPase située dans les deux tiers de la partie C-terminale (aa 181 à 631). Les deux activités enzymatiques ont été bien caractérisées, et les structures tridimensionnelles ont été résolues (Figure 14) (Yao et al., 1999). Le domaine protéase à sérine de NS3 adopte un repliement de type chymotrypsine avec deux sous-domaines en tonneau- β . La structure est stabilisée par un ion Zn^{2+} qui est coordonné par les Cys 97, 99, 145 et l'His 149. Le site de liaison du Zn^{2+} joue également un rôle important dans le clivage du site NS2/NS3 par la protéase NS2 (Schregel et al., 2009). La triade catalytique de la protéase NS3-4A est formée par l'His 57, Asp 81 et Ser 139 (Figure 14).

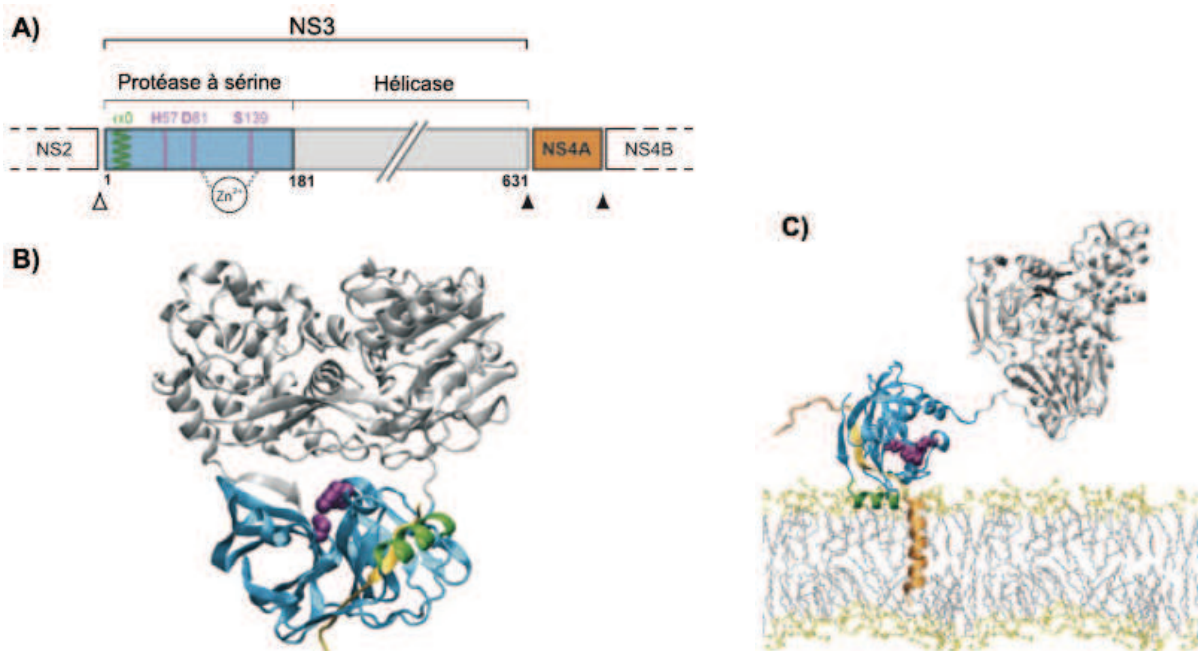


Figure 14. Structure tridimensionnelle et topologie du complexe NS3/4A.

A) Représentation schématique de la région NS3-4A de la polyprotéine du VHC. Les domaines protéase à sérine et hélicase de NS3 sont représentés en cyan et en gris, respectivement. Les résidus du site actif de la protéase à sérine (His 57, Asp 81 et Ser 139) sont mis en évidence en violet et l'hélice α amphipatique N-terminale en vert. Un atome de zinc (Zn^{2+}), qui est coordonné par trois résidus cystéines et une histidine, stabilise la structure de la protéase. NS4A est représentée en orange. La flèche blanche indique le clivage par la protéase NS2, tandis que les flèches noires montrent les clivages en *cis* (site NS3/NS4A) et en *trans* (site NS4A/NS4B) par la protéase NS3-4A. **B)** Structure cristallographique du complexe NS3-4A comprenant NS3 et la partie centrale de NS4A. Les couleurs identiques à celles dans le panneau (A) sont utilisées pour mettre en évidence les différents éléments. **C)** Modèle d'association à la membrane et organisation structurale du complexe NS3-4A (Adapté de Morikawa et al., 2011).

L'hélicase NS3 est un membre de la famille des DExH/ D-box hélicases (Belon and Frick, 2009). Elle hydrolyse l'ATP pour le déroulement de l'ARNdb ou des régions d'ARNsb avec des structures secondaires importantes. L'activité ARN hélicase/ NTPase est essentielle pour la réplication de l'ARN du VHC et joue également un rôle dans l'assemblage des particules virales. Cependant, sa fonction précise dans le cycle viral reste inconnue. De même qu'on ignore pourquoi les deux domaines, protéase à sérine et ARN hélicase, sont liés physiquement (Morikawa et al., 2011).

Le polypeptide NS4A de 54 aa de long agit comme cofacteur pour la protéase NS3. La partie centrale de NS4A (aa 21 à 32) est nécessaire pour un repliement correct de NS3 par la formation d'un brin- β incorporé dans le tonneau- β en N-terminale de NS3. La partie hydrophobe N-terminale de NS4A (aa 1 à 21) forme une hélice α transmembranaire requise pour la liaison du complexe NS3-4A à la membrane du RE (Figure 14C), tandis que la partie C-terminale (aa 40 à 54) interagit avec d'autres composants de la réplicase pour promouvoir la réplication de l'ARN du VHC et l'assemblage de particules virales (Beran et al., 2009).

Il est intéressant de noter que NS3-4A est située non seulement sur les membranes du RE et dans les complexes de réplication, mais aussi, dans une moindre mesure, sur des mitochondries ou des membranes associées. Cela pourrait expliquer comment la protéase NS3-4A peut cliver et inactiver la protéine mitochondriale MAVS qui sert d'adaptateur pour la voie de signalisation de RIG-I (Li et al., 2005b). La protéase NS3-4A clive également TRIF (Li et al., 2005a), une autre protéine adaptatrice de la voie TLR3, ainsi que la tyrosine phosphatase (TC-PTP), un modulateur du récepteur du facteur épidermique de croissance (EGFR) (Brenndörfer et al., 2009). Ainsi, la protéase NS3-4A joue un rôle essentiel non seulement dans la réplication, mais également dans la persistance et la pathogenèse du VHC.

3.2.7. La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 261 aa de long (27 kDa). Il s'agit d'une protéine membranaire intégrale contenant une partie N-terminale (~ aa 1 à 69), une partie centrale abritant quatre passages transmembranaires (~ aa 70 à 190), et une partie C-terminale (~ aa 191 à 261) (Figure 15). La portion N-terminale comprend deux hélices α amphipathiques, AH1 (aa 3 à 35) et AH2 (aa 42 à 66). L'hélice AH2 peut adopter deux topologies différentes, car elle a le potentiel de transloquer depuis la face cytosolique vers la lumière du RE, probablement suite à l'oligomérisation de NS4B (Gouttenoire et al., 2010). Elle joue également un rôle important dans l'assemblage de complexes de réplication fonctionnels (Gouttenoire et al., 2009a). La partie C-terminale comprend deux hélices α amphipathiques H1 (aa 201 à 213) et H2 (aa 229 à 253) (Gouttenoire et al., 2009b), ainsi que deux sites de palmitoylation à l'extrémité C-terminale (Yu et al., 2006). Ainsi, l'association de la protéine NS4B à la membrane est médiée non seulement par les domaines transmembranaires dans sa partie centrale, mais également par ces parties N- et C-terminales.

NS4B induit la formation d'un compartiment, riche en structures membranaires et vésicules dérivées du RE, appelé « *Membranous Web* » (MW) (Figure 15), qui sert d'échafaudage pour la formation de complexes de réplication du VHC. L'oligomérisation de la protéine NS4B est requise pour la formation de complexes de réplication fonctionnels, probablement par l'induction d'une courbure de la membrane et la formation de vésicules. L'hélice AH2 en N-terminal ainsi que des éléments conservés en C-terminal seraient des déterminants majeurs pour l'oligomérisation de NS4B (Gouttenoire et al., 2010). Il semblerait également que la palmitoylation en C-terminal joue un rôle important dans ce processus (Yu et al., 2006).

Outre son rôle dans la réplication, NS4B participerait également dans l'assemblage de particules virales infectieuses (Han et al., 2013; Jones et al., 2009).

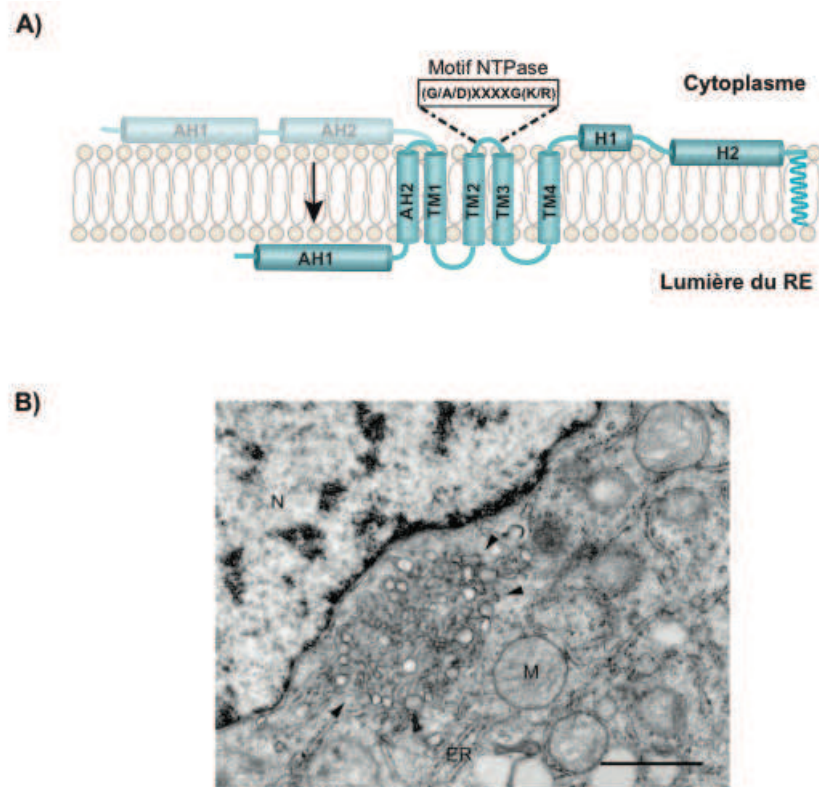


Figure 15. Topologie membranaire de NS4B et formation du MW.

A) Représentation schématique de la protéine NS4B sur la membrane du RE représentant les hélices amphipathiques en N-terminal (AH1 et AH2), les segments transmembranaires (TM1-4) et les hélices en C-terminal (H1 et H2). L'extrémité N-terminale de la protéine NS4B peut transloquer dans le RE, probablement lors de l'oligomérisation de AH2 (flèche), en créant ainsi un cinquième passage transmembranaire. Un motif P-loop NTPase putatif est encadré. Les sites de palmitoylation décrites à l'extrémité C-terminale de la protéine NS4B sont représentés schématiquement (voir le texte pour plus de détails). **B)** Une image de microscopie électronique d'une cellule Huh-7 hébergeant un réplicon subgénomique du VHC. Une altération de la membrane distincte composée de petites vésicules enrobées dans une matrice de membrane, désignée comme le *Membranous Web* (MW) (têtes de flèches), qui se trouve dans la région juxtanucléaire. Barre d'échelle = 1 nm. M : Mitochondrie, N : Noyau, ER : Réticulum endoplasmique (Adapté de Gouttenoire et al., 2010).

3.2.8. La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine associée à la membrane. Elle est composée de 447 aa et joue un rôle important dans la régulation de la réplication de l'ARN du VHC et la formation de particules virales. En plus de son domaine d'ancrage à la membrane en N-terminale, NS5A est constituée de trois domaines séparés par deux séquences de faible complexité appelée LCS (*Low Complexity Sequence*) (Figure 16) (Tellinghuisen et al., 2004). Les domaines I et II (DI et DII) sont principalement impliqués dans la réplication de l'ARN, alors que le domaine III (DIII) est essentiel pour l'assemblage des virions (Appel et al., 2008; Kim et al., 2011b).

NS5A peut être retrouvée sous deux formes; soit sous une forme peu phosphorylée, à un niveau basal, de 56 kDa, soit sous une forme hyperphosphorylée de 58 kDa. La phosphorylation basale se produit dans la partie centrale et la partie C-terminale, tandis que l'hyperphosphorylation de NS5A a lieu au niveau des résidus sérine 225, 229, et 232 dans le LCS 1. L'état de phosphorylation de NS5A a un impact direct sur la réplication du VHC. Tandis que la forme hypophosphorylée permet une réplication optimale de l'ARN, la forme hyperphosphorylée réduit son efficacité (Neddermann et al., 2004). De plus, il a été montré que la phosphorylation de certains résidus dans le DIII, par des kinases cellulaires, favorise l'assemblage de particules virales (Kim et al., 2011b; Masaki et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Cela suggère que NS5A pourrait fonctionner comme un interrupteur moléculaire entre les étapes de réplication et d'assemblage.

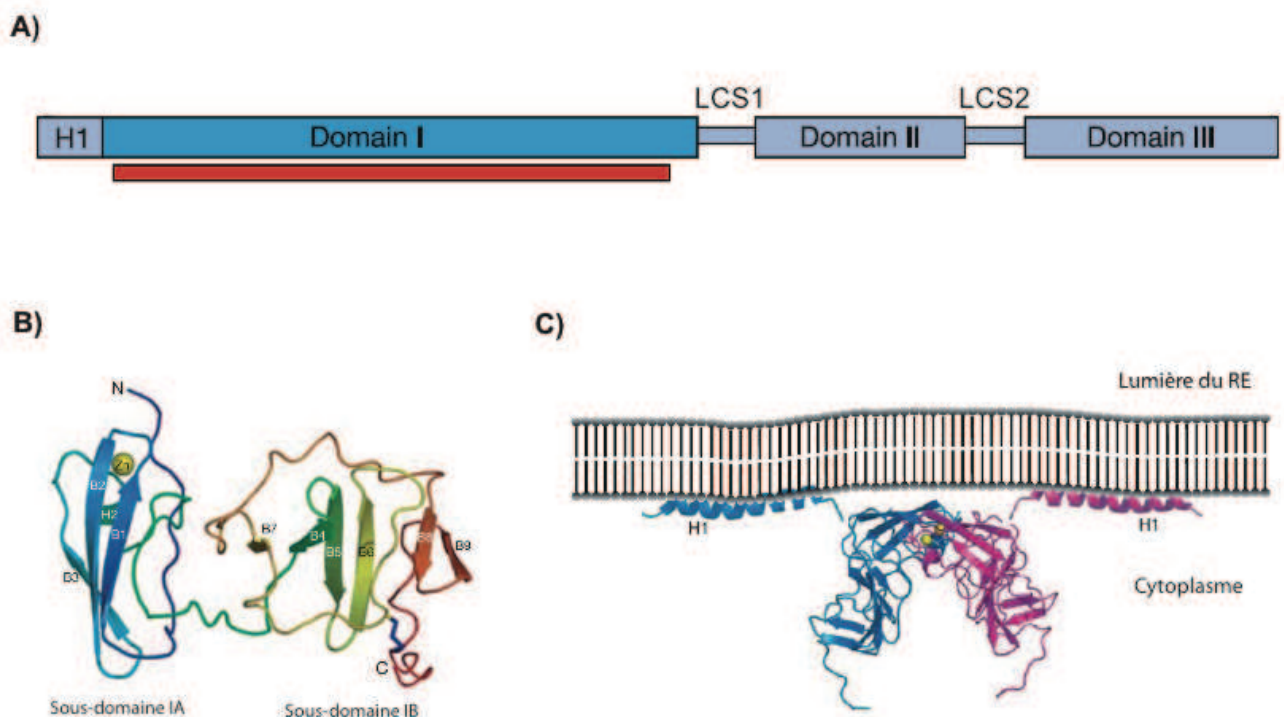


Figure 16. Structure et topologie membranaire de NS5A.

A) Représentation schématique des différents domaines de la protéine NS5A. La portion du domaine I dont la structure est représentée en (B) est indiquée par la barre rouge. **B)** Structure du domaine I de NS5A. La chaîne polypeptidique est colorée à partir de l'extrémité N-terminale (bleu) à l'extrémité C-terminale (rouge). L'atome de zinc coordonné est représenté en jaune. Le pont disulfure en C-terminal est représenté en bleu. **C)** Modèle représentant la position d'un dimère de NS5A par rapport à la membrane du RE (Adapté de Tellinghuisen et al., 2005).

NS5A est liée à la membrane du RE *via* une hélice α -amphipathique en N-terminale qui s'incorpore en plan dans le feuillet cytosolique de la membrane (Figure 16) (Penin et al., 2004). Cette particularité permet à NS5A de s'associer à la monocouche de phospholipides des LDs et donc d'interagir avec Core, *via* son domaine DIII, sur ses organites ou à l'interface RE-LDs (Masaki et al., 2008).

La structure cristallographique du DI a révélé un dimère en forme de « pince » avec une rainure, exposée au cytosol, qui peut accueillir de l'ARNsb ou db (Tellinghuisen et al., 2005). Chaque molécule du dimère coordonne un atome de zinc par l'intermédiaire de quatre résidus cystéines conservés (39, 57, 59, et 80) (Figure 16). De manière intéressante, une seconde structure cristallographique du dimère de DI a révélé une conformation différente (Love et al., 2009). Ces deux formes structurales alternatives, peuvent être représentatives des rôles multiples de NS5A dans la réplication de l'ARN et dans l'assemblage des particules virales.

NS5A contribue à la physiopathologie et à l'évolution de la maladie en interagissant avec un grand nombre de protéines cellulaires, probablement grâce à la nature dépliée de ces domaines DII et DIII. Par exemple, NS5A interagit avec la phosphatidylinositol kinase 4 III α (PI4KIII α) et stimule son activité afin de promouvoir la formation du MW (Berger et al., 2011a). Elle interagit également avec la CypA qui est un facteur essentiel à la réplication de l'ARN et à l'assemblage des particules virales infectieuses (Yang et al., 2008). D'autre part, NS5A peut interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte. Elle est impliquée dans l'inhibition de la protéine kinase PKR qui est un acteur clé de la réponse immunitaire innée (Gale et al., 1997). Elle bloque également la voie de signalisation de l'IFN en inhibant la phosphorylation de STAT1, impliquée dans l'activation des ISGs (Lan et al., 2007).

3.2.9. La protéine NS5B

NS5B constitue la composante clé du complexe de réplication de l'ARN viral. Cette protéine de 68 KDa (591 aa) est une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) qui utilise l'ARN génomique simple brin positif du VHC comme matrice pour synthétiser un ARN simple brin négatif complémentaire qui servira à son tour pour la synthèse ultérieure de l'ARN génomique. Une particularité de cette polymérase c'est qu'elle est capable de faire une initiation *de novo* ; c'est à dire d'initier la réplication à partir d'une matrice d'ARNsb sans qu'il y ait besoin d'une amorce (Luo et al., 2000).

Le domaine catalytique de NS5B, est formé par les 530 aa de la partie N-terminale, qui contient des motifs qui sont partagées par toutes les RdRp, à savoir ; une séquence Gly-Asp-Asp (GDD) dans le motif C, et la configuration classique d'une main droite avec les sous-domaines pouce, paume et doigts (Figure 17A). Les domaines pouce et doigts créent un canal qui abrite la matrice ARNs et les rNTPs (ribo-nucléotides tri-phosphates) dans le site catalytique, dans le domaine de la paume (Bressanelli et al., 2002). Il est communément admis que la liaison de l'ARN matrice et l'initiation de la synthèse sont régulées par une tige-boucle beta très flexible localisée dans le sous-domaine pouce et pointant vers le site actif (Hong et al., 2001). NS5B a une vitesse de polymérisation de 100-400 nts/ min *in vitro* et fait, en moyenne, une erreur tout les 1000 nts incorporés. Ce taux élevé d'erreurs est dû à l'absence d'une activité correctrice chez cette polymérase et explique en grande partie la variabilité génétique des isolats du VHC (Lohmann et al., 1998; Powdrill et al., 2011; Simister et al., 2009).

NS5B est associée à la membrane du RE *via* les 21 résidus d'aa en C-terminale, ce qui entraîne une orientation cytosolique du domaine catalytique. L'ancrage membranaire de NS5B n'est pas requis pour son activité polymérase *in vitro*, en revanche il est indispensable pour la réplication de l'ARN viral dans les cellules (Moradpour et al., 2004).

La modélisation moléculaire de NS5B associée à la membrane indique que la rainure de liaison à l'ARN est empilée sur l'interface de la membrane, la rendant ainsi inaccessible à la matrice ARN (Figure 17B). Cette forme inactive de la RdRp peut être activée par un changement de conformation du segment de liaison, un segment de 40 aa qui sépare le domaine catalytique en N-terminal du segment transmembranaire en C-terminal de NS5B. Un tel changement conformationnel permet de déplacer le domaine catalytique de NS5B loin de la membrane le rendant accessible à la matrice ARN (Figure 17C), alors que le segment de liaison peut établir des interactions avec des facteurs cellulaires ou viraux nécessaires pour la formation du complexe de réplication (Moradpour and Penin, 2013).

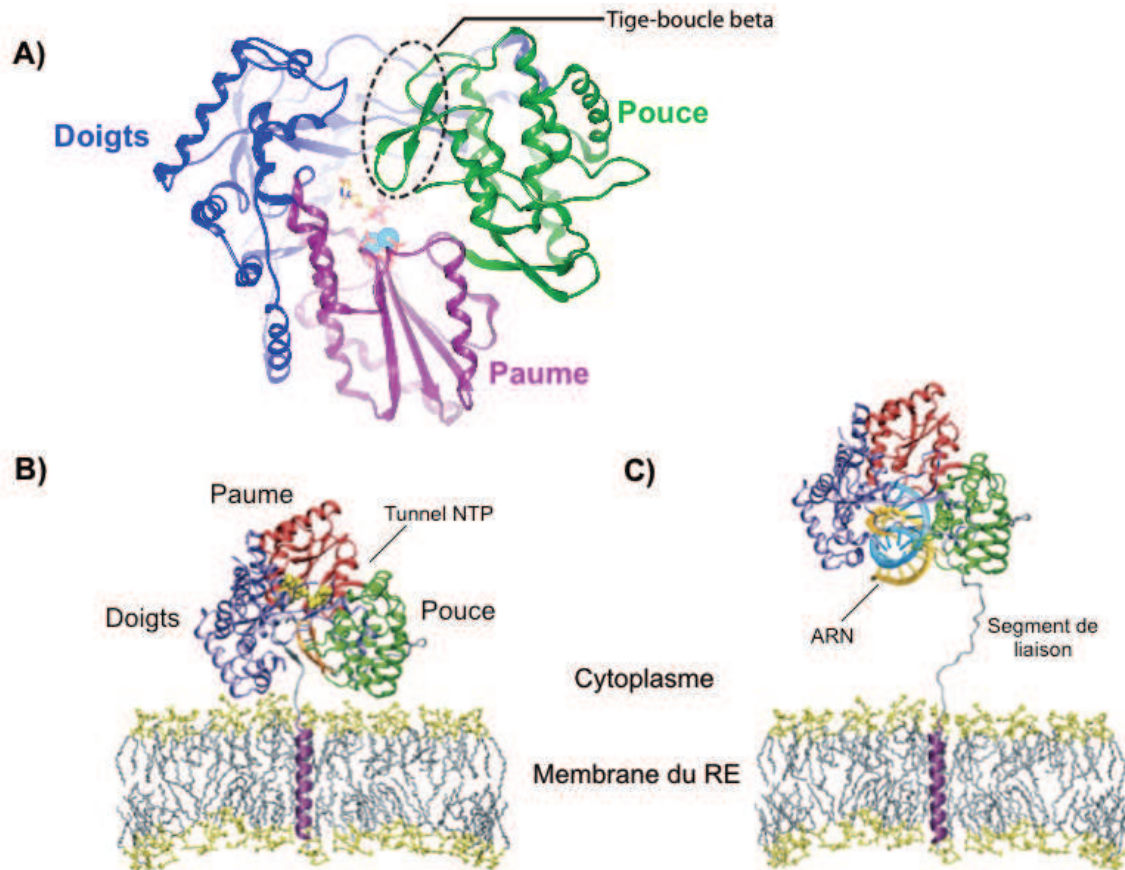


Figure 17. Structure de la protéine NS5B du VHC.

A) Structure du domaine catalytique de NS5B complexée à une molécule d'UTP, rappelant la forme d'une main droite avec les sous-domaines pouce (vert), paume (violet) et doigts (bleu). La tige-boucle beta est encadrée par des pointillés. **B)** Représentation de la protéine NS5B complète (PDB 1GX6) associée à la membrane du RE *via* une queue transmembranaire C-terminale. Le segment de liaison (gris) connecte le corps catalytique de NS5B à la séquence d'insertion dans la membrane (magenta). La structure indique la topologie membranaire de NS5A dans une conformation dite fermée, censée représenter l'état d'initiation de la polymérase. Le site actif est mis en évidence par deux nucléotides d'amorçage (jaune). Dans cette conformation, le sillon de liaison à l'ARN est masqué par l'ectodomaine de NS5B qui vient s'empiler à la membrane. **C)** Un modèle hypothétique représentant NS5B en mode d'élongation, ce qui libère le sillon de liaison à l'ARN. Un intermédiaire de réplication ARN double brin est représenté dans le site actif. La dislocation du corps catalytique de la membrane, induite par l'étirement du segment de liaison lors du « switch » de l'état d'initiation vers l'état d'élongation (Adapté de Bartenschlager et al., 2013).

III. Les modèles d'études

1. Les modèles animaux

1.1. Le chimpanzé

Le chimpanzé est le plus proche parent vivant de l'homme présentant une identité génétique de plus de 98%. C'est la seule espèce en dehors de l'homme qui peut être infectée par le VHC ([Billerbeck et al., 2013](#)).

Le chimpanzé a joué un rôle crucial dans la découverte du VHC comme agent étiologique de l'hépatite virale NANBH ([Choo et al., 1989](#); [Houghton, 2009](#)) et c'est sans doute l'animal qui a contribué le plus à nos connaissances sur cette maladie.

L'évolution clinique de l'infection par le VHC chez les chimpanzés est comparable à celle observée chez l'homme. Généralement, une semaine après l'infection la virémie devient détectable dans la circulation sanguine atteignant des titres au maximum de 10^5 - 10^7 copies/ ml. L'infection induit des réponses immunitaires innées et adaptatives significatives mesurables dans le sang périphérique et le foie entraînant fréquemment une hépatite, comme en témoignent les concentrations élevées d'enzymes hépatiques dans le sérum et des infiltrats inflammatoires dans le foie ([Billerbeck et al., 2013](#)). Cependant, des différences subsistent. Par exemple, l'hépatite aiguë est moins prononcée chez les chimpanzés que chez les humains. Les animaux infectés expérimentalement progressent moins souvent vers la chronicité avec un taux variant de 39 à 60 %, tandis que chez l'homme ce taux est plus important, variant de 70 et 85 % ([Meuleman and Leroux-Roels, 2009](#)). De plus, les chimpanzés développent rarement des maladies graves, telles que la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, qui sont les complications cliniques majeures de l'hépatite C chez les humains ([Billerbeck et al., 2013](#)).

Dans l'ensemble, le chimpanzé a été un modèle animal crucial pour la recherche sur le VHC et reste le « gold standard » comparé à tous les autres modèles animaux. Cependant, les coûts élevés et les préoccupations éthiques limitent de plus en plus l'accès à ce modèle, c'est pourquoi des efforts ont été faits pour essayer de développer des solutions alternatives, notamment des modèles animaux de petite taille.

1.2. Les souris

Les seuls modèles animaux de petite taille qui permettent une infection efficace par le VHC sont les souris immunodéficientes qui contiennent des xénogreffes de foie humain. Bien que ces souris ne peuvent pas être utilisées dans des études de l'immunité adaptative, elles ont néanmoins fourni de nouvelles informations sur les anticorps neutralisants, les interactions du VHC avec les récepteurs, la réponse innée de l'hôte, et sur certaines approches thérapeutiques (Bukh, 2012).

1.2.1. Le modèle uPA-SCID

Les souris déficientes de cellules T et B sont appelées souris SCID (*Severe combined immunodeficiency*). La première étude à avoir décrit une infection par le VHC dans un modèle murin a utilisé les souris SCID avec une modification génétique qui conduit à la surexpression du transgène uPA (*urokinase-type plasminogen activator transgene*) (Mercer et al., 2001). La surexpression spécifique de ce transgène au niveau du foie, provoque une dégénérescence des hépatocytes de la souris créant ainsi un environnement favorable pour la repopulation du foie de la souris par des hépatocytes primaires humains. Ces souris peuvent ensuite être infectées par le VHC (Mercer et al., 2001).

Pour que ces souris soient infectées, 70% à 80% de leur foie doit être repeuplé par des hépatocytes humains fonctionnels qui vont sécréter des protéines hépatiques humaines. On parle de greffe réussie si le niveau d'albumine humaine est d'au moins 1 mg/ml (Vanwolleghem et al., 2010). Le taux d'infection par le VHC dans ces souris est en corrélation directe avec le profil d'apparition de lipoprotéines humaines (Steenbergen et al., 2010). Cependant, l'inconvénient du modèle de souris uPA-SCID, est le taux très élevé de mortalité à cause de la transplantation intrasplénique d'hépatocytes primaires qui se fait dans les deux premières semaines de vie des souris (Mercer et al., 2001).

1.2.2. Les souris FRG

Il s'agit d'un modèle différent de lésion du foie de la souris basé sur la carence de fumaryle acétoacétate hydrolase (FAH), une enzyme dans la voie catabolique de

la tyrosine. Le manque de FAH conduit à l'accumulation de métabolites qui sont hépatotoxiques et les souris FAH $-/-$ meurent d'insuffisance hépatique (Grompe et al., 1993). Le croisement des souris FAH avec les souris immunodéficientes RAG2 $-/-$ IL-2R γ $-/-$ a permis de générer le modèle de souris FRG. Ce modèle a permis de greffer des hépatocytes humains à des taux très élevés (jusqu'à 95%) rendant ces souris susceptibles d'être infectées par le VHC (Bissig et al., 2010). L'avantage de ce modèle est que l'effet de la modification génétique qui entraîne une dégénérescence des hépatocytes peut être bloqué par l'administration orale d'un médicament. Les souris restent alors en bonne santé jusqu'au moment de la greffe où le médicament est retiré, et les souris sont injectées avec des hépatocytes humains.

1.2.3. Autres modèles de souris

Deux autres modèles de souris humanisées ont été décrits en 2011. Ces modèles ont été conçus pour pallier à l'absence de l'immunité adaptative dans les deux modèles précédents. Toutefois, leur utilisation est limitée par la faible réplication virale.

Le premier modèle de souris est un modèle transgénique (AFC8-huHSC/hep) qui supporte la prise de greffe de cellules progénitrices hépatocytaires et de cellules souches hématopoïétiques humaines, ce qui entraîne la repopulation du foie avec des hépatocytes humains et la reconstitution immunitaire avec des leucocytes humains (Washburn et al., 2011). L'inoculation de ces souris par du sérum de patients infectés par le VHC a montré que les foies des souris qui contenaient l'ARN viral ont été infiltrés par des cellules immunitaires humaines et présentent des signes d'hépatite et des taux d'enzymes hépatiques élevés ; des réponses de cellules T spécifiques du VHC ont été détectées, et environ la moitié de ces souris ont développé une fibrose du foie (Washburn et al., 2011).

Ce modèle aurait pu être le premier modèle animal de petite taille qui pourrait être utilisé pour étudier l'immunité adaptative et la pathogenèse lors de l'infection par le VHC. Cependant, il n'est pas clair si des particules virales infectieuses sont produites. De plus, ces souris n'ont pas les cellules B humaines entièrement fonctionnelles, ainsi le développement d'anticorps spécifiques du VHC est altéré. Il s'agit d'une limitation importante, étant donné l'importance probable des anticorps

neutralisants dans le contrôle de la progression de l'infection par le VHC et pour le développement de vaccins (Bukh, 2012).

Dans le second modèle de souris génétiquement humanisées (Rosa26-Fluc), une sous-population de cellules hépatiques de souris immunocompétentes exprime des récepteurs de surface cellulaire humains nécessaires pour l'entrée du VHC (Dorner et al., 2011). L'utilisation d'un virus génétiquement modifié exprimant le gène de la luciférase a permis de suivre l'entrée du VHC dans les hépatocytes de souris. Toutefois, il n'y a pas de preuves de réplication du VHC dans le foie et le virus n'a pas pu être détecté dans le sang, probablement en raison de mécanismes de restriction de l'hôte.

1.3. Autres petits modèles animaux

Des infections expérimentales par le VHC ont été obtenues chez le tupaïa, un petit mammifère génétiquement proche des primates qui est facile à maintenir et à reproduire (Xie et al., 1998). De plus, une étude a montré que des hépatocytes primaires de tupaïa peuvent être infectés, *in vitro*, par des sérums humains contaminés par le VHC et qu'ils produisent des particules virales infectieuses (Zhao et al., 2002). Cependant, même si ces animaux peuvent être infectés par le VHC ils n'ont pas trouvé une large utilisation. Probablement à cause des taux faibles et variables de l'infection et des titres viraux. Néanmoins, le développement d'une infection persistante et l'apparition de maladies chroniques du foie sont des caractéristiques intéressantes de ce modèle (Bukh, 2012).

Le rat a également été proposé comme modèle d'étude de l'infection par le VHC (Wu et al., 2005). Wu et al ont rapporté un modèle de rats immunocompétents, rendus tolérants, qu'ils ont ensuite transplantés avec des cellules hépatiques humaines. Après une inoculation de ces rats avec des sérums contaminés par le VHC, ils ont pu détecter les antigènes de VHC et la réplication d'ARN viral dans les cellules hépatiques humaines. Ils ont également enregistré une augmentation des niveaux de virémie, avec des pics des titres viraux aux semaines 8 et 12 après l'inoculation. De plus, les rats infectés présentaient des signes d'hépatite. Cependant, ce modèle animal n'a pas été largement utilisé et son utilité reste à prouver (Bukh, 2012).

2. Les modèles *in vitro*

2.1. Les pseudo-particules du VHC

Les pseudo-particules du VHC ou HCVpp (*Hepatitis C virus pseudoparticles*) sont la méthode de choix pour étudier les étapes précoces de l'infection par le VHC, comme l'attachement ou l'entrée, indépendamment des autres étapes du cycle viral. Il s'agit de pseudoparticules rétrovirales portant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC (Bartosch et al., 2003a). Ce système est basé sur la co-transfection de cellules HEK-293T avec trois vecteurs d'expression codant pour les protéines Gag-Pol du virus de la leucémie murine (MLV) ou celles du VIH, pour les glycoprotéines E1 et E2 du VHC, et pour un gène rapporteur (GFP ou luciférase), respectivement. L'entrée de ces particules rétrovirales dans le cytoplasme de la cellule cible conduit à la transcription inverse et à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. Le gène rapporteur est alors exprimé par les provirus intégrés permettant de détecter les événements productifs de l'entrée virale d'une manière rapide (Figure 18).

L'attachement et l'interaction des HCVpp avec les récepteurs cellulaires sont régis par le complexe fonctionnel E1-E2 intégré dans l'enveloppe de ces pseudoparticules. Par conséquent, les HCVpp peuvent être neutralisées par des anticorps ciblant les glycoprotéines virales E1 et E2 ou avec des sérums de patients infectés (Hsu et al., 2003). L'incorporation de glycoprotéines dérivées de patients a également été décrite pour les HCVpp qui peuvent être utilisées pour étudier les anticorps neutralisants (Bartosch et al., 2003b; Fafi-Kremer et al., 2012; Fofana et al., 2012). Néanmoins, une limitation majeure à ce système, est que les pseudoparticules sont produites dans une lignée cellulaire non-hépatique (HEK-293T) et qu'ils suivent une voie d'assemblage et d'export qui est celle des rétrovirus. Par conséquent, l'association étroite des particules de VHC avec les lipoprotéines ne peut être reproduite dans ce système, ce qui peut limiter un certain nombre d'études telles que les tests d'anticorps neutralisants ou l'étude d'interaction avec certains récepteurs lipidiques impliquée dans l'entrée virale (Steinmann and Pietschmann, 2013).

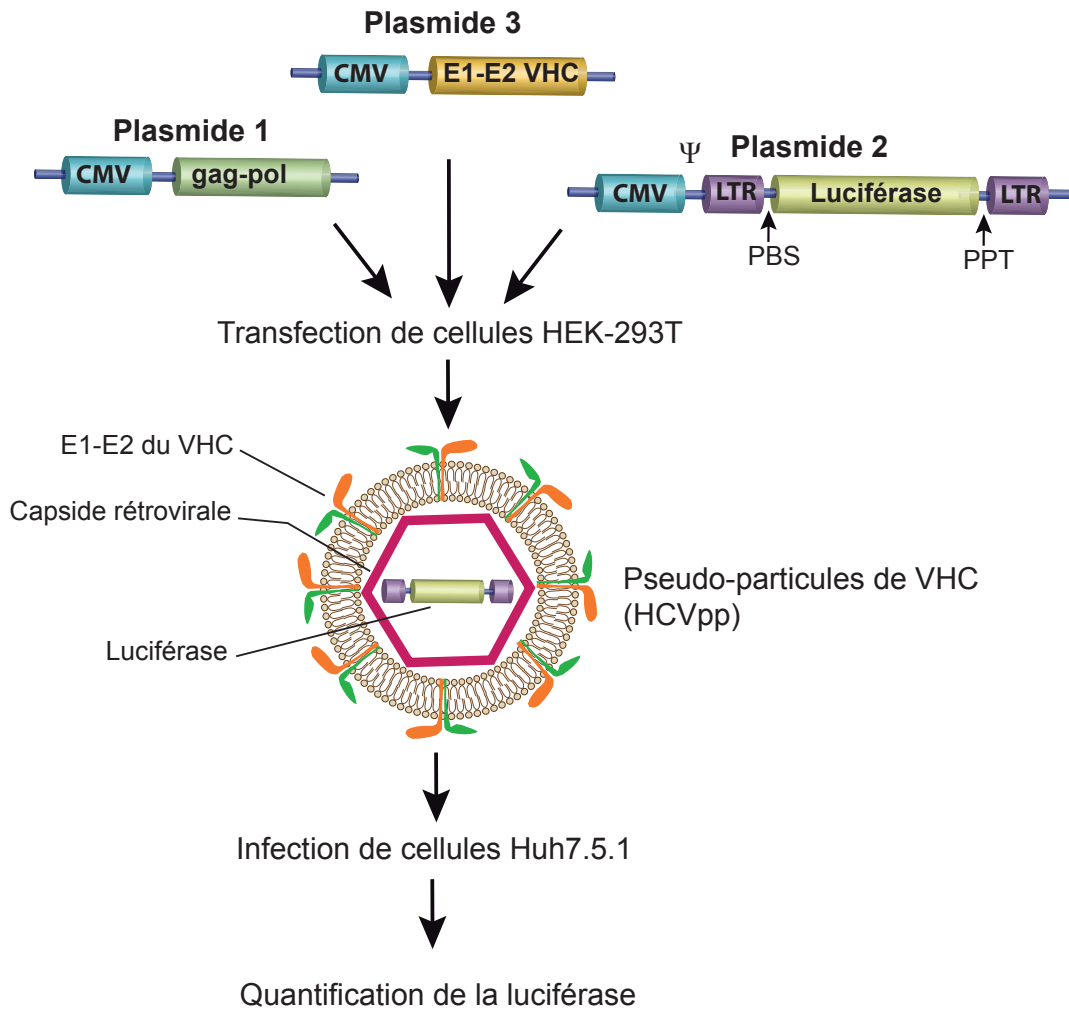


Figure 18. Production de pseudo-particules du VHC.

Pour la production de pseudo-particules, des cellules HEK-293T sont transfectées avec trois vecteurs : le premier code pour les protéines rétrovirales Gag et Pol. Les protéines Gag sont responsables de l'encapsidation de l'ARN *via* la reconnaissance des séquences spécifiques d'encapsidation rétrovirale (Ψ) et du bourgeonnement des particules au niveau de la membrane plasmique. Le second vecteur contient les séquences d'encapsidation (Ψ) et code pour le gène rapporteur de la luciférase. Ce vecteur contient également des séquences rétrovirales qui sont nécessaires pour la transcription inverse (rétrotranscription) de l'ARN en ADN et son intégration dans l'ADN génomique de l'hôte par les protéines rétrovirales Pol codées par le premiers vecteur. Le troisième vecteur code pour les glycoprotéines virales E1 et E2, qui sont responsables du tropisme cellulaire et de la fusion des pseudo-particules avec la membrane des cellules cibles. Les pseudo-particules du VHC secrétées par les cellules HEK-293T sont utilisées pour infecter les cellules de la lignée hépatique cancéreuse Huh7. L'infektivité des pseudo-particules est évaluée par la quantification de l'activité de la luciférase dans les cellules Huh7. LTR, *long terminal repeat* ; PBS, *primer binding site* ; PPT, *polypurine tract* ; CMV, promoteur précoce du cytomégalovirus (Adapté de Voisset and Dubuisson, 2004).

2.2. Les réplicons subgénomiques et génomiques

Les systèmes réplicons subgénomiques permettent d'étudier exclusivement l'étape de la réplication virale (Lohmann et al., 1999). Dans ce système, les gènes codants pour les protéines structurales (Core, E1 et E2), ainsi que les protéines p7 et NS2 ont été supprimés générant des molécules d'ARN beaucoup plus petites que le génome viral authentique. Ceci a donné la possibilité d'insérer un marqueur de sélection tel que la néomycine phosphotransférase (Neo), sans dépasser la longueur naturelle du génome du VHC.

Le réplicon « prototype » était un ARN bicistronique de génotype 1b (isolat Con1) dans lequel le gène de résistance à la néomycine est sous le contrôle de l'IRES du VHC, suivi d'un deuxième IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) qui contrôle l'expression des gènes codant pour les protéines non-structurales (NS3 à NS5B) du VHC (Figure 19) (Lohmann et al., 1999). Les transcrits d'ARNs issus de cette construction ont été obtenus *in vitro* et utilisés pour transfecter des cellules de la lignée hépatocytaire humaine Huh7. Les cellules sont ensuite maintenues en culture dans du milieu de sélection avec antibiotique (G418), ce qui a permis d'isoler des clones cellulaires capables de répliquer, de manière autonome, le génome viral (Lohmann et al., 1999). Néanmoins, il a été observé que certains clones cellulaires permettaient une meilleure réplication virale que d'autres et seraient donc plus permissifs. En se basant sur cette observation des cellules Huh7 répliquant fortement le virus ont été isolées puis traitées à l'INF- α afin d'éliminer les réplicons viraux. Lorsque ces cellules ont été de nouveau transfectées par les ARNs subgénomiques, elles ont montré une meilleure capacité à répliquer le virus (Blight et al., 2002). C'est de cette manière que les cellules hautement permissives Huh7.5 (Blight et al., 2002) et Huh7.5.1 (Zhong et al., 2005) ont été obtenues à partir de la lignée cellulaire Huh7. Dans le cas des cellules Huh7.5, l'augmentation de la permissivité semble être le résultat d'une mutation qui inactive le facteur RIG-I conduisant à un déficit dans la voie de signalisation de l'INF, importante pour l'immunité cellulaire innée (Sumpter et al., 2005).

Des réplicons génomiques ont également été mis au point (Pietschmann et al., 2002). Ils codent pour l'ensemble des protéines virales. Comme pour les réplicons subgénomiques, ils ont la faculté de se répliquer en culture cellulaire, sous

pression de sélection antibiotique, et expriment l'ensemble des protéines virales. Néanmoins, ils ne permettent pas la production de particules virales infectieuses (Pietschmann et al., 2002).

Dans l'ensemble, les systèmes réplicons sont des outils précieux pour l'étude de la réplication du VHC. Ils ont permis de déterminer le rôle des différentes régions génomiques et des protéines virales, leurs interactions avec l'hôte et leur localisation intracellulaire. Ils ont également permis de tester différents composés thérapeutiques qui interfèrent avec la réplication virale (Bukh, 2012).

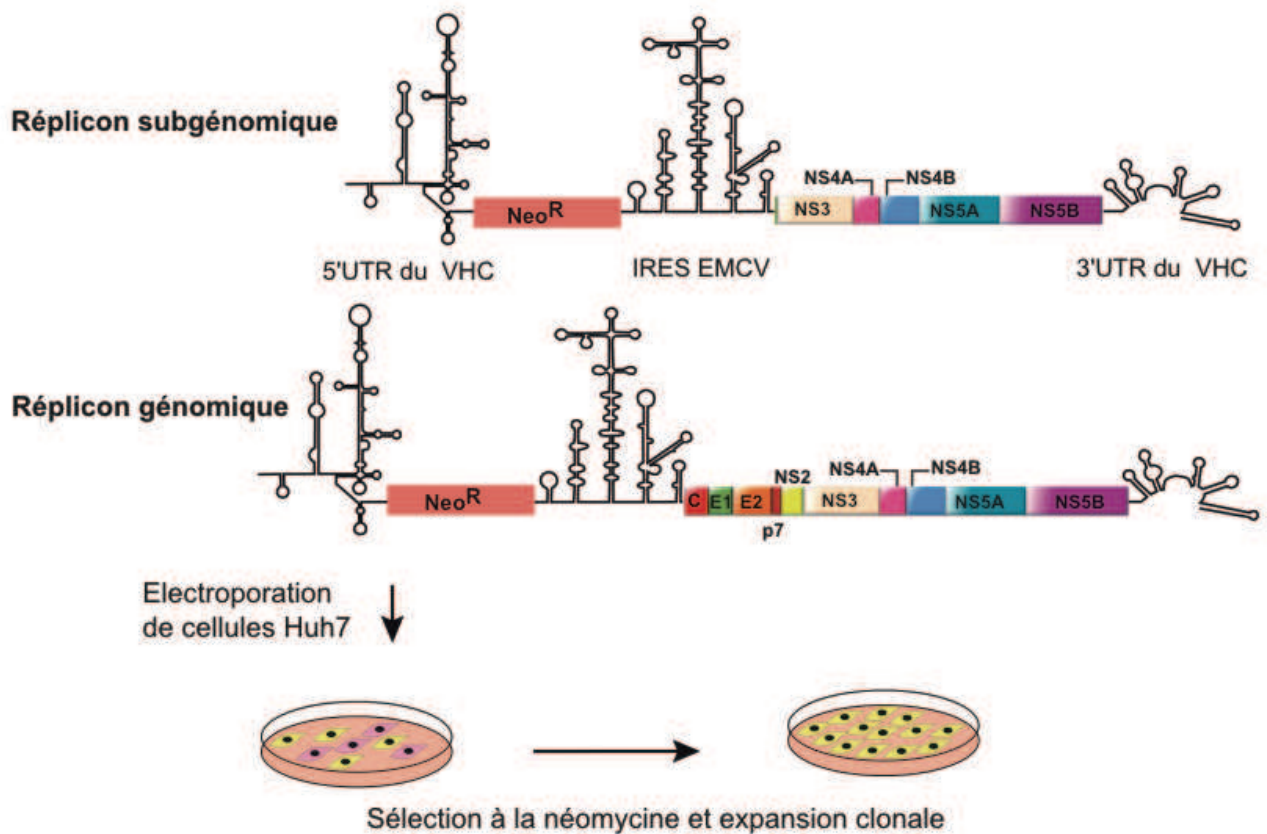


Figure 19. Représentation schématique du système réplicon du VHC.

La réplication de l'ARN du VHC peut être quantifiée en utilisant les systèmes réplicons subgénomiques ou génomiques. Ces ARNs du VHC auto répliquatifs contiennent un marqueur de sélection, en général un gène de résistance à un antibiotique, qui permet de faire une sélection positive des clones répliquatifs. Le marqueur de sélection est contrôlé par l'IRES du VHC alors que les protéines virales sont sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV.

2.3. Les particules VHC produites en culture cellulaire

En 2001, Kato et ses collègues ont publié la séquence d'un clone du VHC appelé JFH1 (*Japanese fulminant hepatitis 1*), appartenant au génotype 2a, qu'ils ont isolé chez un patient japonais souffrant d'une hépatite fulminante (Kato et al., 2001). Le réplicon subgénomique construit à partir de ce clone, avait la particularité de se répliquer à des taux très élevés dans les cellules Huh7 atteignant des titres d'ARN 20 fois supérieurs à ceux obtenus avec le réplicon Con1 (génotype 1b). De plus, le réplicon JFH1 pouvait se répliquer efficacement sans pression de sélection antibiotique (Kato et al., 2003).

Quelques années plus tard, trois groupes ont rapporté que la transfection du génome entier du JFH1 dans des cellules Huh7 en culture, permettait non seulement la réplication de l'ARN et l'expression de protéines virales, mais surtout la production efficace de particules virales infectieuses (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Ces particules virales sont capables d'infecter des cellules Huh7 naïves. Mais leur authenticité a surtout été confirmée par leur capacité à infecter les chimpanzés et les souris contenant des xénogreffes de foie humain (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005). Ces particules produites ont été appelées HCVcc (*Cell culture-derived HCV*) et sont actuellement utilisées en routine dans de nombreux laboratoires.

Le système des HCVcc permet d'étudier le cycle entier du VHC en culture cellulaire. Cependant, il se limite à un seul isolat, qui est le clone JFH1, et ne permet pas de faire des études comparables avec d'autres génotypes. Pour surmonter cette contrainte, un ensemble de génomes chimériques a été construit en combinant le JFH1 avec des souches hétérologues de tous les principaux génotypes du VHC.

Dans la plupart des cas, les gènes codant pour NS3 à NS5B sont issus du JFH1 alors que les gènes codant pour Core à NS2 proviennent d'autres souches intra- ou intergénomiques (Figure 19) (Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006). Cette stratégie a permis de mettre à jour un chimère intragénomique (J6/JFH1) beaucoup plus infectieux que JFH1, permettant des rendements supérieurs en HCVcc, le clone Jc1 (Lindenbach et al., 2005). De plus, des génomes contenant des gènes rapporteurs (luciférase) ont été développés pour faciliter l'étude et l'évaluation rapide de la réplication virale (Figure 19) (Koutsoudakis et al., 2006).

Ainsi grâce au système HCVcc, chaque étape du cycle viral peut être étudiée ; pas seulement l'entrée virale et la réplication mais aussi les événements tardifs tels que l'assemblage et l'export des des virions.

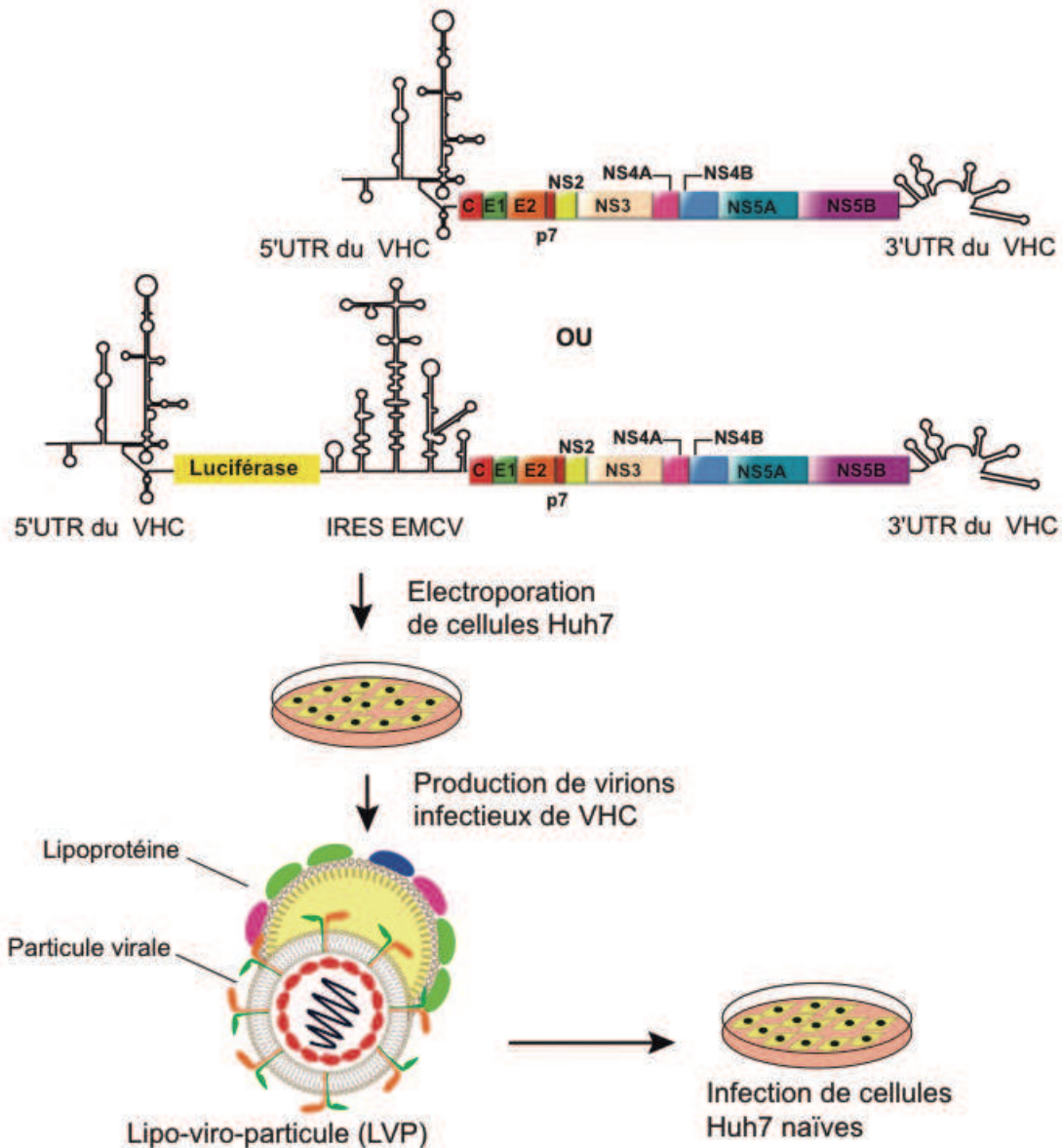


Figure 20. Représentation schématique du système HCVcc.

La production de particules virales issues de culture cellulaire est basée sur l'utilisation de l'isolat JFH1 (génotype 2a) et ses dérivés. La transfection d'hépatocytes humains permissifs par des ARNs viraux permet la production de particules virales capables d'infecter de nouvelles cellules, permettant ainsi d'accomplir le cycle viral du VHC en entier. Il existe des variants qui portent le gène rapporteur de la luciférase permettant une évaluation rapide de l'infection. La traduction de la luciférase est contrôlée par l'IRES du VHC, alors que la traduction des protéines virales est contrôlée par l'IRES de l'EMCV.

IV. Le cycle viral

Grace à l'élaboration et à la mise en place des différents modèles d'études, notre compréhension du cycle de développement du VHC a beaucoup évolué ces dernières années et a permis d'établir un schéma globale représentant les étapes majeures du le cycle viral du VHC (Figure 21).

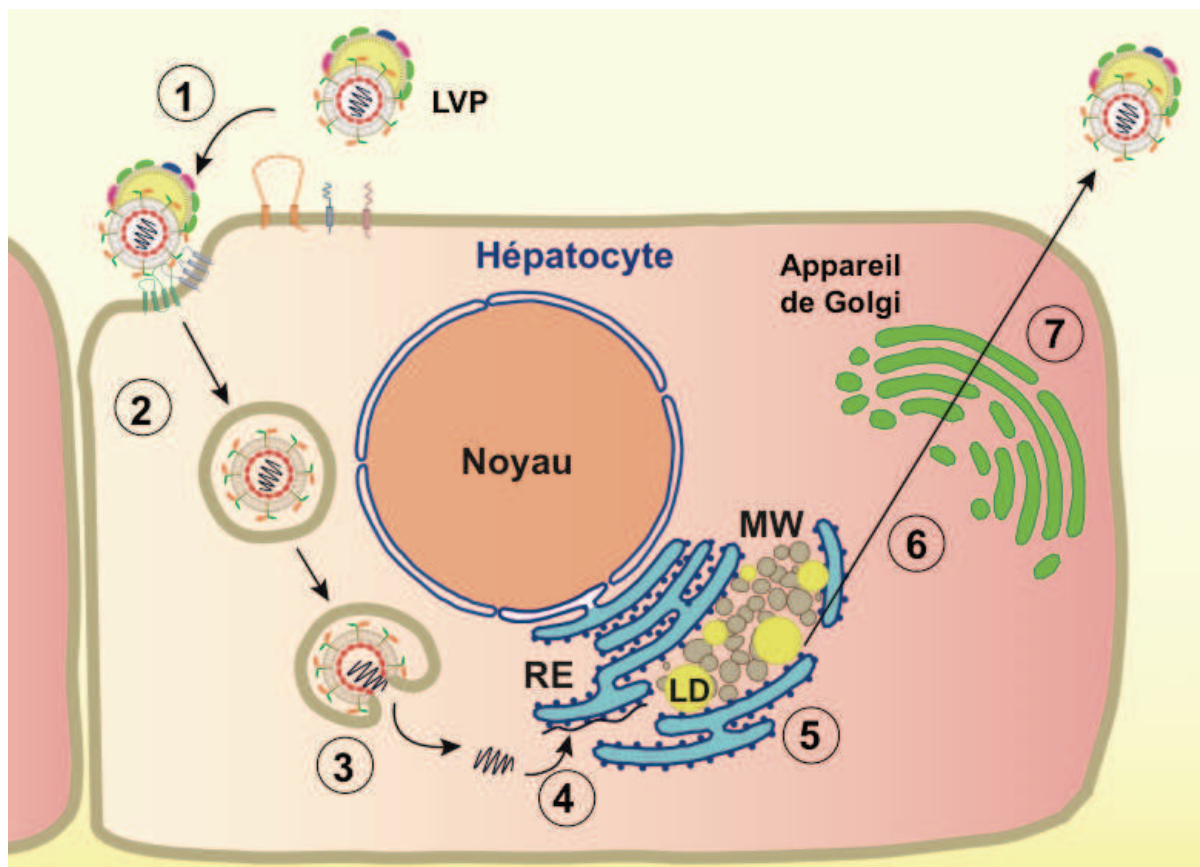


Figure 21. Schéma présentant les étapes majeures du cycle viral du VHC.

(1) Les virions se lient à la surface des cellules via des récepteurs spécifiques. (2) Les particules sont endocytées par une voie clathrine-dépendante (3) puis, décapsidées, permettant la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. (4) La traduction du génome permet de synthétiser les protéines virales qui vont former le complexe de réplication au niveau du RE. (5) La réplication de l'ARN du VHC conduit à la synthèse de nouvelles molécules d'ARN (+) (6) Les virions sont ensuite assemblés et (7) sécrétés. LVP : Lipo-viro-particule, RE : Réticulum Endoplasmique, LD : *Lipid Droplet*, MW : *Membranous Web*.

1. L'entrée virale

L'entrée virale est la première étape d'interaction du virus avec la cellule hôte conduisant à une infection productive. L'entrée du VHC est considérée comme un processus hautement orchestré impliquant plusieurs facteurs viraux et cellulaires de l'hôte (Zeisel et al., 2011). Comme pour d'autres virus enveloppés, les glycoprotéines de l'enveloppe définissent dans une large mesure les interactions entre le VHC et la cellule hôte. Néanmoins, en raison de l'association du VHC avec les lipoprotéines, dans le sang d'individus infectés, certains composants des lipoprotéines contribuent également aux interactions du virus avec la cellule hôte pour une revue voir (Zeisel et al., 2013).

Grace à l'utilisation des différents modèles d'études, plusieurs molécules de surface cellulaires ont été identifiées comme jouant un rôle dans l'entrée du VHC. Il s'agit notamment de la tétraspanine CD81 (*Cluster of Differentiation 81*) (Pileri et al., 1998), le récepteur des LDLs (LDLR) (Agnello et al., 1999), les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs) (Barth et al., 2003), le récepteur SR-BI (*Scavenger receptor class B member 1*) (Scarselli et al., 2002), DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) et L-SIGN (*Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*) (Lozach et al., 2004; Pöhlmann et al., 2003), les protéines de jonctions serrées claudin-1 (CLDN1) (Evans et al., 2007) et occludin (OCLN) (Ploss et al., 2009), EGFR (*Endothelial growth factor receptor*) (Lupberger et al., 2011) et NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1*) (Sainz et al., 2012). Certains de ces facteurs sont directement impliqués dans l'interaction avec le virus et/ ou dans l'entrée virale et sont donc considérés comme des récepteurs ou corécepteurs. Alors que d'autres facteurs, bien qu'essentiels, ont un effet indirect sur l'entrée du virus (Zeisel et al., 2013).

Bien que L-SIGN et DC-SIGN ne soient pas localisés à la surface des hépatocytes, ils sont considérés comme récepteurs d'entrée du VHC ; *in vivo*, le VHC pénètre dans le foie par le sang sinusoïdal et la capture des particules circulantes par les cellules sinusoïdales peut faciliter l'infection des hépatocytes voisins qui ne sont pas en contact direct avec le sang circulant. Ce rôle est justement joué par les récepteurs DC-SIGN et L-SIGN, qui sont exprimés dans les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoïdales, respectivement, qui se trouvent à

proximité des hépatocytes. L'interaction de la particule virale avec ces récepteurs se ferait *via* la glycoprotéine virale E2 (Gardner et al., 2003; Pöhlmann et al., 2003).

Sur les hépatocytes, les HSPGs et le LDLR représentent les premiers sites d'attachement et peuvent aider à concentrer le virus sur la surface basolatérale de la cellule cible. Le virus peut alors établir de nouvelles interactions avec d'autres récepteurs cellulaires tels que SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN, déclenchant des réarrangements moléculaires au niveau de la membrane plasmique conduisant à l'internalisation de la particule virale par voie clathrine-dépendante (Figure 22) (Blanchard et al., 2006). D'autres facteurs comme EGFR et NPC1L1 jouent un rôle indirect dans l'entrée. Tandis que EGFR, à travers la transduction de signaux, induit la formation de complexes CD81-CLDN1 requis pour l'entrée du VHC (Lupberger et al., 2011). Le rôle exact de NPC1L1 dans l'entrée virale n'est pas encore bien connu. Néanmoins, on pense qu'il agirait indirectement *via* la régulation du cholestérol (Felmlee et al., 2013; Lupberger et al., 2012). Après internalisation de la particule virale la fusion a lieu dans les endosomes précoces (Coller et al., 2009). Ce processus a lieu à pH très bas et implique à la fois des protéines virales et cellulaires (Blanchard et al., 2006).

En plus du mode d'entrée classique (tel qu'il a été décrit ci-dessus) qui permet l'initiation de l'infection des hépatocytes par les virions circulant dans le sang, la diffusion du VHC dans le foie et l'établissement d'une infection chronique peut être possible grâce la transmission directe du virus de cellule à cellule entre hépatocytes adjacents (Timpe et al., 2008). La transmission du VHC de cellule à cellule a été décrite pour tous les génotypes majeurs et semble être plus efficace que l'entrée de particules par le milieu extracellulaire *in vitro* (Brimacombe et al., 2011). De plus, contrairement au mode de transmission par le milieu extracellulaire, ce processus semble être résistant à la plupart des anticorps neutralisants et peut potentiellement contribuer à l'évasion à la réponse immunitaire humorale de l'hôte et l'établissement de l'infection chronique *in vivo* (Brimacombe et al., 2011; Timpe et al., 2008).

Par ailleurs, il existe des similitudes frappantes entre les mécanismes moléculaires de l'entrée par le milieu extracellulaire et la transmission de cellule à cellule du VHC. En effet, la transmission de cellule à cellule semble exiger de nombreux facteurs de l'hôte également importants lors de l'entrée par le milieu extracellulaire : CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN, EGFR et potentiellement NPC1L1. Alors que CD81 ne semble

Etude du rôle des protéines cellulaires RACK1 et TIP47 dans l'infection par le virus de l'hépatite C pas impliqué dans ce processus, le rôle du LDLR n'a pas été étudié jusqu'à présent (Zeisel et al., 2013).

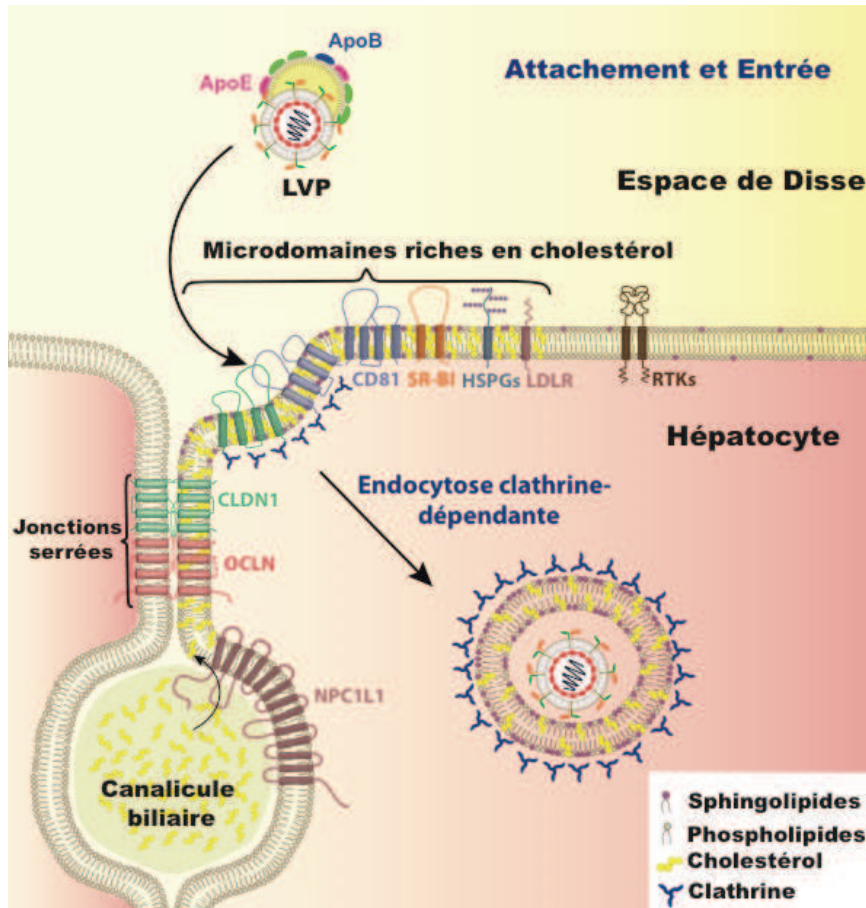


Figure 22. L'entrée du VHC dans les hépatocytes.

L'entrée du VHC dans les hépatocytes est un processus complexe dans lequel plusieurs facteurs de l'hôte sont impliqués, à savoir : la tétraspanine CD81, le récepteur des LDLs (LDLR), les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs), le récepteur SR-BI, les protéines de jonctions serrées claudine-1 (CLDN1) et occludine (OCLN), les récepteurs tyrosine kinase (RTKs) et NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1*). La LVP se lie initialement aux HSPGs et au LDLR *via* apoE. L'interaction ultérieure avec SR-BI, CD81, CLDN1, et OCLN conduit à l'internalisation virale au niveau de microdomaines riches en cholestérol par endocytose clathrine-dépendante. D'autres facteurs d'entrée tels que les RTKs et NPC1L1 sont des cofacteurs de régulation ; Les RTKs comme l'EGFR (*Endothelial growth factor receptor*) promeuvent l'entrée par la transduction de signaux induisant l'association de CD81-CLDN1 et la fusion membranaire. NPC1L1, quant à lui agit probablement sur la régulation du cholestérol (Adapté de Felmlee et al., 2013).

2. La traduction

Une fois libéré dans le cytoplasme, l'ARN viral est pris en charge par la machinerie traductionnelle de la cellule, au voisinage du RE. Contrairement, à la plupart des ARNm cellulaires qui nécessitent une multitude de facteurs d'initiation (eIFs) pour assurer leur traduction selon un mécanisme classique, dit « coiffe-dépendant », l'ARN du VHC nécessite seulement un sous-ensemble de facteurs d'initiation grâce à un mécanisme IRES-dépendant.

2.1. Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

La traduction classique coiffe-dépendante employée par la plupart des ARNm cellulaires nécessite la présence d'éléments en *Cis* propres à ces ARNm qui vont permettre de recruter de nombreux facteurs cellulaires (Figure 23) agissant en *Trans* afin d'orchestrer le bon positionnement du ribosome au niveau du codon initiateur et d'amorcer l'initiation de la traduction (Jackson et al., 2010; Myasnikov et al., 2009).

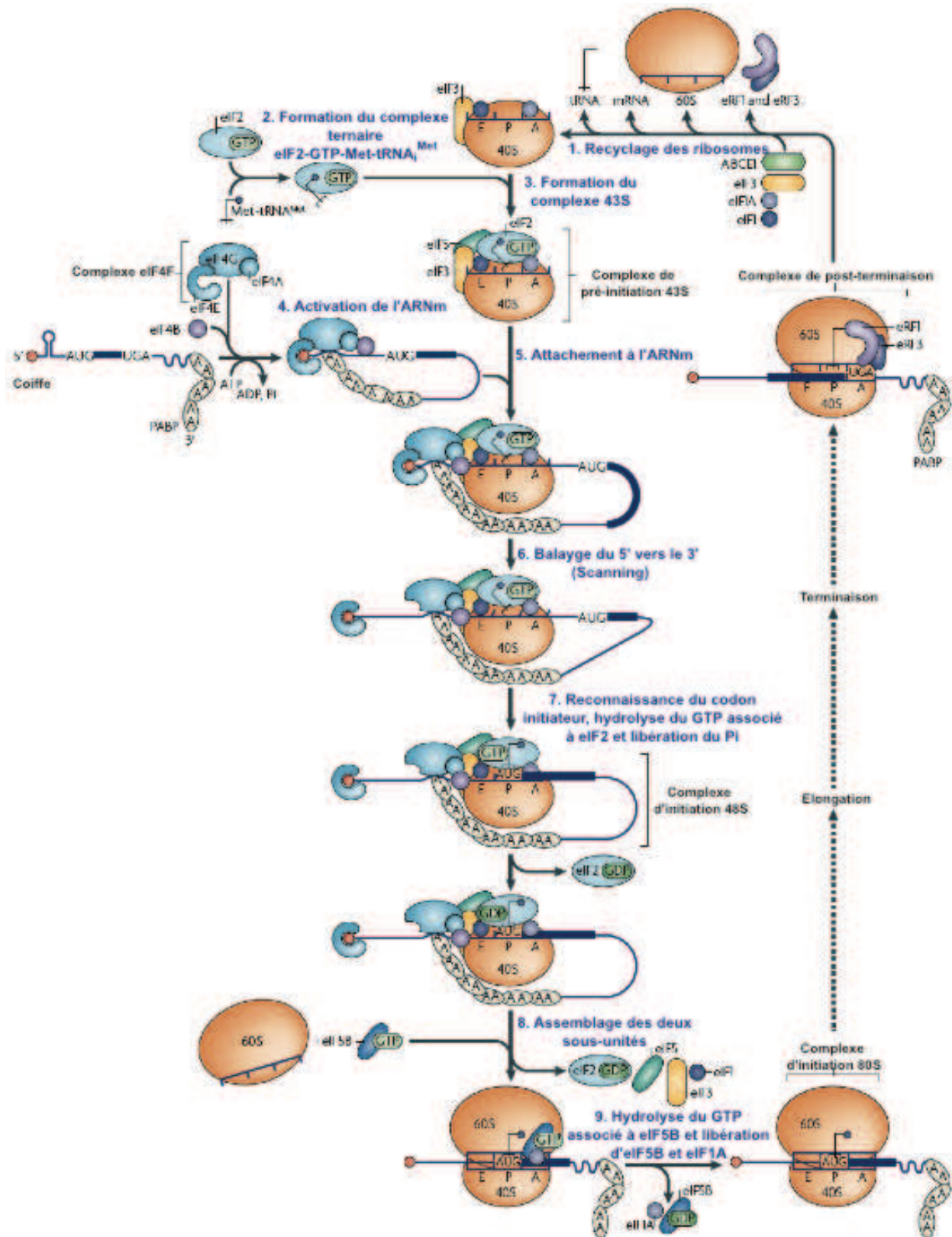


Figure 23. Modèle de l'initiation de la traduction canonique chez les eucaryotes.

La voie canonique de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes peut être divisée en huit étapes (2-9). Ces étapes font suite au recyclage des complexes de post-terminaison conduisant aux sous-unités ribosomales 40S et 60S, et à la formation d'un complexe d'initiation 80S, dans lequel le Met-tRNA_i^{Met} est apparié au codon initiateur dans le site P du ribosome, qui devient alors compétent pour l'étape d'élongation (Adapté de Jackson et al., 2010).

2.1.1. Initiation de la traduction coiffe-dépendante

La vaste majorité des ARNm cellulaires ont deux modifications majeures à leurs extrémités, importantes pour le recrutement de la machinerie traductionnelle cellulaire. A l'extrémité 5' se trouve la « coiffe », il s'agit d'une guanosine méthylée en position N7 (m7G), liée au nucléotide suivant par une liaison 5'-5' triphosphate (m7G(5')-PPP-(5')N) (Figure 23). Cette coiffe sert, de protection contre les exonucléases, de signal d'export nucléo-cytoplasmique et de site de reconnaissance par la sous-unité eIF4E du complexe eIF4F.

A l'extrémité 3', ces ARNm possèdent une queue poly(A) d'environ 200 nts de long qui est tapissée par une protéine appelée PABP (*Poly(A) Binding Protein*). En plus de protéger l'ARNm contre les exonucléases, la queue poly(A) stimule, *via* la PABP, la traduction des ARNm coiffés. En effet, en interagissant avec la sous-unité eIF4G du complexe eIF4F qui se trouve en 5', la PABP permet la circularisation de l'ARNm et par conséquent facilite le recyclage des ribosomes de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Cette interaction pourrait également induire un changement conformationnel de eIF4G rendant le recrutement des ribosomes plus efficace. En tous les cas, il est admis que la PABP joue un rôle sélectif dans l'initiation de la traduction en permettant, uniquement, aux ARNm non dégradés, possédant une région 3' intacte, d'être traduits de manière efficace (Niepmann, 2009).

L'initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes peut être décrite selon le modèle du « *scanning* », et implique la formation de trois complexes intermédiaires majeurs : Le premier est le complexe de pré-initiation 43S. Le deuxième est le complexe d'initiation 48S qui se forme lorsque le complexe 43S atteint le codon d'initiation AUG et que les interactions codon-anticodon sont établies. Le troisième est le complexe d'initiation 80S qui se forme suite à l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques et la libération des facteurs d'initiation (Myasnikov et al., 2009 ; Jackson et al., 2010).

La traduction étant un processus cyclique, les sous-unités ribosomiques qui participent à l'initiation de la traduction proviennent de la dissociation des complexes ribosomiques des cycles de traduction précédents. eIF3, eIF1 et eIF1A jouent un rôle important dans ce processus en libérant la sous-unité (SU) 60S, l'ARNt et l'ARNm. En revanche, ces eIFs restent associés à la SU 40S empêchant ainsi sa réassociation avec la SU 60S (Pisarev et al., 2007). Par ailleurs, la SU 60S est

reconnue par eIF6, un autre facteur qui aurait également un rôle à jouer dans le maintien des deux sous-unités ribosomiques séparées (Ceci et al., 2003).

Le complexe de pré-initiation 43S est formé lorsque eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} vient rejoindre la SU 40S en se liant simultanément à eIF3, eIF1 et eIF1A. L'attachement du complexe 43S sur la région proximale de la coiffe de l'ARNm est médié par le complexe hétéro-trimérique eIF4F, constitué de eIF4E, eIF4A et eIF4G. Tandis que eIF4E reconnaît la coiffe en 5', eIF4A déroule l'ARN dans la région proximale de la coiffe grâce à son activité hélicase ATP-dépendante en coordination avec son cofacteur eIF4B. eIF4G, quant à lui, sert d'intermédiaire et lie à la fois eIF4E, eIF4A et eIF3. eIF4G interagit également avec la PABP permettant la circularisation de l'ARNm et renforce d'avantage la liaison du complexe 43S à ce dernier (Jackson et al., 2010). Les facteurs eIF1 et eIF1A agissent de concert pour promouvoir la reconnaissance du bon codon initiateur à travers le balayage de la région 5'UTR, appelé « *scanning* » (Pestova et al., 1998a); cette activité est améliorée par la présence d'une protéine appelée DHX29, notamment, pour dérouler les régions très structurées de l'ARN (Pisareva et al., 2008).

La formation du complexe d'initiation 48S a lieu lorsque le complexe 43S s'arrête au niveau du codon initiateur, correspondant au premier AUG se trouvant dans un contexte nucléotidique favorable, permettant un appariement des bases entre le codon initiateur et l'anticodon du Met-ARNt_i^{Met}. Les codons d'initiation qui s'écartent du contexte optimal **AccAUGG**, particulièrement au positions - 3 et + 4 (En gras) peuvent être évités par les complexes de scanning, ayant pour conséquence une initiation plus en aval (Kozak, 1991). eIF5 induit l'hydrolyse du GTP associé à eIF2 et la dissociation du eIF2-GDP de la SU 40S (Figure 23).

Finalement, la formation du complexe d'initiation 80S a lieu lorsque la grande SU 60S vient rejoindre le complexe 48S avec l'aide de eIF5B-GTP. En effet, grâce à son activité GTPasique eIF5B hydrolyse le GTP associé, conduisant à la libération de eIF5B-GDP et des autres facteurs d'initiation, permettant au ribosome d'entrer dans la phase d'élongation (Figure 23) (Pestova et al., 2000).

2.1.2. Initiation de la traduction IRES-dépendante

Sous l'effet de divers stress cellulaires ou lors d'infections virales, la traduction cap-dépendante est globalement réprimée, et seuls les ARNs qui possèdent un IRES peuvent être traduits en utilisant un mécanisme cap-indépendant pour l'initiation de la traduction (Sonenberg and Hinnebusch, 2009).

Les IRES sont fonctionnellement définis comme étant des éléments d'ARN qui, lorsqu'ils sont introduits dans une région inter-cistronique d'un ARNm bicistronique, assurent la traduction du deuxième cistron (en aval de l'IRES) indépendamment de la traduction du premier cistron (en amont de l'IRES). Les premiers IRES à avoir été identifiés sont ceux du poliovirus et du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), deux virus appartenant à la famille des *Picornaviridae* (Jang et al., 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988). La présence d'un IRES a été considérée pendant longtemps comme une marque des picornavirus, mais par la suite, des IRES ont été également caractérisés chez les *Flaviviridae* et chez les *Retroviridae* de même que chez certains ARNs messagers cellulaires. En effet, on estime qu'environ 10% des ARNm cellulaires seraient traduits selon un mécanisme cap-indépendant (Landry et al., 2009).

Les IRES viraux sont généralement classés en quatre groupes. Cette classification est basée sur le nombre de facteurs d'initiation canoniques (les eIFs) et non-canoniques, appelés ITAFs (*IRES Trans Acting Factors*), dont ils ont besoin. Elle dépend également de l'emplacement et de l'utilisation du site d'initiation de la traduction (Figure 24).

Les IRES du poliovirus et de l'EMCV font approximativement 450 nts de long et représentent les deux classes majeurs d'IRES de type I et type II, respectivement. Les deux ont besoin d'ITAFs, de plusieurs eIFs et du Met-ARNt_i^{Met}. Tandis que les IRES de type I ont recours à un mécanisme de scanning pour atteindre le codon initiateur qui se trouve plus en aval, les IRES de type II recrutent directement la sous-unité 40S au niveau de l'AUG initiateur (sans scanning).

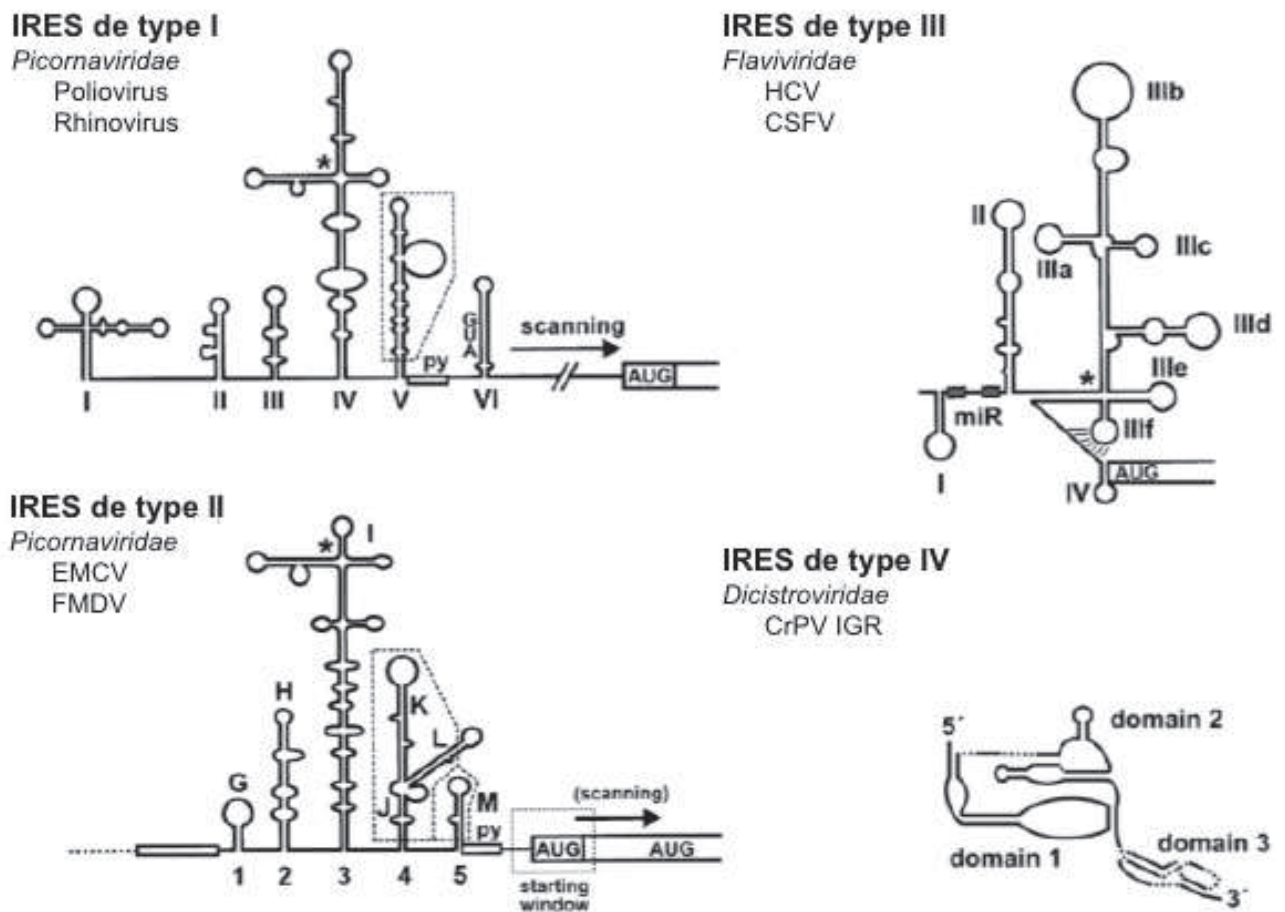


Figure 24. Représentation schématique des éléments IRES des différentes classes.

Les IRES de type I et de type II sont représentés par l'IRES du Poliovirus et de l'EMCV, respectivement. Ces IRES ont des similarités. Les domaines centraux et les domaines de liaison des facteurs d'initiation (indiqués en pointillés) sont alignés. La jonction à quatre voies de type ARNT dans le domaine central est marquée par un astérisque. Les IRES de type III sont représentés par l'IRES du VHC, alors que les IRES de type IV sont représentés par l'IRES intergénique du CrPV. Les IRES de type III et type IV sont structurellement distincts des IRES de type I et type II. Les sites de liaison du micro-ARN 122 (miR-122) sur l'IRES du VHC sont indiqués par des cadres (Adapté de Niepmann, 2009).

Les IRES de type I et II ont des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes (Figure 24). A savoir : Un large domaine central avec une jonction à quatre voies de type ARNT très caractéristique qui constitue une sorte de noyau de l'IRES. La similitude de cette structure avec celle des ARNT est illustrée expérimentalement par le fait qu'elle soit coupée par l'ARNase P, une enzyme de maturation qui coupe les précurseurs des ARNT (Lyons and Robertson, 2003). L'initiation de la traduction chez ces deux types d'IRES nécessite le même jeu d'eIFs que pour une initiation classique (Coiffe-dépendante), à l'exception d'eIF4E. Cela permet aux picornavirus de promouvoir la traduction de leurs ARNs au détriment des

ARNm cellulaires. EMCV par exemple adopte deux stratégies pour contrecarrer la traduction coiffe-dépendante des ARNm cellulaires. D'une part, il va induire la déphosphorylation de eIF4E-BP1 (*eIF4E binding protein 1*) qui va se lier aussitôt à eIF4E empêchant ainsi son recrutement au niveau de la coiffe (Gingras et al., 1996). D'autre part, la protéine 2A de l'EMCV s'associe à la sous-unité 40S du ribosome et empêche son interaction avec les ARNm coiffés (Groppo and Palmenberg, 2007). Le poliovirus quant à lui utilise une protéase virale pour couper la partie N-terminale de eIF4G responsable de son interaction avec eIF4E interrompant ainsi le pont entre la coiffe des ARNm cellulaires et les ribosomes. La même stratégie est également utilisée par le virus de la fièvre aphteuse FMDV, un picornavirus qui possède un IRES de type II (Etchison et al., 1982). La forme clivée d'eIF4G est aussi bien utilisée par les IRES de type I que par les IRES de type II : Le même domaine d'eIF4G se lie directement et spécifiquement à l'IRES de EMCV et à celui du poliovirus au niveau d'une région adjacente au codon d'initiation, recrute eIF4A et promeut la liaison du complexe 43S à l'IRES, suggérant que les aspects sous-jacents du mécanisme d'initiation de ces deux classes d'IRES sont similaires.

Les IRES de type III et type IV sont différents les uns par rapport aux autres, par leurs séquences et leurs structures, et se distinguent des IRES de type I et de type II (Figure 24). L'initiation sur ces IRES a lieu par des mécanismes différents, mais implique dans les deux cas une interaction directe de l'IRES avec la SU 40S indépendamment des facteurs d'initiation (Hellen, 2009). Les IRES de type III, représentés par l'IRES du VHC, recrutent la SU 40S directement au niveau de l'AUG initiateur et utilisent un nombre très limité de facteurs d'initiation, à savoir eIF3, eIF2 et son cofacteur eIF5 (Pestova et al., 1998b).

Les IRES de type IV regroupent l'ensemble des IRES de la région intergénique (IGR) des Dicistroviridae. Ils sont représentés par l'IRES du virus de la paralysie du criquet (CrPV). Cet IRES est l'exemple le plus extrême connu à ce jour, car il peut se lier directement au ribosome en l'absence de tout facteur d'initiation y compris le Met-ARNT_i^{Met} et initier la traduction de manière méthionine indépendante en positionnant un codon non-AUG dans le site P du ribosome (Kieft and Martinez-Salas, 2009; Niepmann, 2009).

2.1.3. La traduction IRES-dépendante du VHC

Dans la région 5'UTR du génome viral, l'IRES du VHC comprend la tige-boucle II, les tiges boucles III et IV, et quelques nucléotides de la phase codante du génome (Figure 25). Les extrémités 5' et 3' de cet IRES ont été soigneusement déterminés en utilisant les systèmes de rapporteurs bicistroniques. L'IRES s'étend du résidu 40 de la partie 5'UTR au résidu 372 dans l'ORF du génome viral, sachant que l'AUG initiateur se trouve en position 342. L'organisation globale des domaines (II-IV) et plusieurs motifs ARNs structuraux dans ces domaines sont conservés parmi les virus apparentés de la famille des *Flaviviridae*, tels que le virus de la peste porcine classique (CSFV), le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV), et le virus GB-B (GBV-B). Cette organisation de domaines distincts est également retrouvée chez plusieurs membres de la famille des *Picornaviridae*, comme le teschovirus porcine (PTV), le virus de l'encéphalite aviaire (AEV), ou le picornavirus simien (SPV), suggérant un mécanisme d'initiation de la traduction semblable à celui du VHC (Lukavsky, 2009).

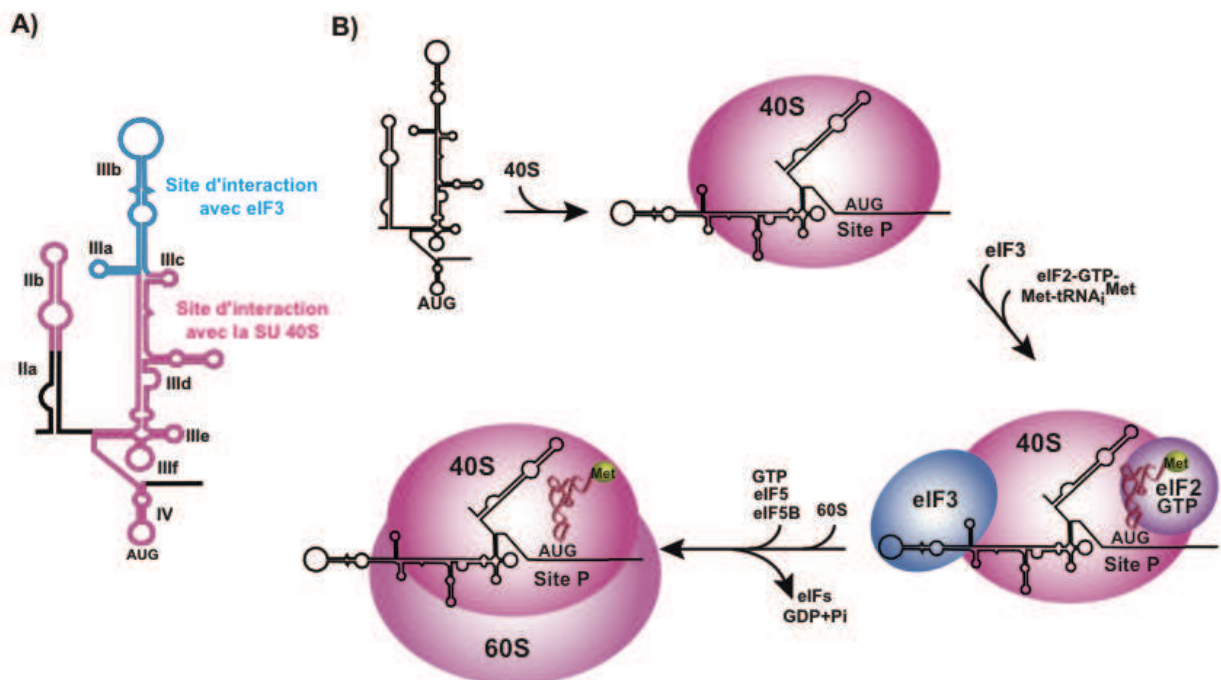


Figure 25. Voie d'initiation de la traduction du VHC.

A) La structure secondaire de l'IRES du VHC avec les différents domaines individuels (II-IV) indiqués. Les sites d'interaction de la SU 40S sont représentés en rose, alors que le site de liaison d'eIF3 est représenté en bleu. **B)** Modèle d'initiation de la traduction IRES-dépendante du VHC. L'IRES du VHC se lie en premier à la SU 40S du ribosome, ensuite recrute eIF3 et le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met} pour former le complexe d'initiation 48S*. La formation ultérieure du complexe 80S dépend de l'hydrolyse du GTP, de eIF5 et eIF5B (Adapté de Lukavsky, 2009).

Le noyau de l'IRES est constitué par la jonction à quatre voies à la base du domaine III, avec les tige-boucles III_d, III_e, III_f et IV formant un double pseudonœud (Fukushi et al., 1994; Niepmann, 2009). Cette région de l'IRES du VHC peut se lier fortement aux SU 40S purifiées en l'absence de tout facteur d'initiation ou autres protéines (Pestova et al., 1998b). L'IRES du VHC s'adapte à la surface de la sous-unité 40S dans une conformation étirée qui s'étend de la tige-boucle II à travers le noyau central jusqu'aux régions les plus apicales de la tige-boucle III (Boehringer et al., 2005; Hashem et al., 2013; Siridechadilok et al., 2005; Spahn et al., 2001).

Le domaine central de l'IRES peut être clivé par l'ARNase P, suggérant une structure en forme d'ARNt (Lyons and Robertson, 2003; Nadal et al., 2002). Lorsque la SU 40S se lie à l'IRES du VHC, ce dernier change de conformation permettant le déroulement de la tige-boucle IV et le positionnement de l'AUG initiateur dans le sillon de liaison de l'ARNm sur la petite SU 40S (Kieft et al., 2001; Spahn et al., 2001). En plus du cœur d'IRES, d'autres structures secondaires d'ARN dans la région codante de la protéine Core pourraient contribuer à l'efficacité de la traduction (Vassilaki et al., 2008).

Fonction des différents domaines de l'IRES du VHC

L'IRES du VHC se lie à la sous-unité 40S du ribosome avec une affinité de l'ordre du nanomolaire ($k_d = 2$ nM). Il établit des interactions directes avec la sous-unité 40S via la partie apicale du domaine II (II_b), la majeure partie du domaine III (excepté III_a et III_b), et le domaine IV (Figure 25). Cependant, ni la délétion du domaine II, ni celle du domaine IV ne semble affecter l'affinité de l'IRES pour la SU 40S (Kieft et al., 2001). Ceci définit les domaines III_c, III_d, III_e et III_f comme étant le corps basal de recrutement de la SU 40S. D'autre part, l'IRES interagit avec eIF3. Cette interaction est importante car elle permet de stabiliser le complexe et de recruter le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} nécessaire à la formation du complexe de pré-initiation 48S* (différent du complexe de pré-initiation 48S canonique) et l'appariement des bases codon-anticodon dans le site P du ribosome (Otto and Puglisi, 2004). La liaison de eIF3 à l'IRES est médiée par le domaine III_{abc} qui forme une jonction à quatre voies au niveau du domaine III. Le domaine isolé III_{abc} a la même affinité que l'ensemble de l'IRES pour eIF3 ($k_d = 35$ nM). En

revanche, cette interaction est environ 15 fois plus faible, par rapport à la SU 40S (Kieft et al., 2001).

Bien que l'assemblage des ribosomes actifs 80S ne soit pas différent de la voie canonique (coiffe-dépendante) et nécessite les mêmes facteurs (eIF5, eIF5B, le GTP et la SU 60S), il implique néanmoins des interactions fonctionnelles de l'IRES avec la SU 40S (Pestova et al., 1998b). Le domaine II qui est ni important pour l'affinité de l'IRES pour la SU 40S, ni au recrutement de eIF3, semble jouer un rôle dans ce processus. En effet, la délétion du domaine II décroît l'activité traductionnelle de l'IRES de cinq fois en bloquant la formation des complexes 80S. La partie apicale du domaine IIb interagirait avec la SU 40S près du site E et promeut l'hydrolyse du eIF2-GTP, la libération d'eIF2 et l'assemblage des deux SU ribosomiques (Fraser et al., 2009; Locker et al., 2007).

2.1.4. Contribution de la région 3'UTR dans la traduction IRES-dépendante

Bien que longtemps controversé (Fang and Moyer, 2000; Imbert et al., 2003; Kong and Sarnow, 2002; Yi and Lemon, 2003), le rôle de la région 3'UTR dans la traduction de l'ARN génomique du VHC est actuellement bien établi (Bai et al., 2013; Bradrick et al., 2006; Bung et al., 2010; Ito et al., 1998; Song et al., 2006). De même que la queue poly(A) stimule la traduction chez les ARNm cellulaires, la région 3'UTR de l'ARN génomique du VHC promeut également la traduction de ce dernier. La région variable, la région poly (U/UC) ainsi que la tige boucle SL1 de la région X contribuent de manière significative à la stimulation de la traduction, en revanche les tiges boucles SL2 et SL3 de la région X semblent être moins importantes (Song et al., 2006). En plus de stimuler la traduction, la tige boucle SL1 est également indispensable à la réplication de l'ARN viral (Friebe and Bartenschlager, 2002; Yi and Lemon, 2003). Ce chevauchement partiel des signaux de stimulation de la traduction et d'initiation de la synthèse du brin négatif, supporte l'idée que des séquences comme la SL1, en association avec des facteurs viraux et/ ou cellulaires pourraient réguler le basculement de la traduction vers la réplication de l'ARN viral (Song et al., 2006).

La région 3'UTR de l'ARN du VHC est une structure unique qui est absente chez d'autres virus à ARN, y compris ceux qui possèdent un IRES du même type que celui du VHC. Elle stimulerait la traduction au niveau de l'étape de la terminaison

en favorisant le recyclage des ribosomes pour des cycles supplémentaires, via une ré-initiation rapide sur le même ARNm (Bradrick et al., 2006). Cela impliquerait une circularisation de l'ARNm *via* des interactions entre ses deux extrémités 5' et 3'UTR. Cette interaction pourrait être médiée par des protéines telles que le complexe hétérotrimérique NFAR (Isken et al., 2007) ou IMP-1 (Weinlich et al., 2009) qui se lient à la fois aux deux extrémités 5' et 3' UTR du VHC.

Curieusement, il a été rapporté que la région 3'UTR du VHC est capable de stimuler la traduction de divers ARNm indépendamment de l'identité de leur région 5'UTR. Ainsi, il a été montré que le 3'UTR du VHC était capable de stimuler la traduction IRES-dépendante d'autres virus comme le PTV (possédant un IRES de type III) ou le EMCV (possédant un IRES type II) ou encore de stimuler la traduction cap-dépendante d'ARNm cellulaires à des niveaux comparables à la traduction IRES-dépendante du VHC (Bung et al., 2010). De plus, il a été montré qu'une queue poly(A) d'une longueur suffisante (50 résidus) pouvait remplacer totalement l'effet stimulateur de la région 3'UTR sur la traduction IRES-dépendante du VHC (Bradrick et al., 2006; Bung et al., 2010). L'ensemble de ces données indique que l'effet stimulateur de la région 3'UTR de l'ARN du VHC n'est pas spécifique de la traduction IRES-dépendante et que des interactions structurales spécifiques entre les extrémités 3' et 5'UTR ne sont pas forcément nécessaires.

Une étude plus récente a montré que le 3'UTR du VHC se lie directement à la SU 40S à une région très voisine du site de liaison de l'IRES, formant une boucle fermée. Ainsi, le 3'UTR retiendrait les complexes ribosomiques pendant la terminaison de la traduction pour permettre une initiation rapide et efficace des cycles de traduction suivants (Bai et al., 2013). Cette synergie de bout-à-bout permettrait de garantir que seuls les ARNs génomiques complets, non dégradés seront traduits de manière efficace.

2.1.5. Utilisation de facteurs d'initiation alternatifs

Chez les eucaryotes, le facteur d'initiation de la traduction eIF2, qui est composé de trois sous-unités α , β et γ , apporte le Met-tRNA_i^{Met} au ribosome, sous la forme d'un complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met}. Lors de conditions de stress cellulaire ou d'une infection virale, l'initiation de la traduction est globalement réprimée par le biais de la phosphorylation de eIF2 α . Cependant, certains ARNm, en

particulier ceux qui doivent supporter des conditions de stress et/ ou sont nécessaires pour surmonter les états de stress, sont traduits de façon continue dans ces conditions. Ceci suggère que la livraison du Met-tRNA_i^{Met} au ribosome n'est pas la seule responsabilité de eIF2 (Kim et al., 2011a). Parmi ces ARNs on retrouve celui du VHC. En effet, plusieurs études ont montré que la traduction de l'ARN du VHC n'est pas affectée par la phosphorylation de eIF2 (Dmitriev et al., 2010; Kim et al., 2011a; Robert et al., 2006; Terenin et al., 2008). Trois modèles ont été proposés : i) Le premier suggère que le facteur d'initiation eIF5B pourrait se substituer à eIF2 pour promouvoir la liaison du Met-tRNA_i^{Met} dans le site P du ribosome, sans qu'il y ait hydrolyse du GTP. Cette voie alternative requiert uniquement eIF3 et eIF5B comme facteurs d'initiation conduisant à la formation de complexes 80S compétents pour la traduction (Terenin et al., 2008). Une voie similaire a également été signalée pour l'IRES du CSFV (Pestova et al., 2008). Cependant, on ne sait pas comment eIF5B, qui ne forme pas de complexe stable avec Met-tRNA_i^{Met}, pourrait délivrer ce dernier au niveau du site P du ribosome. ii) Le deuxième modèle fait référence à eIF2D, une protéine de 65 kDa qui est capable de lier aussi bien le Met-tRNA_i^{Met} que les ARNt élongateurs. Elle serait également capable de remplacer eIF2 pour délivrer l'ARNt initiateur dans le site P du ribosome de manière GTP-indépendante (Dmitriev et al., 2010). iii) Le troisième modèle décrit eIF2A, une protéine de 65 kDa, comme étant capable de se lier au domaine III_d de l'IRES du VHC et de promouvoir sa traduction en conditions de stress cellulaire. Contrairement, aux deux rapports précédents, cette étude est la seule qui montre un effet physiologique de eIF2A sur la traduction de l'ARN du VHC en utilisant un système d'infection en culture cellulaire (HCVcc). De plus, les auteurs n'excluent pas totalement le rôle de eIF5B dans ce mécanisme et proposent un modèle selon lequel eIF2A et eIF5B agiraient de concert pour promouvoir la traduction du VHC en conditions de stress (Kim et al., 2011a).

2.1.6. Contribution des facteurs non-canoniques (ITAFs) dans la traduction IRES-dépendante

Bien que l'IRES du VHC soit capable de se lier à la sous-unité ribosomique 40S indépendamment de tout facteurs d'initiation ou autre protéine *in vitro* (Pestova et al., 1998b), il a néanmoins besoin un certains nombre de facteurs non-canoniques, appelées ITAFs, pour améliorer son activité traductionnelle au delà du

niveau basal. Parmi ces ITAFs ont retrouvés les protéines La, NSAP1, hnRNP L et D, IMP-1, Gemin5, LSm1-7 et PCBP2 (Figure 26).

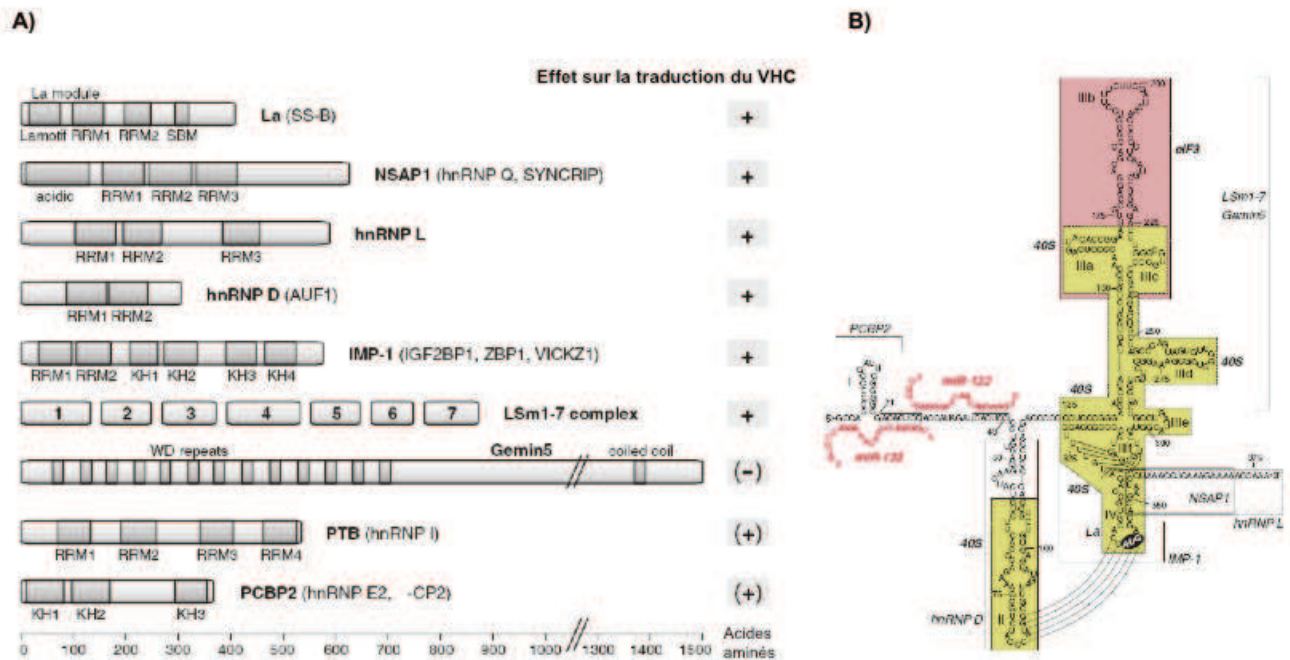


Figure 26. Facteurs non-canoniques modulant la traduction du VHC.

A) Représentation schématique des différents ITAFs avec leurs motifs ou domaines de liaison à l'ARN qui sont représentés en gris foncé : Le domaine *La motif*, RRM (*RNA recognition motif*), SBM (*short basic motif*), KH (*hnRNP K homology domain*). La participation de chaque protéine dans la modulation de l'efficacité de la traduction IRES du VHC est indiquée sur la droite (+ stimulation ou - inhibition). Les interactions indirectes ou nécessitant une validation supplémentaire sont indiquées entre parenthèses. **B)** Les régions impliquées dans la liaison de la SU 40S sont indiquées en jaune. La région apicale de la tige-boucle III qui lie eIF3 est représentée en rouge. Les régions de l'IRES impliquées dans la liaison à d'autres protéines sont indiquées. Les interactions possibles entre les boucles apicales de la tige-boucle II et IV sont indiquées. Les deux séquences consensus ciblées par le miR-122 dans la région 5'UTR sont encadrées. Le miR-122 est affiché en rouge (Adapté de Niepmann, 2013).

Ces ITAFs ont pour caractéristique commune de posséder plusieurs domaines ou motifs de liaison à l'ARN. Certaines d'entre elles, tels que la protéine La ou PCBP2 oligomérisent (Bedard et al., 2004; Craig et al., 1997) et sont donc susceptibles d'interagir avec différents sites de l'ARN viral et d'agir comme « chaperones » pour stabiliser la structure tertiaire de l'IRES. Le domaine le plus fréquemment retrouvé dans les ITAFs est le RRM (*RNA recognition motif*), un domaine globulaire qui fournit une plateforme pour la liaison de l'ARN sur un plateau de feuillet β bordés par des hélices α (Kenan et al., 1991; Nagai et al., 1995). Ce dernier est retrouvé chez la protéine La, NSAP1, hnRNP L, hnRNP D, PTB et IMP-1. Un autre type de domaine

également important est le « *KH domain* » (Makeyev and Liebhaber, 2002) qui est présent chez les protéines IMP-1 et PCBP2. Cependant d'autres protéines possèdent des domaines particuliers de liaison à l'ARN, comme par exemple la protéine La avec son domaine « *La motif* » (Figure 26A) (Martino et al., 2012).

Beaucoup de ces ITAFs peuvent interagir les uns avec les autres. LSM1-7 interagit avec la protéine La (Maraia and Lamichhane, 2011). Le complexe SMN qui renferme Gemin5 interagit avec NSAP1 (Mourelatos et al., 2001). hnRNP D interagit avec hnRNP L (Park et al., 2007), NSAP1 et IMP-1 (Moraes et al., 2003). hnRNP L interagit avec PTB (Hahm et al., 1998a). Alors que NSAP1 interagit directement avec la SU 40S purifiée (Park et al., 2011). De plus, PCBP2 et PTB semblent interagir avec la protéine La (Fontanes et al., 2009). A travers ces interactions, les ITAFs pourraient créer des pontages entre différentes régions du 5'UTR et par conséquent favoriser un repliement de l'ARN qui faciliterait sa traduction.

a. La protéine La

La protéine La, également connue sous le nom de SSB, a initialement été identifiée comme cible antigénique reconnue par des anticorps de patients atteints de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux et le syndrome de Sjögren (Chan and Tan, 1989). Cette protéine de 52 kDa est essentiellement impliquée dans divers aspects du métabolisme des ARNs ; elle joue un rôle dans la maturation des précurseurs d'ARNt eucaryotes en se liant aux extrémités poly(U) des transcrits ARN de la Polymérase III et par conséquent les protège contre la dégradation par les exonucléases (Maraia and Lamichhane, 2011). Son rôle dans la traduction IRES-dépendante a été décrit pour la première fois chez le poliovirus (Meerovitch et al., 1989), puis chez le VHC (Ali and Siddiqui, 1997) et maintenant chez un certains nombre d'IRES cellulaires (Buchkovich et al., 2010; Petz et al., 2012; Zhang et al., 2012b). La protéine La stimule la traduction du VHC en se liant à une région proche de l'AUG initiateur comprenant le pseudo-noeud et la tige-boucle IV de l'IRES (Figure 26B) (Costa-Mattioli et al., 2004). Cette liaison nécessite l'action combinée du *La domain*, du RRM 1 et du RRM 2, alors que la liaison de la protéine La à l'extrémité 3' du précurseur des ARNts requiert le *La domain* et le RRM 1 uniquement (Martino et al., 2012). Cependant, les détails moléculaires permettant la stimulation de la traduction du VHC par cette protéine restent à déterminer.

b. NSAP1

NSAP1 (mice minute virus NS1-associated protein 1), également connue sous le nom de SYNCRIP ou hnRNP Q, a plusieurs fonctions dans le métabolisme de l'ARN, y compris dans la régulation de l'épissage (Chen et al., 2008) et de la traduction (Lee et al., 2012). NSAP1 stimule la traduction du VHC en se liant à l'IRES près du codon AUG initiateur (Figure 26B) (Kim et al., 2004). De plus NSAP1 interagit directement avec la SU 40S du ribosome et promeut son positionnement correct sur le codon AUG initiateur et faciliterait la formation du complexe 80S (Park et al., 2011).

c. hnRNP L et hnRNP D

hnRNP L est une protéine qui joue un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif des ARNm. Elle se lie à des séquences riches en C/A au niveau des introns ou des exons et fonctionne comme activateur ou répresseur de l'usage des exons (Hung et al., 2008). hnRNP L interagit avec des séquences riches en ACA(C/U) à l'extrémité 3' de l'IRES du VHC à environ 30 nucléotides en aval de l'AUG initiateur et stimule sa traduction (Figure 26B) (Hahm et al., 1998b; Hwang et al., 2009).

hnRNP D, également connue sous le nom de AUF1, est une protéine qui est impliquée dans la dégradation de plusieurs ARNm qui possèdent des séquences riches en AU dans leur partie 3'UTR. L'association de hnRNP D avec ces ARNm permet de recruter d'autres facteurs et promeut une dégradation rapide de l'ARNm (Gratacós and Brewer, 2010). hnRNP D stimule la traduction du VHC en se liant à la tige boucle II de l'IRES (Figure 26B) (Paek et al., 2008).

d. IMP-1

IMP-1 ou IGF2BP1 (Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1) fait partie d'une grande famille de protéines qui se lient aux ARNm et influence leur localisation, leur recyclage et leur traduction (Wächter et al., 2013). Il a été rapporté que cette protéine améliore spécifiquement la traduction IRES-dépendante du VHC. Elle se lie à la fois à la partie 5'UTR (tige-boucle IV de l'IRES et environ 30 nts de la partie codante) (Figure 26B) et à la partie 3'UTR (Région variable et poly U/C tract) du génome viral. Une fois liée à l'ARN cette protéine est capable de dimériser, ce qui

permettrait la circularisation de l'ARN et un recyclage plus facile des ribosomes (Weinlich et al., 2009).

e. Gemin5 et LSm1-7

L'IRES du VHC interagit également avec Gemin5 et LSm1-7. Gemin5 joue un rôle critique dans la biogenèse des complexes ribonucléoprotéiques de l'épissage (snRNP pour *Small nuclear ribonucleoprotein*). Elle fait partie du complexe protéique SMN (*Survival of Motor Neurons*) qui se lie à des séquences spécifiques dans les snRNAs (*Small nuclear ribonucleic acids*) et contrôle le recrutement des protéines « Sm » pendant l'assemblage des snRNP (Battle et al., 2006). Les protéines apparentées LSm (*Like Sm*) forment aussi des anneaux heptamériques qui se lient à l'ARN. Le complexe cytoplasmique LSm1-7 se lie à l'extrémité 3' des ARNms et est impliqué dans leur dégradation (Khusial et al., 2005).

De manière intéressante, LSm1-7 et Gemin5 ont un effet inverse sur la régulation de la traduction du VHC. Alors que LSm1-7 est requise pour une traduction efficace en se liant à la tige-boucle III de l'IRES (Figure 26B) et à la partie poly U/C de la région 3'UTR de l'ARN viral (Scheller et al., 2009). Gemin5, quant à elle, régule négativement la traduction du VHC en se liant à la tige boucle III de l'IRES (Pacheco et al., 2009). Etant donné que le complexe SMN (qui contient Gemin5) interagit avec les protéines Sm et les protéines LSm, il se pourrait que Gemin5 exerce son effet négatif sur la traduction du VHC en contrôlant l'accès du complexe LSm1-7 à l'ARN viral.

f. PTB

PTB (*Polypyrimidine tract-binding protein*), également appelée hnRNP I, est une protéine impliquée dans la régulation du métabolisme des ARNs cellulaires notamment dans l'épissage alternatif (Kafasla et al., 2012). La contribution de PTB dans la stimulation de la traduction IRES-dépendante d'ARN viraux et cellulaires a largement été documentée (Romanelli et al., 2013). Etant donné que PTB se lie à l'IRES en 5'UTR (Ali and Siddiqui, 1995) et à la région X dans le 3'UTR de l'ARN du VHC (Ito and Lai, 1999), et que cette protéine soit capable de multimériser, on a émit l'hypothèse qu'elle pouvait stimuler la traduction du VHC en permettant la circularisation de l'ARN viral. Cependant, son rôle dans la traduction du VHC est

controversé. Alors que certaines études ont montré un effet positif (Anwar et al., 2000; Fontanes et al., 2009; Gosert et al., 2000), ou au contraire un effet négatif (Tischendorf et al., 2004). D'autres études n'ont observé aucun effet de cette protéine sur la traduction IRES-dépendante du VHC (Brocard et al., 2007; Nishimura et al., 2008; Rosenfeld and Racaniello, 2005).

2.1.7. Rôle du miR-122

Contrairement aux ITAFs, qui sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules de l'hôte, le miR-122 est exclusivement exprimé dans les hépatocytes où il représente environ 70% des micro-ARNs (miRs) totaux (Jopling, 2012). Le miR-122 joue un rôle important dans la propagation du VHC et pourrait donc contribuer, en plus des récepteurs cellulaires de surface, à son hépatotropisme (Conrad and Niepmann, 2013; Jopling et al., 2005).

Les miRs constituent une grande famille d'ARNs non-codants qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel chez les animaux, les plantes et les protozoaires. Chez les mammifères, les miRs contrôleraient l'activité de plus de 60% des gènes codants pour des protéines. La maturation des précurseurs de miRs donne naissance à un duplexe d'ARN d'environ 22 paires de bases (pb) avec des extrémités 3' sortantes. Ce duplexe est alors déroulé, et l'un des brins, appelé « brin passager » est dégradé, alors que le second brin, appelé « brin guide » est incorporé dans un complexe ribonucléoprotéique, appelé miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), et le dirige vers l'ARNm cible. La spécificité de l'interaction entre le miRISC et son ARNm cible est conférée par le miR mature (brin guide). En effet, la région « *seed* » qui correspond aux nucléotides 2 à 8 de la partie 5'UTR du miR, s'hybride parfaitement avec la séquence cible en 3'UTR de l'ARNm. Cependant, d'autres régions du miR peuvent également s'hybrider, mais cette hybridation est habituellement interrompue par des mésappariements.

Généralement, les miRs inhibent la synthèse protéique en bloquant la traduction et/ ou en induisant la dégradation de l'ARNm cible. Cependant, il semblerait que certains miRs aient un rôle inverse et stimulent la traduction (Fabian et al., 2010). C'est le cas par exemple du miR-122 qui promeut la propagation du VHC.

L'étude initiale qui a rapporté le rôle du miR-122 dans l'accumulation de l'ARN génomique du VHC a suggéré un rôle au niveau de l'étape de la réplication virale (Jopling et al., 2005). Cependant, des études plus récentes ont montré que le miR-122 intervient au niveau de l'étape de la traduction, sans pour autant exclure un rôle potentiel dans la réplication (Henke et al., 2008; Jangra et al., 2010; Roberts et al., 2011). La stimulation de la traduction est conférée par la liaison du miR-122 sur deux séquences cibles complémentaires à sa région *seed* qui se trouvent entre les tiges boucles I et II dans la région 5'UTR de l'ARN génomique du VHC (Figure 26B) (Henke et al., 2008). Le miR-122 se lie également à deux sites supplémentaires de l'ARN viral localisés au niveau de la région codante de NS5B (Nasheri et al., 2011), et de la région variable dans la partie 3'UTR, respectivement. Cependant, aucun de ces sites ne semble être important pour la traduction du VHC (Henke et al., 2008).

La fonction du miR-122 est indissociable du complexe miRISC, y compris pour promouvoir la traduction de l'ARN du VHC. Par exemple l'inhibition d'Ago2, qui est un composant essentiel du complexe miRISC diminue l'efficacité de la traduction du VHC dans les cellules exprimant le miR-122 (Roberts et al., 2011; Wilson et al., 2011). De plus, il a été montré que Ago2 fait partie du complexe ribonucléoprotéique qui se lie physiquement au 5'UTR de l'ARN du VHC par l'intermédiaire du miR-122. En effet, l'immunoprécipitation d'Ago2 à l'aide d'un anticorps spécifique permet d'isoler l'ARN génomique du VHC dans des cellules qui expriment le miR-122, mais pas dans les cellules qui expriment un mutant du miR-122, supportant l'idée qu'Ago2 contribue à la stimulation de la traduction du VHC en se liant au 5'UTR de l'ARN viral *via* le miR-122 (Shimakami et al., 2012). En plus d'Ago2, d'autres composants du complexe miRISC tels que TRBP ou GW182 seraient également importants pour la stimulation de la traduction du VHC induite par le miR-122 (Roberts et al., 2011; Zhang et al., 2012a).

Bien que le rôle du miR-122 dans la traduction du VHC soit bien établi, les détails moléculaires de son mécanisme d'action ne sont pas encore bien compris. Il a été proposé que le miR-122 stimule la traduction du VHC à un stade précoce de l'initiation de la traduction, en améliorant l'association des ribosomes à l'ARN viral (Henke et al., 2008). La liaison du miR-122 pourrait provoquer des changements tertiaires de la structure de l'IRES qui pourraient moduler l'initiation de la traduction d'une manière encore inconnue, peut-être en induisant des changements dans la conformation de la SU 40S (Conrad and Niepmann, 2013). Selon une étude de

traduction *in vitro*, effectuée avec des lysats de réticulocytes de lapin, le miR-122 stimulerait la traduction de l'ARN viral en déplaçant tout simplement une interaction ARN-ARN de longue portée, inhibitrice pour la traduction. L'interaction en question a lieu entre une séquence d'ARN située dans la région codante de la protéine Core (nts 428-442) et une séquence qui chevauche partiellement les sites de liaison du miR-122 en 5'UTR (nts 24-38). Il a été montré dans cette étude que le miR-122 mature sous forme simple brin, induit un changement de conformation de l'ARN en 5'UTR de la forme « fermée » vers la forme « ouverte », favorisant ainsi la traduction de l'ARN viral (Díaz-Toledano et al., 2009). En revanche, dans les cellules, cette interaction joue un rôle négligeable et le miR-122 sous forme simple brin est incapable de stimuler la traduction du VHC (Goergen and Niepmann, 2012).

La stimulation de la traduction ne peut pas expliquer à elle seule, l'effet du miR-122 sur l'ensemble du cycle viral du VHC. En effet, des mutations dans les sites de liaison du miR-122 dans la région 5'UTR ont un effet, beaucoup plus prononcé sur le rendement global de l'infection par le VHC, en comparaison à des mutations dans la tige-boucle IIIId de l'IRES qui affectent uniquement la traduction. Cela suggère qu'en plus de son impact sur la traduction, le miR-122 intervient à d'autres étapes du cycle viral tel que la réplication (Jangra et al., 2010).

Il semblerait que la liaison du miR-122 à l'ARN du VHC permet tout simplement de le stabiliser. En effet, la formation de complexes ribonucléoprotéiques à l'extrémité 5' de l'ARN viral, le protégerait contre la dégradation (Machlin et al., 2011; Shimakami et al., 2012). En accord avec cette hypothèse, une autre étude a montré que l'ARN viral dans les cellules infectées est principalement dégradé à partir de l'extrémité 5' par l'exonucléase 5'-3' Xrn1 et que cette dégradation est diminuée en présence du miR-122 (Li et al., 2013). Ainsi l'effet positif du miR-122 observé sur la traduction est indirect et serait dû à la stabilisation de l'ARN viral et son maintien pour servir de matrice à la traduction, mais aussi pour la réplication. De plus, le miR-122 pourrait indirectement stimuler la propagation du VHC en régulant le métabolisme des lipides. En effet, ce micro-ARN promeut la synthèse du cholestérol et des acides gras dans les hépatocytes (Esau et al., 2006; Krützfeldt et al., 2005), permettant de créer un environnement lipidique riche, favorable aux étapes de la réplication et/ ou de l'assemblage du virus.

3. La maturation de la polyprotéine

La traduction IRES-dépendante de l'ORF du génome du VHC, donne naissance à une polyprotéine qui est co- et post-traductionnellement clivée par des protéases cellulaires et virales en protéines structurales et non structurales matures (Figure 9). Alors que les protéines structurales Core, E1, E2 et le polypeptide p7 sont clivées par la signal peptidase (SP) et la peptide signal peptidase (PSP) cellulaires, les protéines non structurales sont coupées par les protéases virales NS2 et NS3/4A (Figure 9).

Les protéines non structurales sont clivées dans un ordre préférentiel (Pietschmann et al., 2001). Le premier clivage est un événement auto-catalytique assuré par la protéase NS2/3 qui coupe au niveau de la jonction NS2/NS3. Le clivage à la jonction NS3/NS4A permet de libérer NS3 du reste de la polyprotéine. NS3 en association avec son cofacteur NS4A (NS3-4A) va assurer les événements de maturation ultérieurs en coupant en *trans* au niveau du site NS5A/NS5B pour produire un intermédiaire NS4A-5A, suivi d'un clivage entre NS4A et NS4B, pour produire un précurseur de la protéine NS4B-5A relativement stable, et par la suite entre NS4B et NS5A. Cette cinétique semble être importante, et certains précurseurs pourraient avoir des fonctions temporaires (Herod et al., 2012).

4. La réplication de l'ARN viral

Après la maturation de la polyprotéine, les protéines virales se trouvent plus ou moins associées à la surface de la membrane du RE où elles peuvent exercer leurs fonctions. Ainsi les protéines non-structurales (de NS3 à NS5B, et plus particulièrement NS4B) vont induire des altérations membranaires, qui vont accueillir les sites de réplication de l'ARN viral (Gosert et al., 2003; Miller and Krijnse-Locker, 2008). L'unité génétique minimale nécessaire et suffisante pour la réplication de l'ARN englobe le 3'UTR et une partie de la région codante allant de NS3 à NS5B (Lohmann et al., 1999). La première étape de la synthèse d'ARN génère un ARN simple brin de polarité négative (ARN (-)), qui sert de matrice pour la synthèse d'ARN simple brin positif (ARN (+)) qui est produit en excès. Il est généralement admis que la synthèse de l'ARN (-) est initiée à l'extrémité 3' du brin matrice par une initiation *de novo* de la synthèse de l'ARN et que la réplication de l'ARN implique la formation d'une forme intermédiaire, un ARN double brin. L'ARN (+) nouvellement synthétisé est soit ré-engagé dans un nouveau cycle de traduction/ réplication ou est encapsidé dans les nouveaux virions (Lohmann, 2013).

En culture cellulaire, la dynamique de la synthèse de l'ARN du JFH-1 (génotype 2a) a été caractérisée. L'ARN (-) n'apparaît que 4 à 6h après l'infection ou la transfection de l'ARN viral dans les cellules. Cette phase de latence pourrait représenter le temps nécessaire à la traduction, la maturation de la polyprotéine et l'établissement des compartiments membranaires spécifiques pour la réplication. Quelques heures plus tard, la synthèse asymétrique de l'ARN est établie, atteignant rapidement les proportions de 10:1 avec l'ARN (+) en excès. Le plateau de synthèse de l'ARN est atteint à 24-48h, en raison de facteurs limitants de l'hôte impliqués dans la synthèse de l'ARN (Lohmann, 2013).

La réplication du VHC se produit dans des vésicules présentes au niveau du MW. Les complexes de réplication seraient initialement formés dans des invaginations de la membrane du RE, reliées au cytoplasme par un pore étroit permettant l'échange de petites molécules tels que les nucléotides pour la synthèse de l'ARN (Figure 27A). Ces invaginations donneraient naissance à des vésicules plus complexes constituées de deux voir plusieurs membranes superposées (Figure 27B) (Ferraris et al., 2010; Reiss et al., 2011), qui serviraient de compartiment de

stockage afin de masquer les intermédiaires de réplication de la réponse immunitaire innée. Il a été observé que l'abondance de ces vésicules est en corrélation directe avec la réplication de l'ARN viral (Romero-Brey et al., 2012).

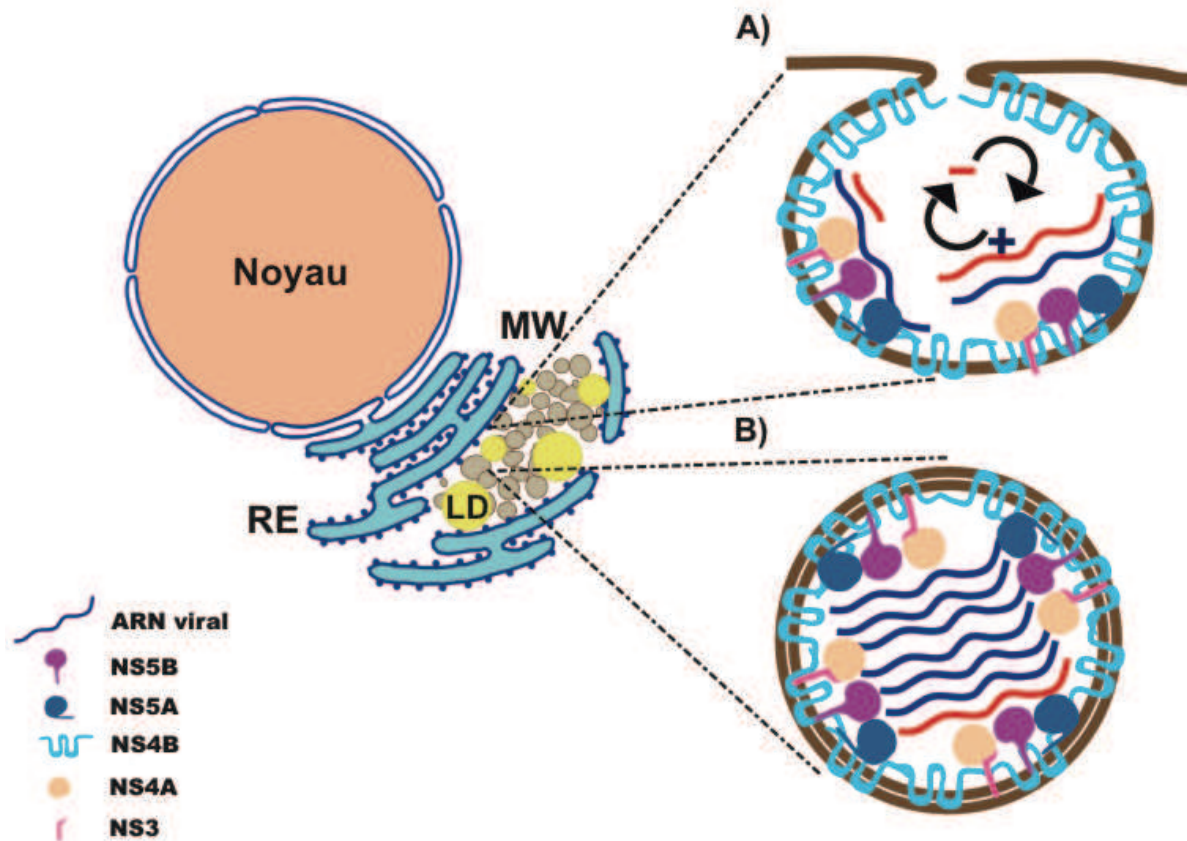


Figure 27. Représentation schématique de la réplication du VHC.

Deux structures vésiculaires différentes hébergeant les complexes de réplication ont été observées au niveau du MW. **A)** Les protéines non structurales induisent la formation d'invaginations au niveau de la membrane du RE reliées au milieu extérieur par un pore étroit permettant l'échange de petites molécules telles que les nucléotides pour la synthèse de l'ARN. **B)** Ces invaginations donnent naissance à des vésicules plus complexes constituées de deux, voir plusieurs, membranes superposées qui serviraient de compartiment de stockage. Gouttelette lipidique (LD, *lipid droplet*), MW (*Membranous web*), Réticulum endoplasmique (RE) (Adapté de Lohmann, 2013).

NS4B a été identifiée comme le principal moteur de la biogenèse du MW, car l'expression de cette protéine seule suffit à induire des altérations membranaires et la formation de vésicules (Egger et al., 2002). L'oligomérisation de NS4B est essentielle pour sa fonction, et lui permettrait de structurer les vésicules membranaires formées (Gouttenoire et al., 2010; Yu et al., 2006). Cependant, il a été montré que d'autres protéines non-structurales telles que NS3-4A, NS5A et NS5B

peuvent également induire des réarrangements membranaires (Romero-Brey et al., 2012), indiquant que la morphogénèse du MW est complexe et requiert une action concertée de plusieurs protéines non structurales. De plus, certaines protéines de l'hôte peuvent également participer à la formation du MW. Comme, par exemple, la protéine Kinase PI4KIII α , qui est activée suite à son interaction avec NS5A et induit la formation de phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) qui rentre dans la composition des membranes du MW (Berger et al., 2011b; Reiss et al., 2011).

Les éléments génomiques régulant la réplication virale en *Cis* sont majoritairement, mais pas exclusivement, localisés dans les régions 3'UTR et 5'UTR. Alors que les séquences présentes en 3'UTR contrôlent la synthèse du brin négatif, les séquences en 5'UTR sont impliquées dans la production du brin d'ARN positif (Binder et al., 2007). La structure du 5'UTR du brin d'ARN (+) diffère largement de celle de l'extrémité 3' du brin d'ARN (-) complémentaire traduisant leurs différentes fonctions dans la traduction et la réplication de l'ARN viral, respectivement (Honda et al., 1996; Schuster et al., 2002). Une autre séquence agissant en *cis* est retrouvée dans la région codante de NS5B. Il s'agit de la tige boucle SL3.2 qui fait partie d'une structure secondaire plus complexe de type cruciforme (You et al., 2004). L'interaction de SL3.2 avec la tige boucle SL2 de la région X du 3'UTR semble être essentielle pour la réplication de l'ARN viral (Friebe et al., 2005).

Bien que la polymérase virale NS5B soit capable, à elle seule, d'initier et de copier un ARN viral entier *in vitro* (Oh et al., 1999). *In vivo*, elle a besoin de s'associer à d'autres protéines virales, notamment les protéines non-structurales, pour former un complexe de réplication fonctionnel (Binder et al., 2007).

Grace à son activité NTPase/ hélicase, la protéine NS3 pourrait être impliquée dans l'initiation de la synthèse d'ARN en déroulant les structures secondaires présentes à l'extrémité 3'UTR. De plus, elle pourrait soutenir NS5B dans la phase d'élongation en déroulant les intermédiaires de réplication double-brins (Lohmann, 2013).

NS4A peut également influencer la réplication en régulant à la fois la fonction hélicase de NS3 et l'état de phosphorylation de NS5A, en favorisant son interaction avec la caséine kinase I α , ce qui détermine dans une large mesure l'issue de la réplication (Lindenbach et al., 2007).

En plus de son rôle précédemment discuté dans l'organisation du MW, NS4B pourrait aussi avoir un rôle plus distinct dans la synthèse de l'ARN grâce à son activité NTPase et à sa capacité à lier l'ARN viral (Einav et al., 2004). De plus, *via*

son interaction avec NS3 (Paredes and Blight, 2008), NS4B pourrait réguler la réplication de l'ARN au-delà de la morphogénèse des sites de réplication.

La participation de NS5A dans la réplication virale est bien connue et son appartenance au complexe de réplication ne fait pas de doute. En effet, NS5A interagit avec NS5B et régule sa fonction *in vitro* (Shirota et al., 2002) et *in vivo* (Shimakami et al., 2004). De plus, cette protéine peut lier directement l'ARN *via* son domaine DI (Huang et al., 2005).

NS5A interagit également avec une pléthore de protéines cellulaires de l'hôte, qui peuvent être directement ou indirectement impliquées dans la synthèse de l'ARN. Parmi ces protéines, on retrouve la PI4KIII α , citée précédemment. Même si cette protéine stimule indirectement la réplication en participant à la formation du MW (Berger et al., 2011b; Reiss et al., 2011).

La protéine hVAP-A (*human VAMP-associated protein A*) et son isoforme hVAP-B ont été identifiées comme interagissant avec NS5A et NS5B et semblent jouer un rôle important dans la réplication génomique du VHC (Gao et al., 2004; Hamamoto et al., 2005). hVAP-A aurait un rôle direct dans la régulation de la synthèse de l'ARN viral en interagissant avec la forme hypophosphorylée, mais pas avec la forme hyperphosphorylée, de NS5A (Evans et al., 2004).

Les cyclophilines sont des peptidyl-prolyl cis/ trans isomérases qui jouent un rôle essentiel dans la réplication du VHC. Bien que, la cyclophiline B (CypB) ait été initialement identifiée comme interagissant et régulant la fonction de NS5B (Watashi et al., 2005). Des résultats plus récents indiquent un rôle plus important pour la CypA (Kaul et al., 2009; Liu et al., 2009). En effet il a été montré que CypA convertit des résidus proline des domaines II et III de NS5A, induisant des changements conformationnels, probablement importants pour sa fonction (Coelmont et al., 2010; Verdegem et al., 2011).

Un autre facteur cellulaire également important pour la réplication du VHC, c'est le miR-122. En effet, ce micro-ARN spécifiquement exprimé dans le foie régule l'abondance de l'ARN viral en culture cellulaire (Jopling et al., 2005) et *in vivo* (Lanford et al., 2010) et pourrait contribuer de manière significative au tropisme hépatique du VHC. En plus de stimuler la traduction de l'ARN viral, le miR-122 jouerait également un rôle important dans la réplication. Le miR-122 se lie à deux séquences cibles dans la partie 5'UTR, formant un complexe non conventionnel,

englobant l'extrémité 5' du génome viral, empêchant ainsi sa dégradation par les RNases et/ ou l'induction de réponses immunitaires innées ([Machlin et al., 2011](#)).

5. L'assemblage et la sécrétion des particules virales

L'assemblage de particules du VHC est un processus complexe dont on ne connaît pas encore tous les détails. Néanmoins, il est généralement admis que les particules du VHC se forment autour des LDs et bourgeonnent dans le RE où elles vont coopter la voie d'export des VLDLs pour être exportées.

5.1. L'assemblage des particules virales

L'assemblage a lieu dans des sites particuliers à l'interface entre la membrane du RE et des LDs et doit impliquer l'action coordonnée de plusieurs protéines virales et cellulaires.

Les LDs sont des organelles de stockage des lipides cellulaires. Ils contiennent un noyau hydrophobe constitué de lipides neutres et d'esters de cholestérol, entourés par une monocouche de phospholipides dérivée du feuillet externe de la membrane du RE. Grâce à son domaine DII, la protéine virale Core est capable de s'associer aux LDs (Boulant et al., 2006). Cette localisation est importante, puisqu'il a été montré que des mutations dans le DII, qui abolissent l'interaction de Core avec les LDs, bloquent la production de particules virales (Boulant et al., 2007; Miyanari et al., 2007). L'adressage de Core au niveau des LDs nécessite l'action de deux enzymes cellulaires ; la phospholipase cytosolique A2 (PLA2G4A) (Menzel et al., 2012) et la diacylglycerol acetyltransférase 1 (DGAT1) (Herker et al., 2010). Cette localisation au niveau des LDs pourrait servir à séquestrer Core loin des sites de réplication pour éviter une encapsidation précoce de l'ARN viral (Lindenbach, 2013). L'assemblage de particules virales nécessite également le recrutement de NS5A au niveau des LDs où elle interagit avec la protéine Core (Appel et al., 2008; Miyanari et al., 2007). Cette interaction est essentielle pour l'assemblage des particules virales, et se fait grâce à des déterminants présents dans le domaine III de NS5A (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Plus précisément, l'assemblage du virus nécessite une phosphorylation d'un résidu serine à l'intérieur de domaine III par la caséine kinase II α (Tellinghuisen et al., 2008). Ainsi grâce à son domaine de liaison à l'ARN, le domaine DI, NS5A pourrait tout simplement acheminer l'ARN (+) depuis les sites de réplication vers les

LDs où il sera transféré sur la protéine Core et, par conséquent, enclencher le processus d'assemblage (Figure 28). De plus, NS5A serait impliquée dans des interactions avec le complexe p7-NS2 qui joue un rôle central dans les premières étapes de l'assemblage (Jirasko et al., 2010; Popescu et al., 2011). En effet, il a été rapporté que p7-NS2 pouvait orchestrer la formation de particules virales en participant à de multiples interactions protéine-protéine notamment avec le complexe enzymatique NS3-4A et l'hétérodimère E1-E2 retenu au niveau de la membrane du RE (Ma et al., 2011; Phan et al., 2009). L'interaction de NS2 avec NS3-4 semble nécessaire pour recruter la protéine Core depuis les LDs vers les sites d'assemblage du virus au niveau du RE (Boson et al., 2011; Counihan et al., 2011). La formation de la nucléocapside et son bourgeonnement dans la lumière du RE seraient associés à la voie de synthèse des VLDLs (Lindenbach, 2013).

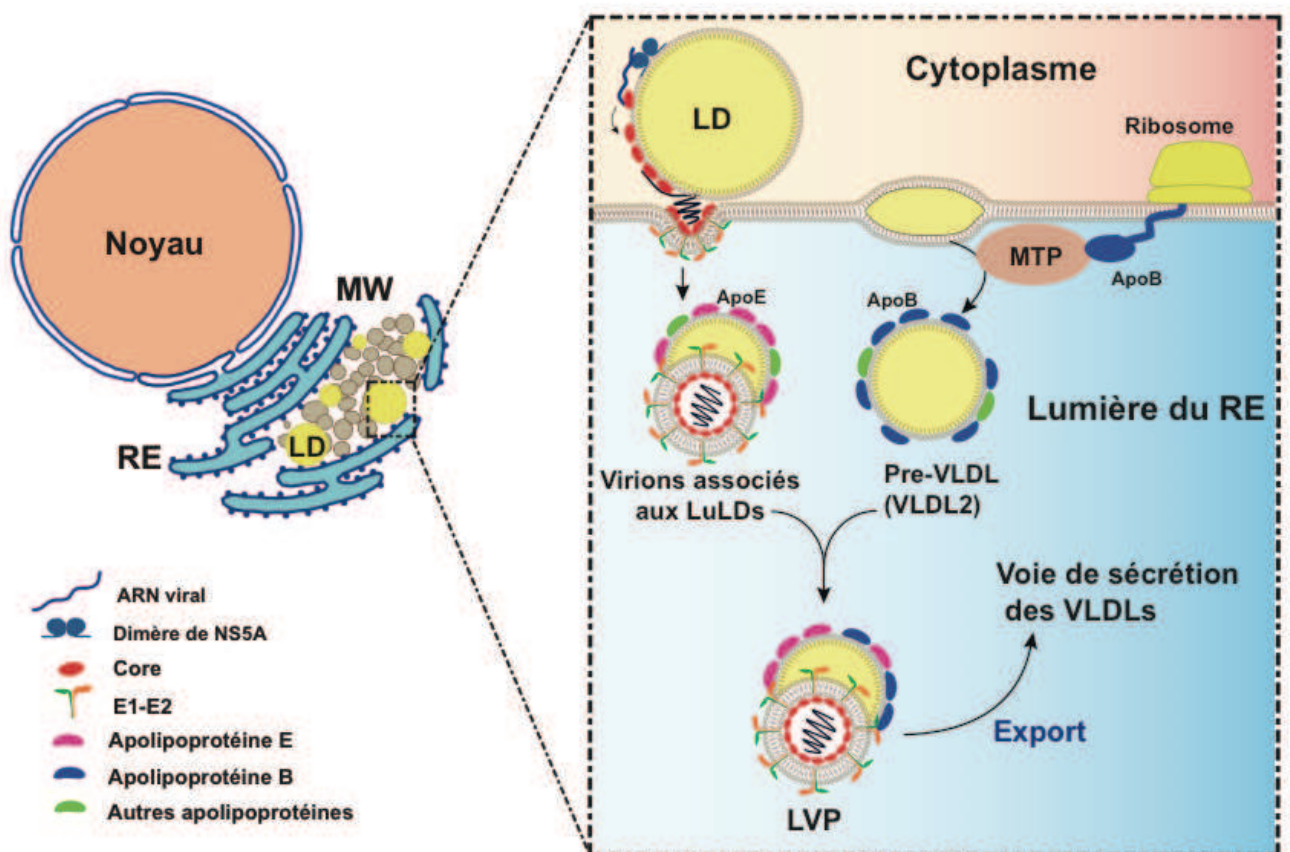


Figure 28. Modèle d'assemblage des particules virales du VHC (Adapté de Felmlee et al., 2013).

5.2. Maturation et export des particules virales

Plusieurs études ont montré que la maturation et la libération de particules de VHC, qui est la dernière étape de l'assemblage, est étroitement liée à la voie d'export des VLDLs. En effet la plupart des composants impliqués dans l'assemblage des VLDLs sont également requis pour la morphogenèse et la sécrétion du virus, ce qui suggère que le VHC emprunterait la voie de sécrétion des VLDLs pour son export, soutenant ainsi le concept de la LVP (Coller et al., 2012; Syed et al., 2010).

La biogenèse des VLDLs est un processus qui peut être présenté en deux étapes, qui nécessite au moins l'apolipoprotéine B (apoB) et la protéine MTP (*Microsomal triglyceride transfer protein*). Au cours de la première étape, la synthèse et la translocation d'apoB dans la lumière du RE forme une cavité dans laquelle sont transférés des phospholipides et des triglycérides par la protéine MTP. Le transfert des lipides qui est concomitant à la traduction d'apoB conduit à la formation d'une particule sphérique avec un noyau de lipides neutres, appelée VLDL2 (Figure 28). Cette VLDL naissante se déplace vers un compartiment distal de la voie de sécrétion et peut être libérée en tant que telle, ou bien fusionner avec des LDs dans la lumière du RE appelées luLDs (*Luminal lipid droplets*) formés par MTP dans le RE lisse. Cette fusion pourrait être facilitée par apoE qui se trouve sur les LuLDs et donne naissance à des lipoprotéines riches en lipides appelés VLDL1 (Bartenschlager et al., 2011).

Plusieurs éléments de preuve montrent que l'assemblage des particules virales et des VLDLs sont étroitement liés. Premièrement, les petites molécules inhibitrices de MTP bloquent également la production de particules virales (Gastaminza et al., 2008; Huang et al., 2007). Deuxièmement, l'association étroite des particules virales infectieuses avec des composants des VLDLs tels que les apolipoprotéines (Gastaminza et al., 2010; Merz et al., 2011; Nielsen et al., 2006). Alors que le rôle d'apoE dans l'assemblage et la production de particules virales infectieuses du VHC ne fait plus de doute (Benga et al., 2010; Chang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009) le rôle d'apoB quant à lui, reste très controversé (Gastaminza et al., 2008; Huang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009). ApoE est un élément constitutif des particules virales infectieuses (Merz et al., 2011). Cette protéine intervient au cours des étapes précoces de l'assemblage en interagissant avec

NS5A (Benga et al., 2010; Chang et al., 2007). De plus, une étude récente a montré que les particules virales naissantes migrent à travers la voie sécrétoire en liaison avec apoE, mais pas avec apoB (Coller et al., 2012), suggérant que l'assemblage du VHC dépendrait plus des LuLDs contenant apoE, que des VLDLs dont la sécrétion est indissociable d'apoB.

Les glycoprotéines d'enveloppe E1-E2 présentes sur les particules virales subissent des modifications complexes en particulier de nombreuses glycosylations indiquant que ces particules transitent par l'appareil de Golgi (Vieyres et al., 2010). Conformément à cette observation, Coller et ses collègues ont marqué la protéine Core d'une étiquette tétra-cystéine afin de pouvoir suivre le trafic intracellulaire des virions nouvellement formés. Leurs résultats confortent un modèle dans lequel les particules virales bourgeonnent dans le RE, puis empruntent la voie sécrétoire pour sortir de la cellule en passant par l'appareil de Golgi et l'endosome de recyclage (Coller et al., 2012).

La protéine p7 semble jouer un rôle très important au cours de l'export. En effet, grâce à son activité pompe à protons, cette viroporine neutralise les compartiments acides à l'intérieur de la voie sécrétoire et protégerait les particules virales d'une exposition précoce à un pH trop bas au cours de la maturation et de l'export des virions (Wozniak et al., 2010).

OBJECTIFS

Le VHC comme d'autres virus, dépend de facteurs cellulaires pour accomplir son cycle viral et persister dans l'hôte. Certains de ces facteurs, indispensables au virus, pourraient constituer des cibles thérapeutiques de choix, à condition que leur inhibition n'altère pas les fonctions normales de la cellule hôte. L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer le rôle des protéines cellulaires RACK1 et TIP47 au cours de deux étapes clés du cycle viral : respectivement, l'étape de traduction et l'étape de l'assemblage/ sécrétion.

Dans la première partie de ce travail, je présenterai les résultats concernant le rôle de la protéine ribosomale RACK1 (*The Receptor for Activated C Kinase 1*) dans la traduction IRES-dépendante du VHC. Cette protéine a été identifiée, par nos collaborateurs dans l'équipe du Prof. Jean-Luc Imler (UPR 9022 à l'IBMC, Strasbourg), comme étant importante pour la réplication de virus d'insectes dont les génomes à ARN (+) sont traduits par l'intermédiaire d'un élément structural IRES (site d'entrée interne du ribosome). Le VHC étant un virus à ARN (+) possédant également un IRES à son extrémité 5' (Fukushi et al., 1994) et que la protéine ribosomale RACK1 est très conservée au cours de l'évolution (Adams et al., 2011), nous avons étudié le rôle de cette protéine dans l'infection par le VHC. Les résultats obtenus sont décrits dans la partie I des résultats. Une publication est en cours de révision (Annexe I).

Dans la deuxième partie, je présenterai les résultats relatifs au rôle de la protéine TIP47 dans l'étape de l'assemblage/ sécrétion du VHC. TIP47 est une protéine présente à la surface des gouttelettes lipidiques (*Lipid droplets*, LDs) (Bulankina et al., 2009). Nos collaborateurs, de l'équipe du Prof. Eberhard Hildt (Paul-Ehrlich-Institut, Allemagne), ont observé que les variations dans l'expression de cette protéine avaient un impact direct sur la production de virions. Cette découverte est tout à fait intéressante, compte tenu du rôle central des LDs dans la production de particules virales infectieuses (Boulant et al., 2007; Miyanari et al., 2007). TIP47 est également impliquée dans le recyclage du récepteur du Mannose-6-phosphate (MPR), en interagissant directement avec la GTPase Rab9 (Díaz and

[Pfeffer, 1998](#)). Ce travail de collaboration a permis de mettre en évidence le rôle de TIP47 et de Rab9 dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales du VHC et a abouti à la publication de deux articles originaux qui sont présentés en annexe ([Annexe II et III](#)). Ma contribution à ces travaux est détaillée dans la deuxième partie des résultats.

PARTIE I

La protéine ribosomale RACK1 est un facteur de l'hôte requis pour la traduction IRES-dépendante du VHC

1. La protéine ribosomale RACK1 est un facteur de l'hôte requis pour la traduction IRES-dépendante du VHC

1.1. Introduction

RACK1 (*The Receptor for Activated C Kinase 1*) est un membre de la famille des protéines WD, protéines contenant des séquences répétées de type WD. Il s'agit d'une famille de protéines très conservée dont les nombreux membres sont retrouvés à la fois chez certains procaryotes et chez tous les eucaryotes. Les répétitions WD, elles-mêmes, sont typiquement des séquences de 44 à 60 aa de long qui se terminent à l'extrémité C-terminale par une signature dipeptide WD (Tryptophan-Aspartate) ou son équivalent. Le critère de base pour l'inclusion d'une protéine dans cette famille est la présence d'au moins quatre de ces séquences répétées afin de générer un domaine WD (Adams et al., 2011). RACK1 possède 7 répétitions WD dont chacune forme un feuillet- β constitué de quatre brins β antiparallèles (A à D). Les sept feuillets- β sont reliés par des tiges boucles et sont disposés de manière radiale autour d'un axe central ; ils forment ainsi, une structure en hélice- β , représentative des domaines WD (Figure 29A). Comme pour les autres membres de la famille des protéines WD, RACK1 semble jouer un rôle important dans différentes voies de signalisation. C'est une protéine d'échafaudage (scaffold) qui interagit avec un nombre important de protéines et leur sert de point d'ancrage en différents endroits de la cellule (Adams et al., 2011). En plus de ce rôle structurant, un aspect clé de la fonction de RACK1 est sa capacité à moduler l'activité enzymatique de ses partenaires. En effet, RACK1 peut promouvoir ou supprimer l'activité des enzymes auxquelles elle se lie. Par exemple, RACK1 stabilise l'activité de la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Kiely et al., 2006, 2008) et maintient la conformation active de la protéine kinase C β II (PKC β II) (Ron et al., 1994, 1999). RACK1 se lie également aux tyrosine kinases Src et Fyn pour maintenir ces kinases dans un état inactif jusqu'à ce que le signal approprié se produise et déclenche la dissociation du complexe (Mamidipudi et al., 2004a, 2004b; Yaka et al., 2002).

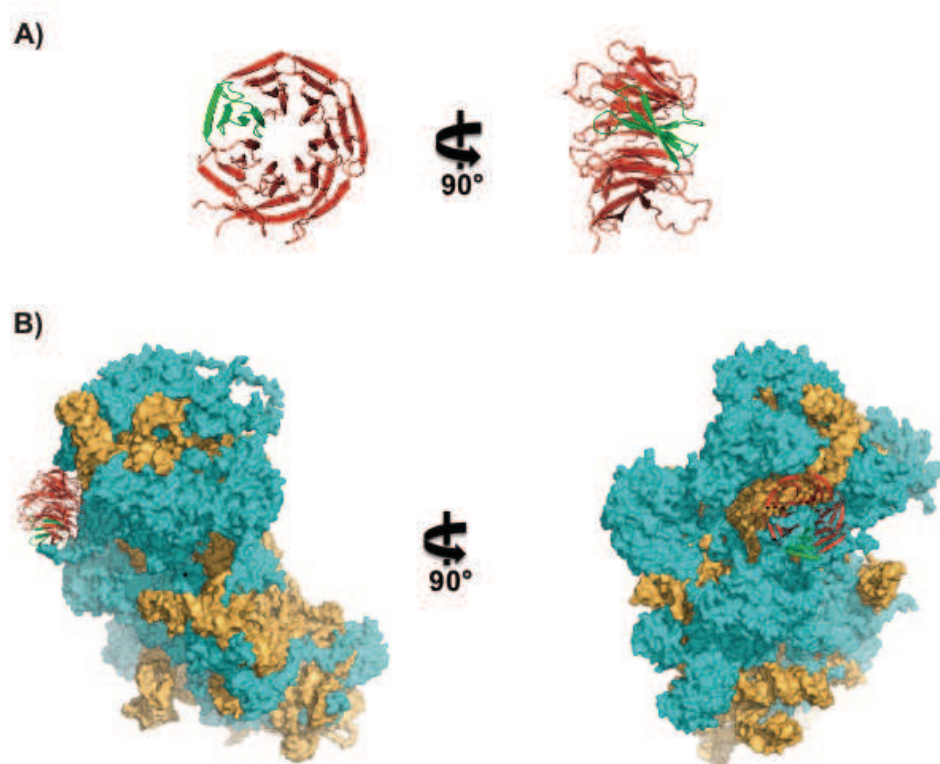


Figure 29. Structure de RACK1 associée à la sous-unité 40S du ribosome eucaryote.

Structure cristallographique de RACK1 seule (A) ou associée à la SU 40S du ribosome (B) de *Saccharomyces cerevisiae* à 3 Å de résolution (PDB 3U5B et 3U5C) (Ben-Shem et al., 2010). RACK1 possède 7 répétitions WD dont chacune forme un feuillet- β constitué de quatre brins β antiparallèles, les sept feuillets- β sont reliés par des tiges boucles et sont disposés de manière radiale autour d'un axe central. Une des répétitions WD est représentée en vert. Les protéines et l'ARN de la sous-unité 40S sont représentés en couleur bleue et cuivre, respectivement.

RACK1 est une protéine constitutive de la sous-unité 40S du ribosome (Ben-Shem et al., 2010; Link et al., 1999; Sengupta et al., 2004) (Figure 29B) et semble jouer un rôle important dans la régulation de la traduction par le recrutement d'un certain nombre de protéines régulatrices (Nilsson et al., 2004). C'est par exemple le cas de la PKC β II qui lorsqu'elle est activée, se lie à RACK1 et induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF6 déclenchant ainsi sa dissociation de la sous-unité 60S du ribosome, permettant ainsi l'assemblage des sous-unités 60S et 40S et la formation de ribosomes 80S actifs (Ceci et al., 2003). Contrairement à son rôle de promotion de la traduction, d'autres études suggèrent que RACK1 pourrait agir au niveau du ribosome pour réprimer l'expression des gènes (Gerbasi et al., 2004; Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011). En effet, il a été montré récemment que RACK1 interagit avec des composants du complexe miRISC, et contribue ainsi au recrutement de ces complexes sur les sites de traduction

suggérant sa participation dans la répression traductionnelle *via* la voie des miRs (Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011).

Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs cellulaires impliqués dans le contrôle des infections virales chez la Drosophile (*Drosophila melanogaster*), nos collaborateurs de l'équipe du Prof J.L. Imler (UPR 9022 à l'IBMC, Strasbourg), ont réalisé une étude protéomique fonctionnelle approfondie, suite à laquelle, ils ont identifié la protéine RACK1 comme étant un facteur cellulaire important pour la réplication des virus à ARN (+) d'insecte contenant un IRES dans leur génome. En effet, ils ont observé que, l'inhibition de RACK1 diminue la réplication du DCV (virus C de la drosophile) et du CrPV (Virus de la Paralysie du Criquet), mais pas celle du VSV (Virus de la Stomatite Vésiculeuse) ni celle du FHV (*Flock House Virus*) (Annexe I). Tandis que le VSV et le FHV dépendent d'un mécanisme de traduction classique coiffe-dépendant pour l'initiation de la traduction de leur génome, le DCV et le CrPV renferment, dans leurs génomes, des éléments IRES nécessaires à leur traduction. Les IRES permettent le positionnement exact du ribosome au site d'initiation de la traduction de manière coiffe-indépendante.

Au vu de ces observations et du fait que RACK1 soit très conservée au cours de l'évolution, nous avons étudié son rôle dans l'infection par le VHC, virus humain dont la traduction dépend également d'un élément IRES présent à l'extrémité 5' de son génome (Fukushi et al., 1994).

1.2. Outils biologiques

Afin d'évaluer le rôle de RACK1 dans l'infection par le VHC, nous avons utilisé différents modèles d'études :

Tout d'abord le modèle HCVcc qui permet la production de particules virales infectieuses issues de culture cellulaire. Pour ce faire nous avons électroporé des cellules de la lignée permissive Huh7.5.1 avec de l'ARN génomique viral Jc1 (un chimère intra-génotypique J6/JFH1) (Figure 30). Après 72h, le surnageant des cellules électroporées, contenant les particules virales infectieuses est récupéré et utilisé pour infecter des cellules Huh7.5.1 naïves. Ce modèle est utilisé pour étudier l'infection virale par immunodétection des protéines virales dans les lysats des cellules infectées ou par quantification de l'ARN viral par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).

On peut également évaluer les titres d'infectivité des particules virales produites dans le surnageant en réalisant un test TCID₅₀ (*Tissue culture infectious dose 50*). La valeur de la TCID₅₀/ ml indique la dilution du surnageant pour laquelle 50% des cellules sont infectées. Le marquage des cellules infectées se fait par immunodétection de la protéine virale Core. Un autre test qui est basé sur le même principe peut également être utilisé pour évaluer l'infectivité des particules produites c'est le test FFU (*Focus forming unit assay*) et qui consiste à compter les foci formés. Un foci est considéré comme tel, lorsqu'il y a au moins 5 cellules adjacentes qui sont positives à l'immunomarquage.

L'infection peut également être évaluée rapidement en utilisant le virus Luc-Jc1. C'est un virus dérivé du Jc1 qui code pour le gène rapporteur de la luciférase (Luc). La traduction du gène de la Luc est contrôlée par l'IRES du VHC alors que celle des protéines virales est contrôlée par l'IRES de l'EMCV (Figure 30).

En plus des systèmes réplicons génomiques et subgénomiques, la réplication virale peut être évaluée en utilisant un virus déficient pour l'assemblage et l'export de particules virales. Dans notre cas, nous avons utilisé le Luc-JFH1 Δ E1-E2, qui comme le Luc-Jc1, code pour le gène de la Luc et des protéines virales, excepté les glycoprotéines virales E1 et E2 (Figure 30).

Finalement, afin d'évaluer la traduction du VHC nous disposons de plasmides qui codent pour l'IRES du VHC en amont du gène de la Luc. Ces plasmides

contiennent en plus un gène de résistance à la néomycine (Néomycine phosphotransférase) permettant d'établir des lignées cellulaires stables (Wolf et al., 2008).

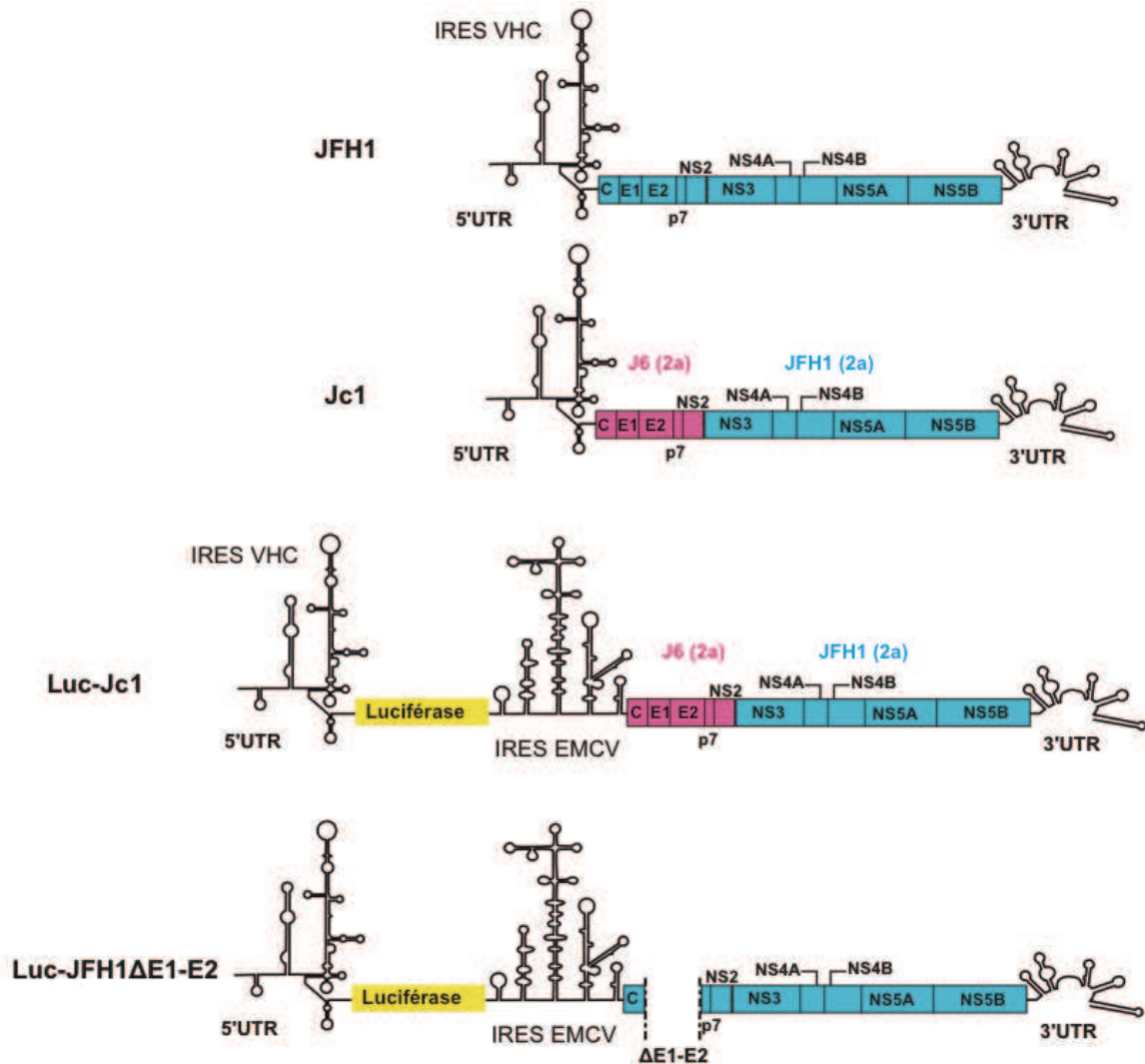


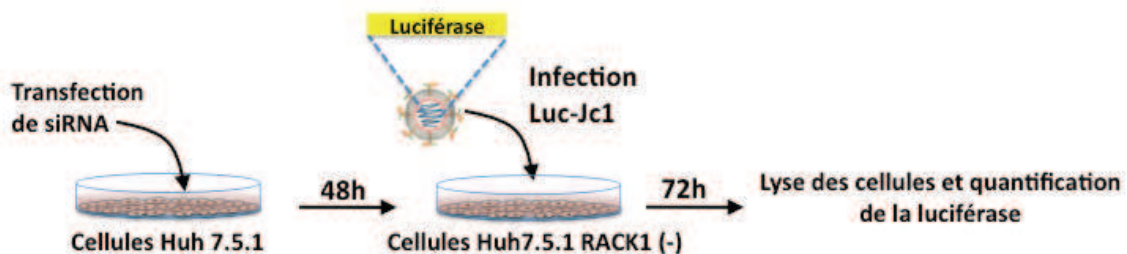
Figure 30. Représentation schématique des différents virus recombinants utilisés

1.3. Résultats

A. RACK1 est requise pour l'infection par le VHC

Dans un premier temps nous avons suivi l'effet d'une inhibition de l'expression de RACK1 par ARN interférence sur l'infection de cellules Huh7.5.1 par le VHC. La transfection de siRNA ciblant RACK1 réduit significativement l'expression de cette protéine dans les cellules Huh7.5.1, une lignée cellulaire hépatique hautement permissive à l'infection par le VHC (Figure 31A) (Zhong et al., 2005). L'infection des cellules Huh7.5.1 avec le virus recombinant VHC Luc-Jc1, exprimant en plus de son génome le gène rapporteur de la luciférase (Koutsoudakis et al., 2006) (Figure 30), montre que dans les cellules où l'expression de RACK1 a été inhibée, on observe une diminution significative de l'infection, comparable à celle obtenue lors de l'inhibition de facteurs-clés tels que CD81, un récepteur majeur de l'entrée virale (Pileri et al., 1998), ou de la cyclophiline A (CypA), une protéine impliquée dans la réplication du VHC (Kaul et al., 2009) (Figure 31B). Comme cela avait été observé pour les virus infectant les cellules d'insectes, cet effet semble lié à la présence de l'IRES dans le génome viral, car aucune inhibition n'a été observée, dans les cellules Huh7.5.1 infectées par l'adénovirus-5, un virus dont la traduction n'est pas IRES-dépendante, mais coiffe-dépendante (Figure 31C).

Schéma expérimental



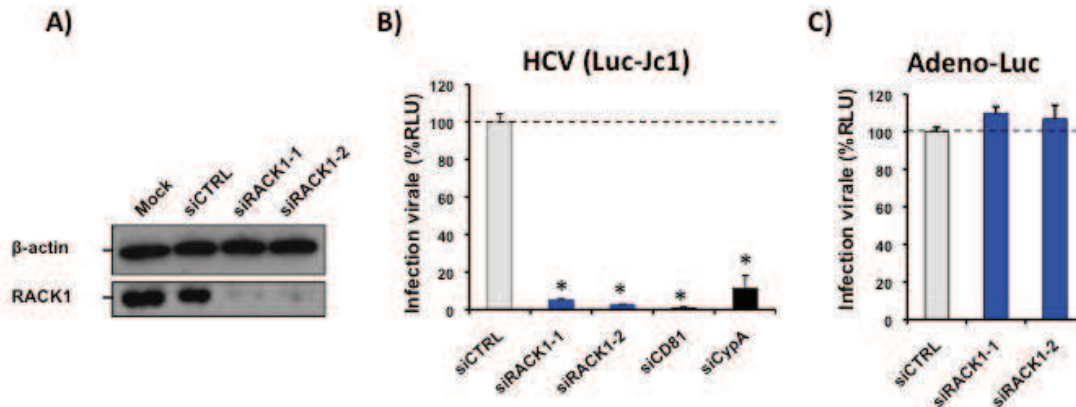


Figure 31. RACK1 est nécessaire à l'infection du VHC recombinant Luc-Jc1.

A) Western blot montrant l'inhibition de l'expression de la protéine RACK1 dans les cellules Huh7.5.1 transfectées par deux siRNA (siRACK1-1 et siRACK1-2) ciblant spécifiquement RACK1. **B)** L'inhibition de l'expression de RACK1, de CD81 ou de la CypA dans les cellules Huh7.5.1 diminue fortement l'infection par le virus recombinant Luc-Jc1. **C)** L'inhibition de l'expression de RACK1 n'affecte pas l'infection par l'adénovirus recombinant (Adeno-Luc). L'infection virale est mesurée par dosage de l'activité de la luciférase. Pour les panneaux (B) et (C), les cellules ont été transfectées par les siRNA, comme indiqué, 48h avant d'être infectées par les virus. L'activité luciférase est quantifiée 72h après l'infection. Les cellules transfectées par le siCTRL représentent le 100%. * $p < 0,005$. RLU : *Relative Light Unit*.

Etant donné que le virus recombinant Luc-Jc1 contient deux éléments IRES (l'IRES VHC en 5' en amont de la luciférase et l'IRES EMCV en amont des protéines virales) (Figure 30), nous avons voulu confirmer ces résultats avec le virus recombinant Jc1 qui ne contient que l'IRES du VHC (Figure 30). Dans les cellules où l'expression de RACK1 est inhibée, on observe une diminution très significative de l'infection virale, révélée par immunodétection de la protéine virale Core dans les lysats de cellules infectées (Figure 32A). Cette observation est corrélée à la forte diminution de la production de particules virales infectieuses produites, quantifiée par un test FFU (*Focus Forming Unit Assay*) réalisé par immunodétection de la protéine de capsid Core, après infection de cellules Huh7.5.1 naïves par les surnageants des cellules infectées (Figure 32B).

Schéma expérimental

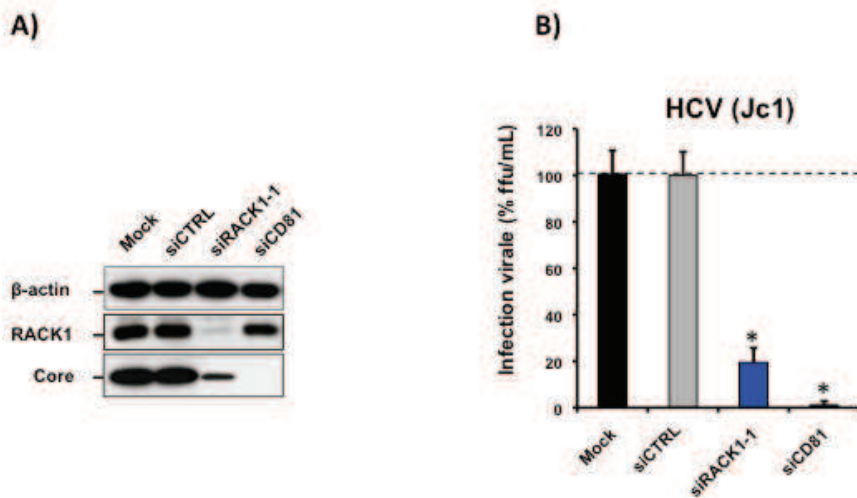
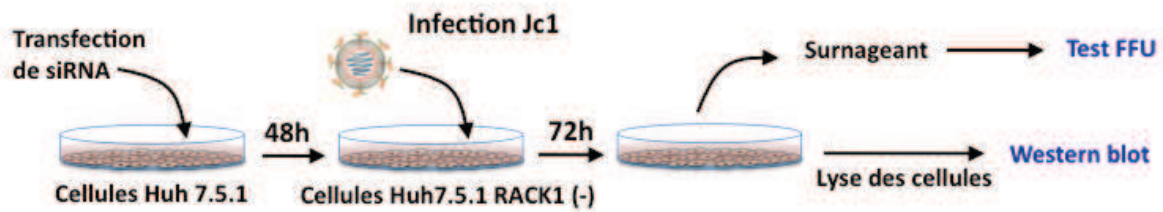


Figure 32. RACK1 est nécessaire à l'infection par le virus recombinant Jc1.

A) Western blot montrant que, dans les cellules Huh7.5.1 où l'expression de RACK1 a été inhibée par ARN interférence, l'expression de la protéine core reflétant l'infection par le virus VHC de type Jc1 est significativement diminuée. Les cellules ont été infectées 48h après avoir été transfectées par les différents siRNA. **B)** L'inhibition de l'expression de RACK1 ou de CD81, un facteur essentiel de l'entrée du VHC, dans les cellules Huh7.5.1 diminue fortement la production de particules virales infectieuses. L'infection virale a été mesurée par le test FFU (*Focus Forming Unit Assay*) par immunodétection de la protéine Core dans des cellules Huh7.5.1 infectées avec les surnageants des cellules transfectées par les siRNA. Les cellules transfectées par le siCTRL représentent le 100%. * $p < 0,005$.

B. RACK1 est nécessaire aux étapes postérieures à l'entrée virale

Afin d'exclure un mécanisme impliquant l'étape de l'entrée virale, nous avons testé l'effet de l'inhibition de RACK1 dans des cellules Huh7.5.1 répliquant le virus recombinant Luc-Jc1 (Figure 33A). Ces cellules « répliquantes » sont obtenues par électroporation de l'ARN génomique Luc-Jc1. Le gène rapporteur permet de suivre aisément la réplication virale dans les cellules électroporées. L'inhibition de l'expression de RACK1 dans ces cellules conduit à une forte diminution de la réplication virale, diminution supérieure à celle observée suite à l'inhibition de

l'expression de la CypA (Figure 33A). Ces résultats indiquent que RACK1 intervient dans les étapes postérieures à l'entrée virale, à savoir : les étapes de réplication, de traduction, d'assemblage et/ou de sécrétion. La même expérience réalisée avec des cellules répliquant un virus recombinant délété des protéines d'enveloppe E1-E2 (Luc-JFH1 Δ E1-E2), a donné des résultats comparables (Figure 33B). Dans ce cas le siRNA contrôle de l'inhibition de la réplication a été le siHCV qui est un siRNA ciblant la région IRES du génome viral (Yokota et al., 2003). L'ensemble de ces expériences montre que RACK1 est impliquée dans les étapes de traduction et/ ou de réplication du VHC.

Schéma expérimental

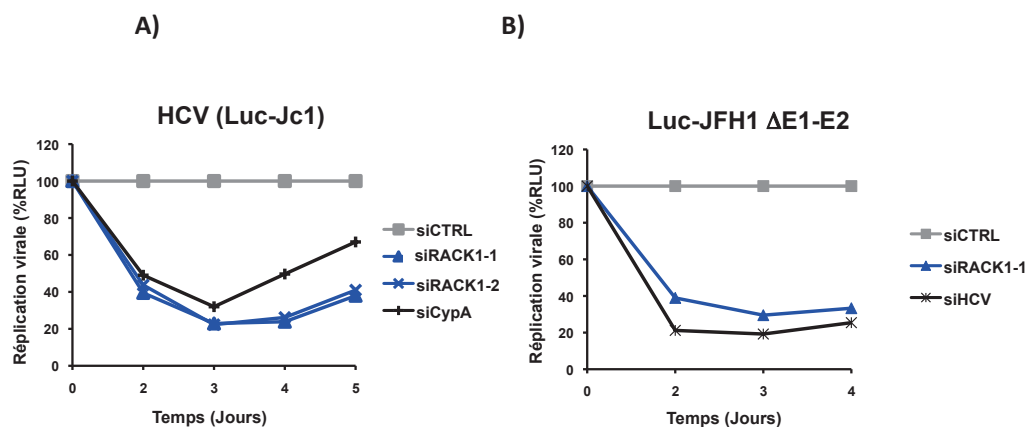
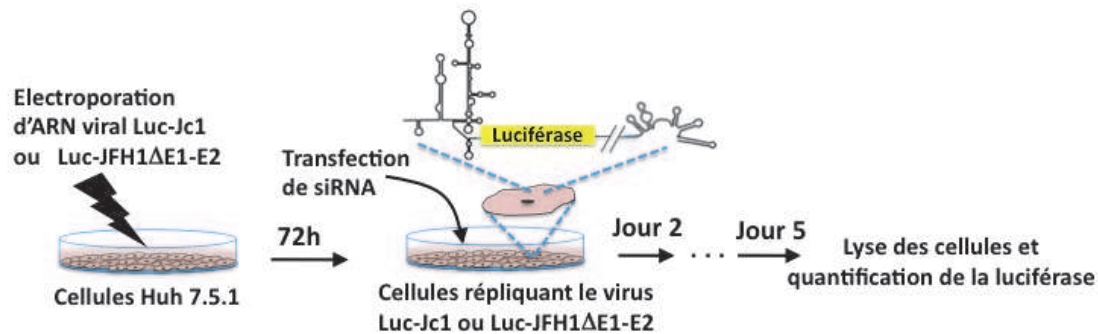


Figure 33. RACK1 est requise pour les étapes de réplication et/ou de traduction virale. Cinétique de réplication virale après inhibition de l'expression de RACK1 dans des cellules Huh7.5.1 répliquant le virus. **A)** L'inhibition, par ARN interférence, de l'expression de RACK1 ou de CypA, un facteur important pour la réplication du VHC, baisse fortement la réplication du virus recombinant Luc-Jc1. **B)** La transfection des cellules Huh7.5.1 répliquant le virus recombinant Luc-JFH1 Δ E1-E2, par des siRNA ciblant RACK1 ou ciblant directement le génome du VHC (siHCV) inhibe la réplication virale. Les cellules Huh7.5.1 sont électroporées par de l'ARN Luc-Jc1 ou Luc-JFH1 Δ E1-E2, transcrits *in vitro*. 72h après électroporation, les cellules sont transfectées par les différents siRNA et la réplication est mesurée par quantification de l'activité luciférase au temps indiqués post-transfection. Les cellules transfectées par le siCTRL représentent le 100%. RLU : *Relative Light Unit*. * $p < 0,05$.

C. RACK1 est impliquée dans la traduction IRES-dépendante du VHC

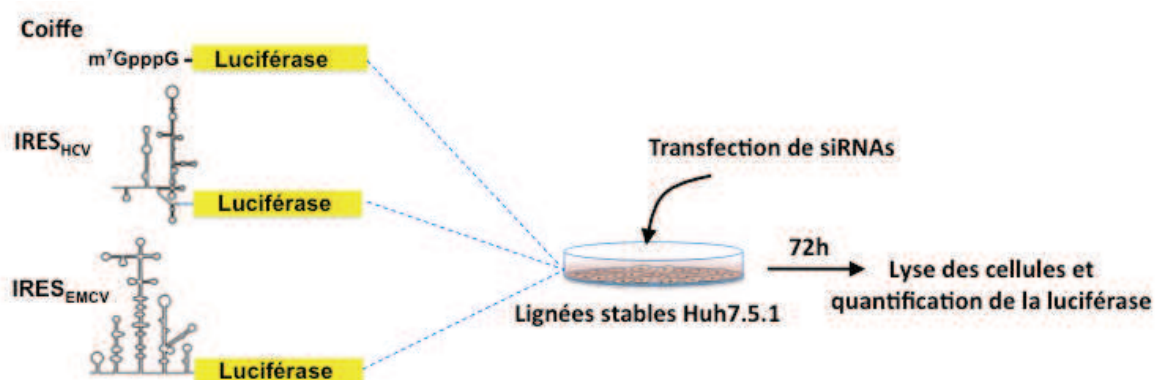
Finalement, afin de discriminer les étapes de réplication et de traduction, nous avons établi deux lignées cellulaires stables ; l'une exprimant le gène rapporteur de la luciférase en aval de la séquence IRES du VHC (IRES_{VHC}-Luc), l'autre exprimant le gène luciférase dont le mRNA est coiffé d'une « cap » en 5' (Cap-Luc) et sera donc traduit selon un mécanisme cap-dépendant. Le codon AUG du gène de la luciférase a été supprimé dans la construction IRES_{VHC}-Luc (Wolf et al., 2008), car l'IRES du VHC contient l'AUG initiateur du génome viral dans la tige boucle IV de l'IRES. La délétion de l'AUG de la luciférase permet ainsi d'éviter l'expression de luciférase issue de transcrits « parasites » coiffés, générés par des promoteurs cryptiques et traduits suite à un scanning classique du ribosome (Landry et al., 2009). L'inhibition de l'expression de RACK1 diminue de plus de 50% la traduction IRES-dépendante alors que la traduction coiffe-dépendante reste inchangée. Ce résultat est également observé lorsque l'on utilise un siRNA dirigé spécifiquement contre l'IRES du VHC (siHCV, un contrôle spécifique de l'inhibition de la traduction du virus). En revanche, comme attendu, le siRibo, dirigé contre le mRNA de la protéine ribosomale RPS3, inhibe, aussi bien, la traduction IRES-dépendante que la traduction coiffe-dépendante (Figure 34A). Des résultats comparables ont été obtenus avec la lignée cellulaire exprimant le gène rapporteur de la luciférase en aval de la séquence IRES EMCV (IRES_{EMCV}-Luc) indiquant que RACK1 est également requise pour la traduction IRES de l'EMCV (Figure 34B). Ceci explique pourquoi l'inhibition de RACK1 a plus d'impact sur l'infection du Luc-Jc1 (qui contient en plus de l'IRES du VHC, l'IRES de l'EMCV), que sur l'infection par le virus recombinant Jc1.

Afin de s'assurer que l'inhibition de l'expression de RACK1 n'influe pas sur la stabilité des transcrits ou leur expression nous avons quantifié en parallèle les ARNs transcrits par qRT-PCR. Les résultats montrent que le taux des transcrits d'ARNs reste inchangé dans les lignées cellulaires où l'expression de RACK1 a été inhibée, indiquant que la diminution observée du signal luciférase n'est pas due à l'instabilité des ARNm (Figure 34C).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons également vérifié l'impact de l'inhibition de l'expression de RACK1 sur la traduction en utilisant des ARNs transcrits *in vitro*. L'utilisation de ces ARNs permet d'obtenir des transcrits avec des

extrémités 5' et 3' bien définies, contrairement aux ARNs transcrits à partir d'ADN plasmidique qui pourraient subir des modifications telles que le « *capping* », l'épissage et la polyadénylation (Song et al., 2006). Nous avons donc transcrits *in vitro* deux ARNs différents : le premier ARN contient l'IRES du VHC suivi du gène rapporteur de la luciférase *firefly*, alors que le deuxième ARN est coiffé *in vitro* en 5' et code pour le gène rapporteur de la luciférase *renilla*. Ces deux enzymes sont phylogénétiquement très éloignées et ont des substrats différents, ce qui permet de mesurer leur activité de manière concomitante dans un même puits. Les deux ARNs sont co-transfectés dans les cellules Huh7.5.1 et l'activité traductionnelle est exprimée par le rapport entre l'activité luciférase *firefly* sur l'activité luciférase *renilla*. La luciférase *renilla* permet de normaliser le signal pour corriger les variations entre les différents puits. Dans les cellules où l'expression de RACK1 a été inhibée on observe une forte diminution de la traduction IRES-dépendante en accord avec les résultats obtenus précédemment avec les lignées cellulaires stables (Figure 34D), confirmant un effet de RACK1 sur la traduction IRES-dépendante du VHC. L'ensemble de ces résultats indique que la protéine RACK1 est spécifiquement requise pour la traduction IRES-dépendante de l'ARN du VHC.

Schéma expérimental



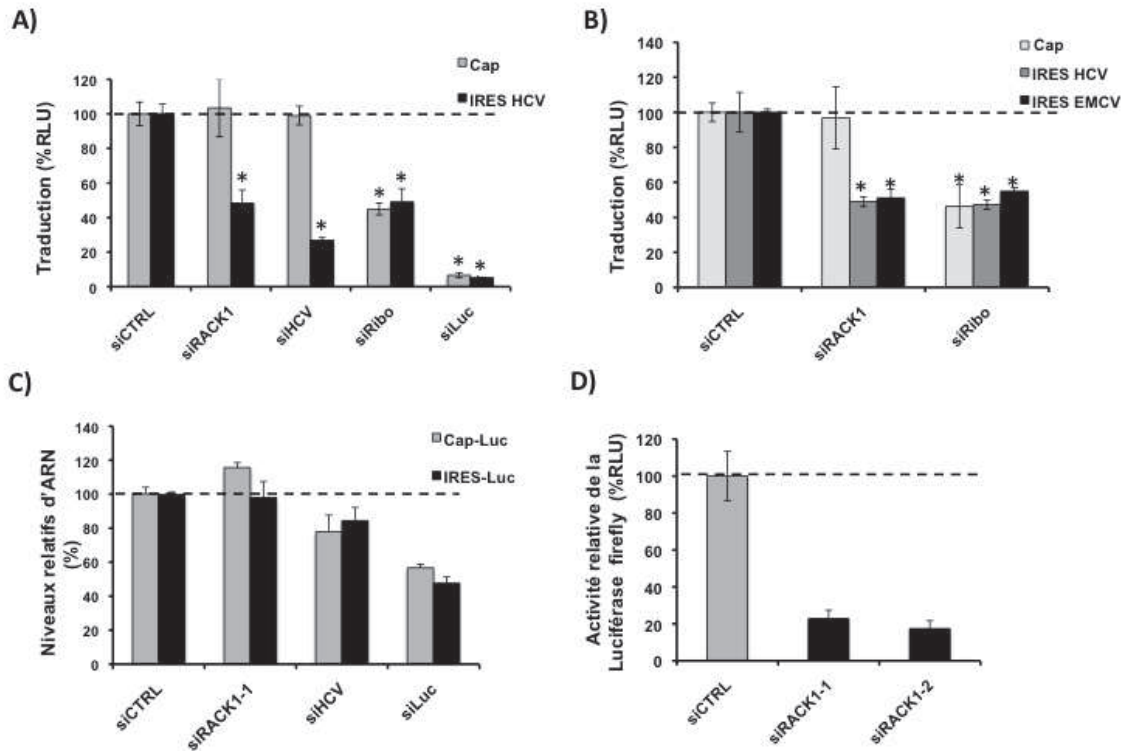


Figure 34. RACK1 est requise pour la traduction IRES du VHC et de l'EMCV.

A) La transfection des cellules par siRACK1 ou siHCV réprime spécifiquement la traduction des transcrits IRES_{VHC}-Luc, mais pas celle des transcrits Cap-Luc. En revanche, la transfection des cellules par un siRNA ciblant la protéine ribosomale RPS3 (siRibo) ou un siRNA ciblant le gène de la luciférase (siLuc) réprime la traduction des deux types de transcrits IRES_{VHC}-Luc et Cap-Luc. L'activité luciférase est quantifiée 72h après transfection des siRNA. Les cellules transfectées par le siCTRL représentent le 100%. *p<0,005. **B)** La transfection des cellules par siRACK1 réprime spécifiquement la traduction des transcrits IRES_{VHC}-Luc, et IRES_{EMCV}-Luc mais pas celle des transcrits Cap-Luc. En revanche, la transfection des cellules par un siRNA ciblant la protéine ribosomale RPS3 (siRibo) réprime la traduction des deux types de transcrits IRES-Luc et Cap-Luc. Les cellules transfectées par le siCTRL représentent le 100%. *p<0,005. **C)** Quantification relative, par qRT-PCR, des transcrits des gènes rapporteurs IRES_{VHC}-Luc ou Cap-Luc par rapport au gène endogène de la GAPDH dans les cellules transfectées par les différents siRNA. La moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes sont représentés. Les cellules transfectées par le siCTRL représentent le 100%. **D)** La traduction du gène rapporteur IRES_{VHC}-Luc, transcrit *in vitro*, est fortement diminuée dans les cellules où l'expression de RACK1 a été inhibée. Les cellules Huh7.5.1 sont électroporées avec les siRACK1 ou siCTRL puis co-transfectées 72h après avec les transcrits des gènes rapporteurs IRES_{HCV}-Luc (*firefly*) ou Cap-Luc (*renilla*). Le gène rapporteur Cap-Luc sert comme contrôle interne pour corriger les variations du signal entre les différents puits. L'activité traductionnelle est exprimée par le rapport entre le signal de la luciférase *firefly* et celui de la Luciférase *renilla*. RLU : *Relative Light Unit*.

D. RACK1 affecte la traduction du VHC indépendamment du miR-122

Un autre facteur, connu dans la littérature comme étant important pour la traduction IRES-dépendante du VHC, est le miR-122. En effet, ce micro-ARN cellulaire exprimé exclusivement dans les hépatocytes s'hybride sur deux sites complémentaires dans la région 5'UTR de l'ARN viral et promeut sa traduction

(Henke et al., 2008; Roberts et al., 2011). D'autre part, il a été récemment rapporté que, RACK1 est nécessaire à la fonction des micro-ARNs chez l'Homme, y compris le miR-122 (Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011). Nous avons donc voulu savoir si miR-122 intervenait dans le mécanisme d'action moléculaire de RACK1 au niveau de la traduction du VHC.

Pour répondre à cette question, nous avons comparé l'effet de l'inhibition de RACK1 sur la traduction IRES-dépendante du VHC en présence ou en absence du miR-122. Pour cela, nous avons fait appel à la lignée cellulaire HEK-293T qui n'exprime pas le miR-122 (Da Costa et al., 2012). A partir de cette lignée, nous avons établi une lignée stable, appelée HEK-293T-miR122, qui surexprime ce micro-ARN. La quantification par qRT-PCR du miR-122 dans cette lignée montre que son niveau d'expression est comparable à celui des cellules Huh7.5.1 qui expriment naturellement ce micro-ARN (Figure 35A). Comme attendu, la traduction IRES-dépendante du VHC est augmentée d'environ 2,5 fois dans la lignée HEK-293T-miR122 par rapport aux cellules HEK-293T (qui n'expriment pas de miR-122), indiquant que le miR-122 exprimé de manière ectopique dans ces cellules est fonctionnel (Figure 35B).

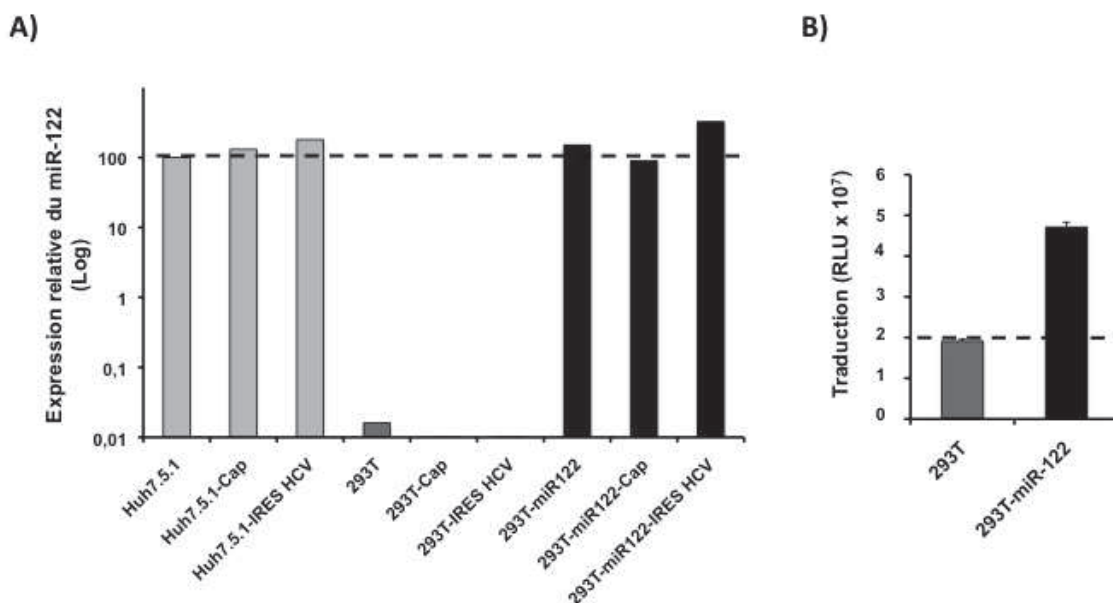


Figure 35. Le miR-122 exprimé de manière ectopique dans les cellules HEK-293T stimule la traduction IRES du VHC.

A) Quantification relative, par qRT-PCR, des niveaux d'expression du miR-122 mature par rapport au petit ARN endogène RNU6B dans les différentes lignées cellulaires établies. **B)** La traduction IRES_{VHC} est augmentée dans les cellules HEK-293T-miR122 par rapport aux cellules HEK-293T normales. La moyenne et l'écart type de trois expériences indépendantes sont représentés. RLU : *Relative Light Unit*.

Comme effectué précédemment avec les cellules Huh7.5.1, pour chaque type cellulaire (HEK-293T ou HEK-293T-miR122), nous avons établi deux lignées cellulaires stables ; l'une exprimant le gène rapporteur de la luciférase en aval de la séquence IRES du VHC (IRES_{VHC}-Luc), l'autre exprimant le gène luciférase coiffé en 5' (Cap-Luc). L'inhibition de RACK1 diminue la traduction IRES-dépendante du VHC à la fois dans les cellules HEK-293T et HEK-293T-miR122, à des niveaux comparables indépendamment de l'expression du miR-122 (Figure 36A et 36B).

Schéma expérimental

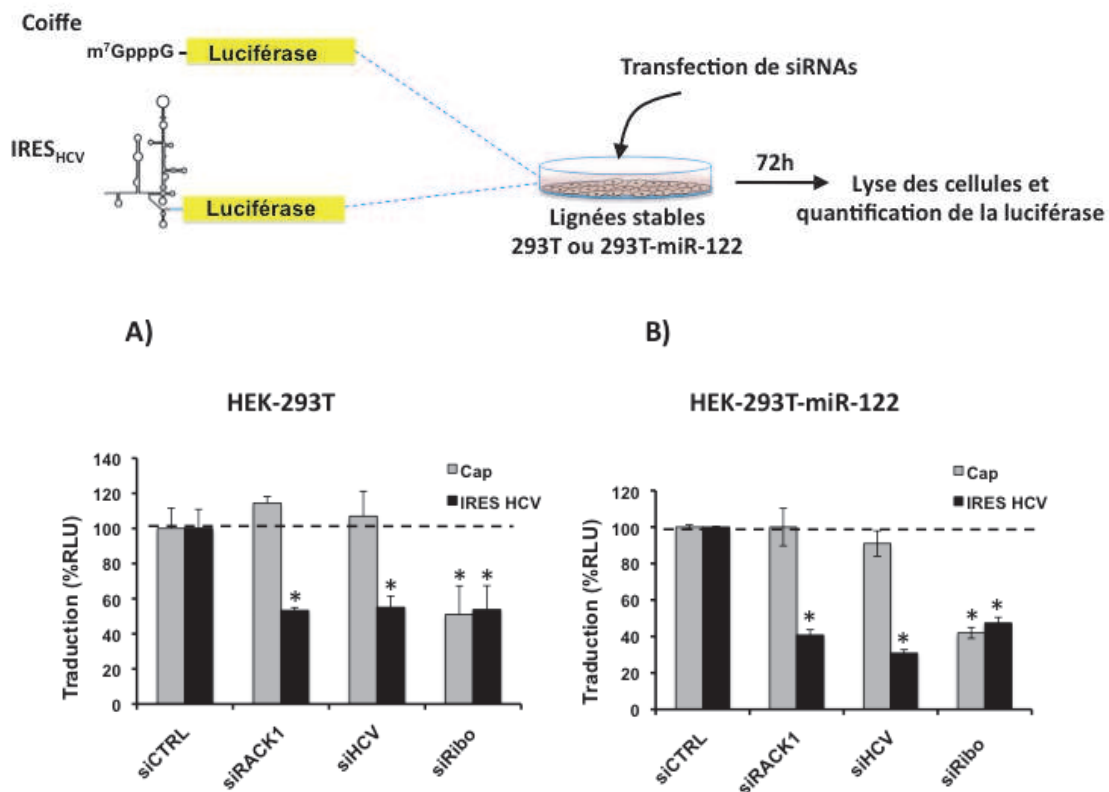


Figure 36. L'inhibition de RACK1 diminue la traduction IRES du VHC indépendamment de l'expression du miR-122.

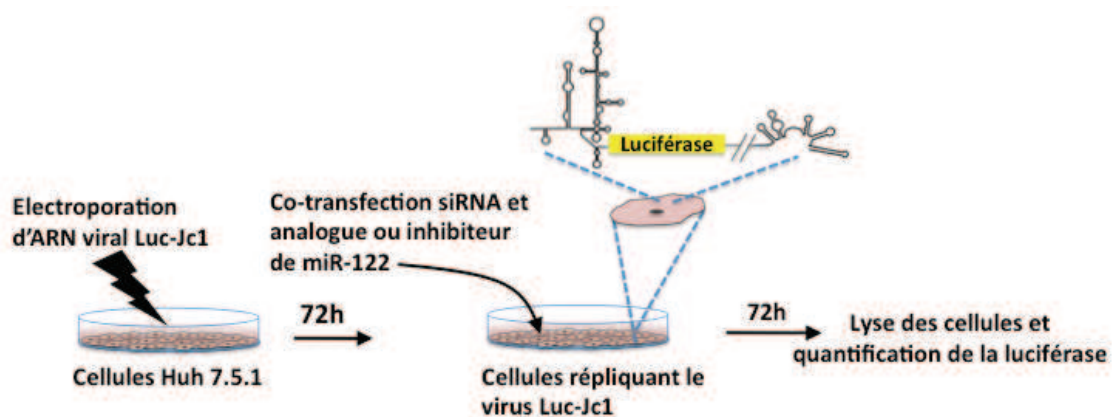
A) La transfection des cellules HEK-293T, n'exprimant pas le miR-122, par siRACK1 ou siHCV réprime spécifiquement la traduction des transcrits IRES_{VHC}-Luc, mais pas celle des transcrits Cap-Luc. En revanche, la transfection des cellules par un siRNA ciblant la protéine ribosomale RPS3 (siRibo) réprime la traduction des deux types de transcrits IRES_{VHC}-Luc et Cap-Luc. **B)** La transfection des cellules HEK-293T-miR-122 (cellules surexprimant le miR-122) par siRACK1 ou siHCV réprime spécifiquement la traduction IRES_{VHC}-Luc à un niveau comparable à l'inhibition observée dans les cellules HEK-293T classiques. L'activité luciférase est quantifiée 72h après transfection des siRNA. Les cellules transfectées par le siCTRL représentent le 100%. *p<0,005. RLU : *Relative Light Unit*.

Afin de confirmer que l'effet de RACK1 est indépendant de miR-122 également au cours de la réplication virale, nous avons co-transfecté des cellules Huh7.5.1 répliquant le virus Luc-Jc1, avec siRACK1 ou siCTRL et un analogue ou un inhibiteur du miR-122. Comme précédemment observé, l'inhibition de RACK1 diminue significativement la réplication virale comparé aux cellules transfectées par le siCTRL (Figure 37A). La transfection de l'analogue du miR-122 augmente la réplication du VHC, alors que la transfection de l'inhibiteur du miR-122 la diminue. Cet effet est aussi bien observé dans les cellules contrôles que dans les cellules siRACK1 (Figure 37A) suggérant une indépendance de RACK1 vis-à-vis du miR-122.

Lorsqu'on compare les résultats obtenus avec les cellules siCTRL par rapport aux cellules siRACK1, on observe que l'impact de l'analogue ou de l'inhibiteur du miR-122 sur la réplication virale se produit à des taux comparables indépendamment de l'expression de RACK1 (Figures 37B et 37C).

L'ensemble de ces résultats (Figures 36 et 37) indique que la protéine RACK1 et le miR-122 affectent la traduction IRES-dépendante du VHC par des mécanismes différents.

Schéma expérimental



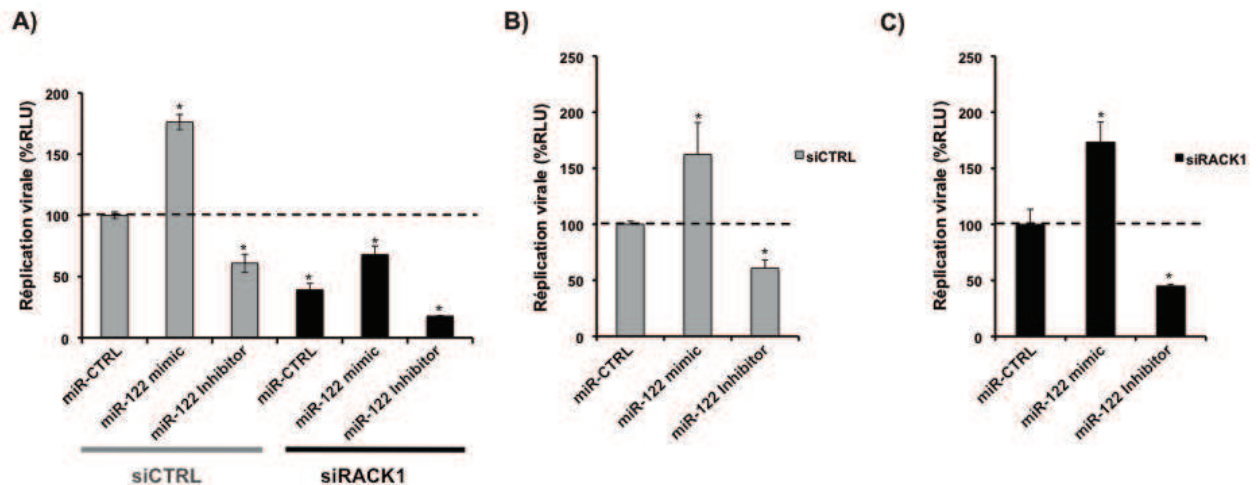


Figure 37. RACK1 et miR-122 affectent l'étape de la traduction du VHC par des mécanismes différents.

A) Les cellules répliquant le virus recombinant Luc-Jc1 sont co-transfectées avec siCTRL ou siRACK1 et un analogue du miR-122 (miR-122 mimic) ou un inhibiteur du miR-122 (miR-122 inhibitor). La transfection des cellules avec le siRACK1 diminue considérablement la répllication du VHC. Alors que la transfection du miR-122 mimic augmente la répllication du VHC, la transfection du miR-122 inhibitor la diminue. **B)** et **C)** L'impact du miR-122 mimic ou miR-122 inhibitor sur la répllication du VHC se produit à des niveaux comparables indépendamment de l'expression de RACK1. Les cellules co-transfectées par le siCTRL et le miR-CTRL représentent le 100%. * $p < 0,005$. RLU : *Relative Light Unit*.

E. L'inhibition de RACK1 n'affecte pas la viabilité et la prolifération cellulaire

Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de RACK1 sur la viabilité cellulaire, un test de type MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) a été réalisé sur une durée de 6 jours après la transfection des différents siRNAs permettant d'obtenir une cinétique de la viabilité cellulaire. Alors que les siRACK1 ne sont pas cytotoxiques pour les cellules Huh7.5.1, le siRibo, qui cible la protéine ribosomale RPS3, montre une toxicité sévère induite par l'inhibition de cette protéine dans ces cellules (Figure 38A). Afin de vérifier que l'inhibition de l'expression de RACK1 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire nous avons également réalisé un test basé sur l'utilisation du marqueur fluorescent CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). Ce test a permis de montrer que les cellules transfectées par siRACK1 prolifèrent normalement comparées aux cellules transfectées avec le siCTRL, contrairement aux cellules cultivées dans du milieu appauvri en sérum (2% au lieu de 10% SVF) qui elles prolifèrent plus lentement (Figure 38B). L'ensemble de ces résultats indique que l'inhibition de RACK1 n'affecte ni la viabilité ni la prolifération des cellules Huh7.5.1.

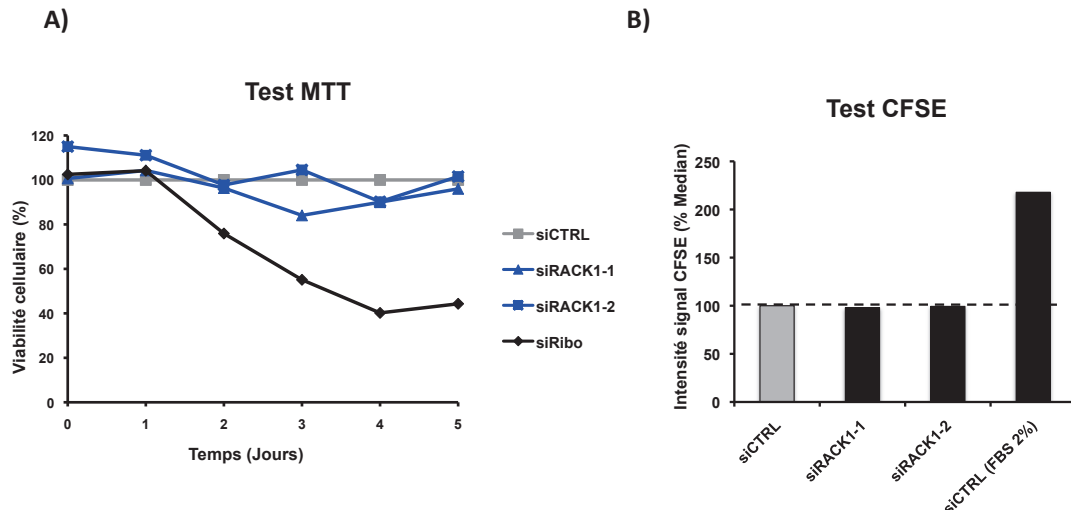


Figure 38. L'inhibition de RACK1 n'affecte ni la viabilité, ni la prolifération des cellules Huh7.5.1.

A) Test de viabilité de type MTT révélant que la transfection des cellules par des siRACK1 n'est pas cytotoxique contrairement aux siRibo qui cible la protéine ribosomale RPS3. Les cellules sont transfectées par les siRNAs et le test de viabilité est réalisé aux temps indiqués. **B)** Test de prolifération cellulaire de type CFSE révélant que les cellules transfectées par des siRACK1 ne sont pas affectées, contrairement aux cellules cultivées dans du milieu appauvri en sérum (2% SVF). Les cellules Huh7.5.1 électroporées par les siRACK1 (siRACK1-1 ou -2) ou siCTRL sont marquées au CFSE à J0. Le signal CFSE est mesuré par FACS 5 jours plus tard. L'intensité du signal CFSE est inversement proportionnelle à la prolifération cellulaire.

Afin de mesurer l'impact de l'inhibition de RACK1 sur la traduction cellulaire de manière globale, nous avons comparé les profils de traduction des ARNm dans les cellules Huh7.5.1 où l'expression de RACK1 a été inactivée, par rapport à des cellules normales. Les ARNm associés aux polysomes ont été isolés puis analysés sur des puces à ADN de type Agilent (Plateforme de biopuces et de séquençage haut débit, IGBMC, Strasbourg).

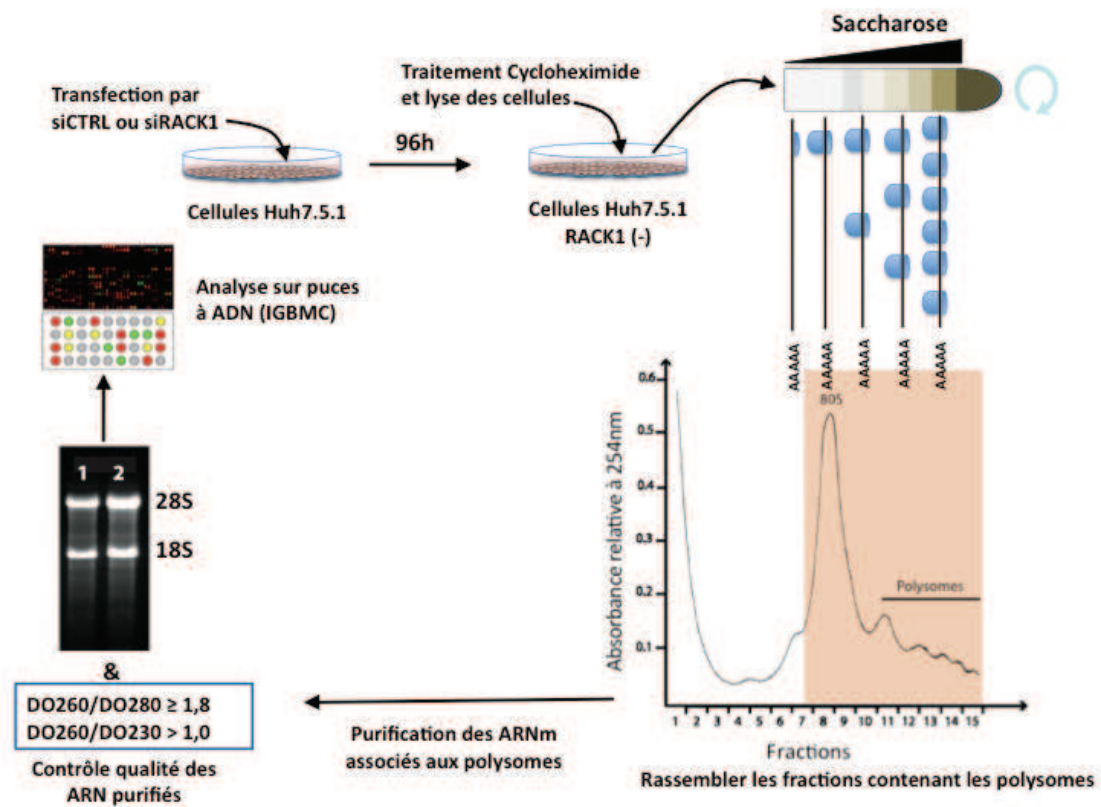
Les puces sont sous la forme de lames de microscope compartimentées, avec 8 puces identiques par lame. Nous avons tester 4 échantillons par condition (siCTRL ou siRACK1). Ainsi, chaque échantillon a été hybridé sur une puce distincte.

Chaque transcrite est interrogé par au moins 1 oligonucléotide de 60-mer, dirigé contre l'extrémité 3'. Les puces utilisent des ARNc fluorescents comme cibles dans une hybridation à une couleur (marquage Cy3).

Sur les 60.000 sondes interrogées, que contient la puce, 313 seulement, ont été affectées par l'inhibition de RACK1 ce qui représente moins de 0,1% des ARNm totaux. Dans nos analyses de données nous avons considéré uniquement les variations (augmentation ou diminution) de plus de deux fois. Les gènes affectés ont

été annotés et regroupés en utilisant l'outil d'annotation fonctionnelle DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b). Les groupes résultants sont présentés dans le camembert (Figure 39).

Schéma expérimental



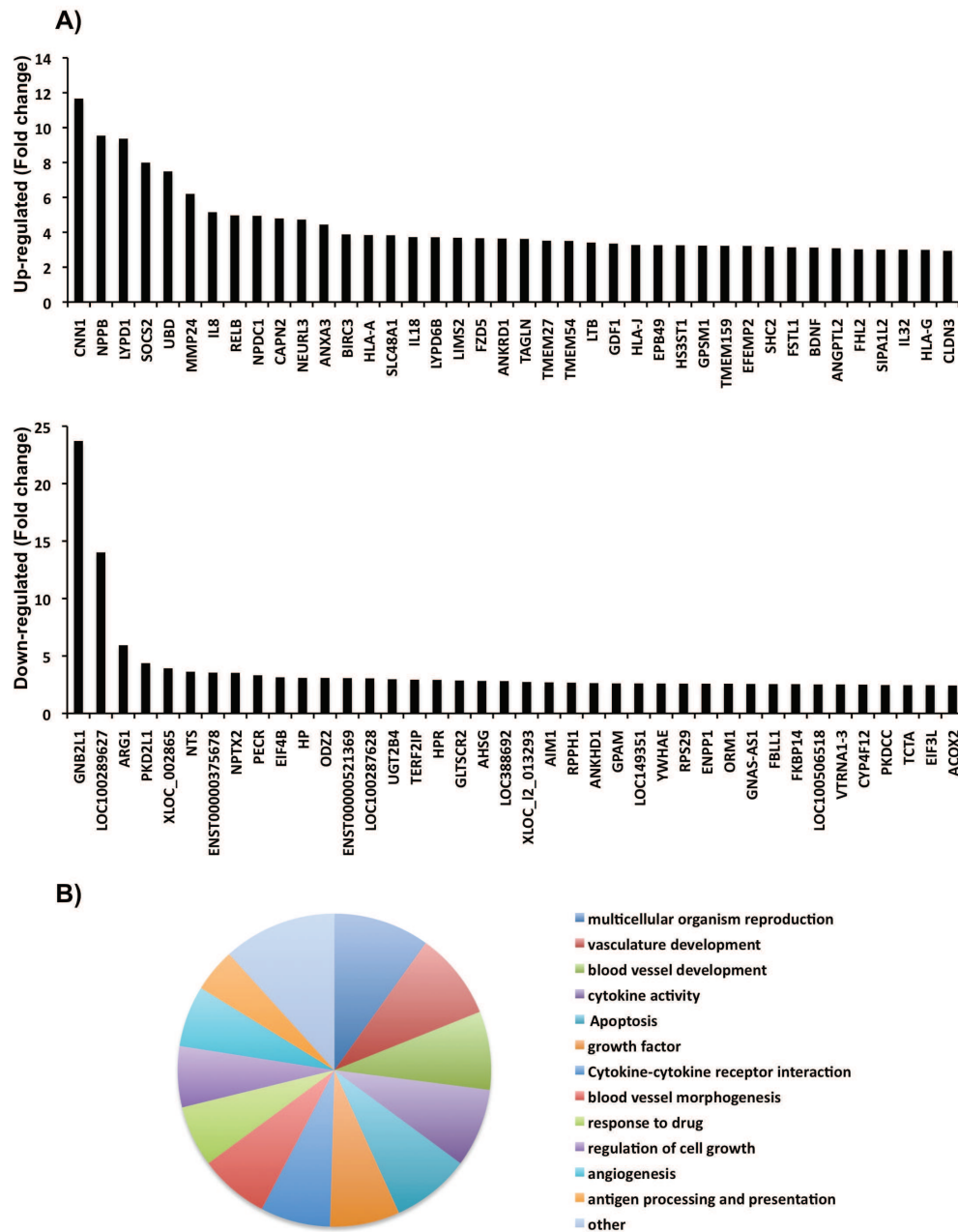


Figure 39. Répartition des ARNm dont la traduction est modifiée par l'absence de RACK1

Les résultats statistiques ont été classés en fonction des variations (Fold-change) pour identifier les gènes différentiellement exprimés dans les cellules transfectées par le siRACK1 et le siCTRL (Dembélé and Kastner, 2014). Les résultats ont été regroupés sur la base de l'expression différentielle avec un seuil d'erreur de 3%. Les gènes augmentés de 2 fois ont été identifiés par 186 sondes individuelles. Les gènes diminués de 2 fois ont été identifiés par 127 sondes individuelles. **(A)** Classement des 40 gènes les plus affectés par l'inhibition de RACK1 dans les cellules Huh7.5.1. La fraction des ARNm correspondant à ces gènes dans les polysomes est soit augmentée (panneau du haut) soit diminuée (panneau du bas) en l'absence de RACK1. Comme attendu, la diminution la plus significative correspond au gène de RACK1 (GNB2L1: FC = 23,71). **(B)** L'ensemble des gènes affectés ont été annotés et regroupés en utilisant l'outil d'annotation fonctionnelle DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b). Toutes les catégories d'annotation représentant moins de 4% ont été regroupées dans «Other».

1.4. Discussion - perspectives

Nos résultats démontrent un rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante. Plus précisément, nous avons montré que la protéine ribosomale RACK1 est essentielle à l'activité IRES de virus à ARN (+) d'insecte ou humain. En effet, cette protéine a d'abord été identifiée par nos collaborateurs comme importante pour la traduction de virus d'insectes contenant des éléments IRES dans leurs génomes, tels que le virus C de la drosophile (DCV) ou le virus de la paralysie du criquet (CrPV) ([Annexe I](#)). Nous avons ensuite étendu nos investigations et démontré que cette protéine était également nécessaire pour la traduction d'un virus IRES-dépendant humain, le VHC. Nos résultats suggèrent donc qu'au delà de leur diversité, les différents IRES testés sont probablement traduits selon un mécanisme commun impliquant la protéine ribosomale RACK1.

Nouvelle fonction de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante

RACK1 a été largement étudiée ces deux dernières décennies, et semble être impliquée dans différents aspects de la régulation cellulaire. Elle a initialement été caractérisée comme étant un récepteur intracellulaire pour la protéine kinase C activée ([Ron et al., 1994](#)). En effet, RACK1 se lie avec une affinité nanomolaire à la forme activée de la PKC β II, conduisant à sa stabilisation et à sa translocation vers des substrats spécifiques. D'autres formes de la PKC peuvent également se lier à RACK1, mais à une plus faible affinité ([Besson et al., 2002](#)). Cependant, des interactions avec de nombreux autres partenaires ont été signalées (plus de 100) soulevant la question de leur signification ([Gibson, 2012](#)).

Au départ, des études biochimiques et structurales indépendantes, chez la levure, avaient démontré que RACK1 était une composante de la petite sous-unité ribosomique 40S, où elle se trouve localisée dans la partie exposée au solvant, à proximité du canal de sortie de l'ARNm ([Link et al., 1999](#); [Sengupta et al., 2004](#)). Néanmoins, il avait été conclu que cette protéine ribosomale était non essentielle chez la levure, puisque l'inhibition de son expression n'était pas létale et que les cellules conservaient une vitalité et un fonctionnement optimaux, tant qu'elles

n'étaient pas confrontées à divers stress, principalement liés au manque de nutriments (Baum et al., 2004; Zeller et al., 2007).

L'association de RACK1 au ribosome est très conservée au cours de l'évolution, puisque cette protéine est également associée aux ribosomes chez les mammifères (Ceci et al., 2003; Gerbasi et al., 2004). La première étude à avoir fait le lien entre la fonction de RACK1 dans les voies de signalisation et sa localisation au niveau du ribosome, chez les mammifères, a suggéré que RACK1 agissait comme une plate-forme de signalisation de la PKC sur le ribosome et contribue ainsi à la régulation de la traduction chez les eucaryotes (Ceci et al., 2003). En effet, cette étude a montré que RACK1 interagit avec le facteur d'initiation eIF6 et permet sa phosphorylation par la PKCβII activée, ce qui déclenche sa dissociation de la sous-unité 60S, favorisant ainsi la formation de ribosomes 80S actifs (Ceci et al., 2003).

Nos données indiquent que la formation de ribosomes actifs n'est pas strictement dépendante de RACK1. En effet, l'inhibition de l'expression de RACK1 n'affecte pas la viabilité des cellules Huh7.5.1 humaines ou celle des cellules S2 de drosophile en culture. En accord avec ces observations, la traduction coiffe-dépendante du gène rapporteur luciférase n'est pas affectée par l'absence de RACK1 à la fois dans les cellules de drosophile et dans les cellules humaines.

In vivo, les mutants RACK1^{-/-} de drosophile ou de souris ne sont pas viables, indiquant que cette protéine joue un rôle majeur au cours du développement (Kadmas et al., 2007; Volta et al., 2013). En revanche, les mouches adultes, mutantes conditionnelles, sont parfaitement viables et ne sont pas affectées par l'absence de RACK1 dans des conditions de vie normales. Chez les souris RACK1^{-/-}, la létalité a lieu au stade de la gastrulation, ce point est en faveur d'un rôle régulateur de RACK1 plutôt que d'un rôle constitutif (Volta et al., 2013). En effet, des mutants (-/-) ciblant d'autres protéines ribosomales, comme RPS19 par exemple, sont létales avant même le stade de l'implantation du blastocyste dans l'utérus (Matsson et al., 2004).

L'ensemble de ces données suggère, qu'en plus d'être requise pour la traduction IRES-dépendante de certains virus à ARN, la protéine ribosomale RACK1 est probablement nécessaire à la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm cellulaires à certains stades du développement embryonnaire.

RACK1 et la théorie du code du ribosome

L'expression des gènes est régulée à plusieurs niveaux, y compris au niveau traductionnel. Cette régulation est largement attribuée à la modulation de l'activité des facteurs d'initiation (eIFs) qui influent sur la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm présentant des caractéristiques spécifiques à leurs extrémités 5'UTR. Contrairement aux eIFs, les protéines ribosomales sont généralement considérées comme ayant un rôle constitutif plutôt qu'un rôle régulateur dans la traduction des ARNm. Néanmoins, une idée évolutive du ribosome commence à voir le jour (Filipovska and Rackham, 2013; Mauro and Edelman, 2002; Topisirovic and Sonenberg, 2011). Elle stipule que malgré leur rôle commun dans la synthèse des protéines, les protéines ribosomales pourraient jouer un rôle dans la régulation de la traduction, se traduisant par des différences dans la composition des ribosomes individuels au sein de la cellule et déterminant ainsi le choix des ARNm qui vont être traduits. Cependant, une question centrale concerne la nature des éléments en *cis* qui définissent ce code du ribosome (Filipovska and Rackham, 2013; Mauro and Edelman, 2002; Topisirovic and Sonenberg, 2011). Dans le cas de RACK1 ces éléments *cis* seraient les IRES viraux.

De manière intéressante, une étude antérieure a mis en évidence le rôle d'une autre protéine de la sous-unité 40S du ribosome, la protéine RPS25, dans la traduction IRES-dépendante (Landry et al., 2009). Basée sur l'utilisation de gènes rapporteurs dans la levure et dans les cellules de mammifères, cette étude a montré que RPS25 joue un rôle essentiel dans l'activité de l'IRES du VHC et celui du CrPV-IGR, mais pas dans la traduction cap-dépendante. Cependant, le mécanisme moléculaire utilisé par RPS25 pour promouvoir la traduction est probablement différent de celui de RACK1 pour plusieurs raisons : (i) contrairement à RACK1, RPS25 est essentielle à la traduction de l'IRES du CrPV-IGR, (ii) en plus de promouvoir la traduction IRES-dépendante, RPS25 est responsable du « shunt ribosomique » chez l'adénovirus, alors qu'on a montré que l'inhibition de RACK1 n'a aucun effet sur la réplication de l'adénovirus, (iii) les données structurales placent RPS25 à distance de RACK1 sur la sous-unité 40S du ribosome (Ben-Shem et al., 2010). Ce positionnement expliquerait l'importance de RPS25 pour l'activité de l'IRES du CrPV-IGR, mais de ce fait différencie clairement les deux protéines.

Il est, par ailleurs, à noter que plusieurs autres protéines ribosomales sont impliquées dans la traduction spécifique de certains ARNm coiffés en 5'. C'est le cas par exemple de RPL38 et RPL40 qui sont requises pour la traduction d'ARNm cellulaires des protéines à homéodomaine et de l'ARNm du VSV, respectivement (Kondrashov et al., 2011; Lee et al., 2013), indiquant qu'une régulation spécifique des transcrits n'est pas nécessairement associée à la présence d'éléments IRES. Nos données corroborent la vision évolutive du ribosome eucaryote, qui comprend des éléments périphériques, tels que RACK1, qui sont impliqués dans la modulation de la traduction de certains ARNm en particulier.

Mécanisme d'action de RACK1 dans la traduction du VHC

En plus de promouvoir la traduction *via* son interaction avec la PKC activée, des publications récentes ont, suggéré un rôle inverse de RACK1 dans le contrôle de l'expression des gènes *via* la voie des miRs (Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011). RACK1 interagirait avec certains composants du complexe miRISC et serait importante pour la fonction des miRs chez l'Homme, y compris le miR-122 (Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011). Etant donné que le miR-122 joue un rôle essentiel dans la traduction du VHC, nous avons suggéré que l'effet de RACK1 sur la traduction soit lié à la fonction du miR-122.

En utilisant différentes approches complémentaires nous avons démontré que l'impact de RACK1 sur la traduction du VHC était indépendant de l'expression du miR-122. De plus, contrairement à RACK1, le miR-122 semble avoir un effet plus global sur le cycle biologique du VHC. En effet, ce micro-ARN augmente la stabilité de l'ARN viral en permettant la formation de complexes ribonucléoprotéiques à son extrémité 5', le protégeant ainsi contre la dégradation nucléolytique (Li et al., 2013; Machlin et al., 2011; Shimakami et al., 2012). Ainsi l'effet positif du miR-122 sur la traduction virale serait dû à la stabilisation de l'ARN viral afin de servir de matrice à la traduction, mécanisme différent de la voie classique des microARNs.

En s'appuyant sur des données structurales du ribosome associé à l'IRES du VHC obtenues par cryo-microscopie électronique (Boehringer et al., 2005; Sengupta et al., 2004; Spahn et al., 2001, 2004) et sur des structures cristallographiques du ribosome seul (Ben-Shem et al., 2010; Rabl et al., 2011), nos collaborateurs ont obtenu un modèle tridimensionnel qui permet d'analyser la position de RACK1 dans

la sous-unité 40S, en l'absence ou en présence de l'IRES du VHC, avec des détails pseudo-atomiques ([Annexe I](#)). Ces données ont révélé des changements conformationnels dans la sous-unité 40S, affectant la région où RACK1 est localisée confirmant un lien fonctionnel entre cette protéine et l'IRES du VHC. En revanche, même si RACK1 se trouve à proximité de l'IRES, elle ne semble pas établir de contact direct avec celui-ci, indiquant qu'il y a probablement un intermédiaire d'interaction. Une telle interaction pourrait être médiée par un ou plusieurs des ITAFs décrits dans la partie introduction. En effet, ces protéines stimulent l'activité traductionnelle des IRES et ont la faculté de se lier à l'ARN. Elles peuvent, par conséquent, potentiellement interagir à la fois avec l'IRES du VHC et avec la protéine RACK1, dont la structure est très favorable aux interactions protéine-protéine.

Un autre candidat potentiel pouvant jouer le rôle d'intermédiaire d'interaction entre RACK1 et l'IRES du VHC, est le facteur d'initiation de la traduction eIF3. En effet, il a été montré que ce complexe protéique était requis pour la traduction IRES-dépendante du VHC, en se liant simultanément à l'IRES et à la sous-unité 40S du ribosome ([Kieft, 2008](#)). De plus, une étude récente a montré que RACK1 interagit directement avec l'une des sous-unités périphériques de eIF3 ([Kouba et al., 2012](#)), supportant l'idée que ce facteur d'initiation pourrait être l'intermédiaire fonctionnel entre la protéine RACK1 et l'IRES du VHC.

eIF3 est un complexe protéique formé de 13 sous-unités. Afin de déterminer lesquelles d'entre elles sont potentiellement associées à la fonction de RACK1, nous envisageons de cibler les différentes protéines de ce complexe par des siRNA spécifiques et de suivre l'impact de leur inhibition sur la traduction IRES du VHC. Une approche similaire pourra également être envisagée pour tester le rôle de certains ITAFs qui pourraient contribuer à ce mécanisme.

L'étude comparative de complexes ribonucléoprotéiques de l'IRES du VHC en présence et en absence de RACK1 serait également un moyen efficace pour identifier le ou les facteurs servant d'intermédiaires entre RACK1 et l'IRES du VHC. Pour cela nous avons d'une part cloné l'IRES viral dans un vecteur qui permet d'avoir un ARN marqué par quatre tiges boucles MS2 à son extrémité 3'UTR ([Tsai et al., 2011](#)). D'autre part nous avons établi une lignée cellulaire qui exprime de manière stable la protéine MS2 du phage λ fusionnée à un tag biotine. Lorsque l'IRES du VHC, qui est associé aux tiges boucles MS2 sur le même transcrit, est

transfecté dans ces cellules, la protéine MS2 marquée par la biotine se lie spécifiquement aux tiges boucles MS2, permettant de récupérer les complexes ribonucléoprotéiques associés à l'IRES *via* des billes de streptavidine. Les complexes obtenus seront analysés par spectrométrie de masse et le ou les candidats identifiés pourront être testés individuellement.

Enfin il est également possible que RACK1 serve de plateforme d'amarrage, sur le ribosome, à certaines molécules des voies de signalisation telles que la PKC, leur permettant d'induire des modifications post-traductionnelles sur des facteurs directement associés à l'IRES et par conséquent de favoriser sa traduction. Sans oublier que RACK1 elle-même peut subir des modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations, pouvant modifier directement sa fonction lors de la traduction IRES-dépendante.

En utilisant une large gamme d'inhibiteurs disponibles dans le commerce, il serait possible de tester l'implication de certaines protéines des voies de signalisation telles que la PKC β II dans la traduction IRES du VHC et de déterminer précisément, si tel est le cas, quelle est la voie de signalisation sollicitée dans ce processus.

RACK1, une cible thérapeutique

Le traitement standard actuel pour une infection chronique par le géotype 1 du VHC est l'interféron alpha (INF- α), la ribavirine et un inhibiteur de la protéase NS3 (Pawlotsky, 2014). Un grand nombre d'autres antiviraux à action directe (DAAs) très prometteurs sont en cours d'évaluation clinique. Cependant, la réponse limitée au traitement pour certains géotypes ainsi que l'apparition de variants viraux résistants restent d'actualité et demeure un défi médical important pour une proportion non négligeable de patients (Jacobson et al., 2013; McPhee et al., 2013). Ainsi, les patients difficiles à traiter, tels que les « non répondeurs », « non-répondeurs partiels » ou les « répondeurs - rechuteurs », mais également les patients présentant une maladie hépatique avancée, les patients souffrant de maladies métaboliques, les patients co-infectés VIH ou immunodéprimés nécessiteront très probablement des approches thérapeutiques complémentaires ou alternatives (Jacobson et al., 2013).

Une stratégie prometteuse pour faire face à l'apparition de virus résistants au traitement standard et aux DAAs, est de définir des agents qui ciblent des facteurs

de l'hôte (HTAs). Comparé à la grande variabilité des protéines virales qui sont ciblées par les DAAs, la variabilité des facteurs de l'hôte ciblés par les HTAs est faible (Nathan, 2012). Ainsi, en imposant une barrière génétique à la résistance, supérieure à celle des DAAs, les HTAs peuvent permettre d'éviter l'émergence de variants viraux d'échappement (Fofana et al., 2010; Lupberger et al., 2011; Pawlotsky, 2014). Le risque lié à l'utilisation des HTAs est leur toxicité cellulaire en général supérieur à celui des DAAs et leur capacité d'interférence avec des mécanismes de régulation métabolique majeurs.

La traduction du VHC est une étape importante pour la propagation du virus, RACK1 pourrait, de ce fait, constituer une cible idéale pour une thérapie antivirale. De manière intéressante, nos données obtenues en culture cellulaire n'ont révélé ni cytotoxicité, ni impact sur la prolifération cellulaire suite à l'inhibition de RACK1. Ceci ouvre une perspective très attrayante pour le développement de nouvelles molécules ciblant cette protéine pour le traitement de l'hépatite C chronique, résistante aux traitements standard.

Il est également à noter, que d'autres virus responsables de maladies humaines utilisent un mécanisme IRES-dépendant pour la traduction de leurs génomes ARN. Il s'agit notamment du VIH, des entérovirus tel que le poliovirus, les rhinovirus, les cardiovirus tel que l'EMCV, les aphtovirus tel que le FMDV, et le virus de l'hépatite A (Martínez-Salas et al., 2008). Nous avons d'ores et déjà confirmé le rôle de RACK1 dans la traduction IRES de l'EMCV.

Outre les virus humains, certains virus animaux, comme les pestivirus (Peterhans et al., 2010), dépendent également d'une traduction IRES et représentent un poids socio-économique considérable avec des offres de traitement limitées ou totalement absentes. La traduction de ces virus pourrait également être sensible à l'inhibition de RACK1. Par conséquent, le développement d'inhibiteurs de RACK1 pourrait avoir des avantages non seulement pour le traitement des infections par des virus humains, mais pourrait également être utile pour la médecine vétérinaire.

Au delà de son rôle dans la traduction IRES-dépendante du VHC, RACK1 semble également impliquée dans la progression de nombreux cancers humains dont le carcinome hépatocellulaire (Adams et al., 2011; Bourd-Boittin et al., 2008). Ainsi des inhibiteurs ciblant la protéine RACK1 pourraient non seulement empêcher la propagation du virus mais également interférer avec le développement tumoral.

Il est estimé qu'environ 10 à 15 % des ARNm cellulaires sont traduits de manière IRES-dépendante (Komar and Hatzoglou, 2011). Il nous a paru important d'estimer l'impact de RACK1 sur la traduction d'ARNm cellulaires, en particulier dans l'optique de la mise au point de molécules inhibitrices de RACK1. Nous avons, ainsi, très récemment réalisé une analyse transcriptomique des ARNm cellulaires associés aux polysomes en présence et en absence de la protéine RACK1. Dans un premier temps, cette expérience nous donnera une idée sur la proportion d'ARNm cellulaires traduits de manière RACK1-dépendante. Une analyse plus détaillée des résultats nous permettra ensuite de déterminer la présence d'éléments *cis* communs à ces différents transcrits afin de déterminer les cibles fonctionnelles de RACK1 dans la cellule.

En conclusion, nous avons montré que la protéine RACK1 est impliquée dans la traduction des ARNm de virus contenant des IRES et qu'elle n'était pas requise pour la traduction de la grande majorité des ARNm cellulaires. Nos résultats, confortent l'hypothèse d'un code du ribosome et désignent RACK1 comme un élément qui caractérise la traduction spécifique de certains transcrits, en l'occurrence les ARN IRES dépendants. L'identification d'une protéine ribosomale requise pour la traduction particulières de certains ARN viraux et cellulaires ouvre des perspectives intéressantes pour l'élaboration rationnelle d'une nouvelle classe d'agents thérapeutiques antiviraux et anti-cancéreux ciblant des composants spécifiques du ribosome tels que RACK1.

PARTIE II

La protéine TIP47 joue un rôle important dans la morphogénèse et l'export des particules virales infectieuses du VHC.

2. La protéine TIP47 joue un rôle important dans la morphogenèse et l'export des particules virales infectieuses du VHC.

2.1. Introduction

Le cycle de développement du VHC est étroitement lié au métabolisme des lipides. Lors de l'infection, le virus améliore sa réplication en modulant le métabolisme lipidique de la cellule hôte ; il y a alors augmentation de la synthèse des lipides (lipogenèse) et une diminution de leur dégradation (β -oxydation) et de leur export. Ce déséquilibre dans l'homéostasie des lipides a pour conséquence une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, appelée stéatose (Syed et al., 2010). Des études récentes ont montré que les gouttelettes lipidiques (*Lipid droplets*, LDs) jouent un rôle important dans la production de particules virales infectieuses. En effet, la protéine virale Core qui se trouve majoritairement localisée à la surface des LDs, recrute les complexes de réplication, constitués principalement des protéines non-structurales (NS) du virus, en interagissant directement avec NS5A. De plus, les virions nouvellement formés, ont été observés à proximité de ces organites, indiquant que certaines étapes de l'assemblage du virus ont lieu autour des LDs (Appel et al., 2008; Miyanari et al., 2007).

Les LDs sont des réserves intracellulaires d'esters lipidiques, elles séquestrent les lipides dans les cellules pour une utilisation ultérieure comme combustibles métaboliques, comme composants membranaires, pour des modifications post-traductionnelles de protéines ou comme molécules de signalisation (Bickel et al., 2009; Brasaemle, 2007). Ces organites sont tapissés de protéines spécifiques appartenant à la famille des « *PAT-proteins* » qui contient cinq membres (Perilipin, ADRP, TIP47, S3-12 et OXPAT). Les membres de cette famille s'associent aux LDs et jouent un rôle commun dans leur stabilisation néanmoins ces protéines ont une distribution tissulaire variables. Dans les hépatocytes, seuls TIP47 et ADRP sont exprimées. Contrairement à ADRP qui est exclusivement présente à la surface des LDs, TIP47 est dite « échangeable » puisqu'elle est également retrouvée sous forme libre dans le cytoplasme (Bickel et al., 2009; Brasaemle, 2007). Cette

propriété rappelle curieusement celle de l'apolipoprotéine E (apoE). En effet cette protéine qui est associée aux VLDLs peut également exister sous forme libre. De plus, les études structurales ont révélé une analogie entre ces deux protéines indiquant probablement des fonctions similaires (Hickenbottom et al., 2004). D'autant plus que les organites auxquelles ces deux protéines s'associent (les LDs et les VLDLs) partagent des propriétés communes à savoir ; un corps hydrophobe constitué de triglycérides et d'esters de cholestérol entouré par une monochouche de phospholipides et de cholestérol libre sur laquelle des protéines viennent s'incorporer ou s'associer de manière périphérique (Felmlee et al., 2013; Hickenbottom et al., 2004).

TIP47 est également impliquée dans le recyclage du récepteur du Mannose-6-phosphate (MPR). En effet, elle interagit directement avec la GTPase Rab9, reconnaît le domaine cytoplasmique du MPR et assure son transport depuis l'endosome tardif vers le réseau trans-Golgien (Díaz and Pfeffer, 1998).

Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs cellulaires importants pour la réplication du VHC, nos collaborateurs ont réalisé une analyse protéomique différentielle entre des cellules Huh7.5 répliquant le virus JFH-1 et des cellules Huh7.5 non-répliquantes. Ils ont alors observé que les taux de la protéine TIP47 étaient moins élevés dans les cellules répliquantes. Pourtant l'analyse transcriptionnelle, par qRT-PCR, a révélé qu'il y avait plus d'ARNm TIP47 exprimé dans ces cellules par rapport aux cellules normales. Par ailleurs, alors que l'inhibition de l'expression de TIP47 dans les cellules Huh7.5 diminue la production de particules virales infectieuses, la surexpression de TIP47 augmente leur production indiquant un rôle important de cette protéine dans l'assemblage et/ ou la sécrétion des virions.

Les expériences de microscopie confocale ont montré que TIP47 co-localise avec NS5A autour des LDs dans les cellules répliquantes. De plus, les expériences de co-immunoprécipitation et de i-PCR (*immune-PCR*) ont révélé que dans les cellules répliquantes, TIP47 co-immunoprécipite avec NS5A complexée avec de l'ARN viral (Annexe II), suggérant un rôle important de TIP47 dans le cycle du VHC.

2.2. Résultats

Ma contribution dans ce travail a été de caractériser l'interaction de TIP47 avec NS5A dans le système du double-hybride chez la levure. Cette approche permet de mettre en évidence une interaction directe entre deux protéines. Elle consiste à utiliser deux vecteurs, codant chacun pour une protéine de fusion différente ; Une protéine dite « appât » qui est fusionnée au domaine d'activation du régulateur GAL4 (AD). Et une autre protéine appelée « proie » qui est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (DBD). Si les deux protéines (appât et proie) interagissent ensemble, on observe une activation de la transcription des gènes rapporteurs (gènes d'auxotrophie et/ou la β -galactosidase) permettant aux levures de pousser sur milieu sélectif. Si, au contraire, les deux protéines n'interagissent pas ensemble, il n'y aura pas activation des gènes rapporteurs et donc les levures seront incapables de pousser sur milieux sélectif (Figure 40A). Dans notre cas, j'ai utilisé TIP47 comme protéine appât et les protéines du VHC (Core, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) comme protéines proies. J'ai cloné les gènes codant pour chaque protéine dans un vecteur approprié. Ensuite j'ai procédé aux tests d'interactions. Les résultats obtenus montrent que TIP47 interagit fortement avec la protéine non structurale 5A (NS5A) du virus (Figure 40B).

Schéma expérimental

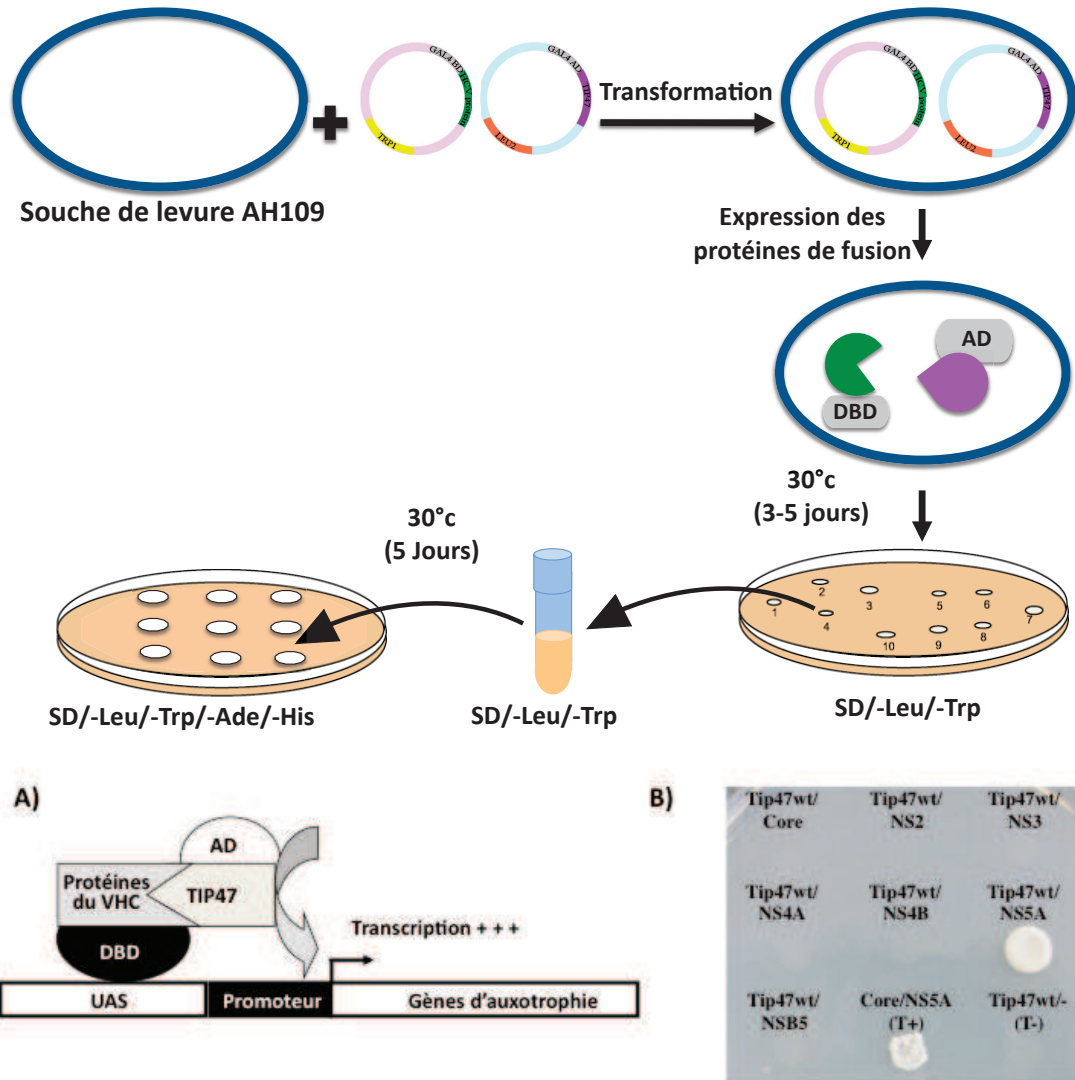


Figure 40. TIP47 interagit spécifiquement avec la protéine virale NS5A.

A) Principe du double hybride chez la levure. Dans ce système une protéine proie est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (DBD) la protéine de levure Gal4 qui se lie au UAS (*Upstream activating sequence*) du promoteur Gal en amont des gènes rapporteurs. D'autre part la protéine appât est fusionnée au domaine d'activation de Gal4 (AD). L'interaction entre les protéines appât et proie permet d'activer des gènes d'auxotrophie *HIS3* et *ADE2* permettant à la levure de pousser sur milieu sélectif sans histidine (His-) et sans adénine (Ade-). **B)** Résultats d'interaction entre TIP47 et les protéines virales dans le système double-hybride. La souche de levure AH109 a été cotransfectée par un vecteur codant pour la protéine TIP47 en fusion avec le domaine d'activation de Gal4 (AD) et des plasmides codant pour les protéines virales du VHC (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Les levures ont été cultivées sur milieu sélectif à 30°C pendant 5 jours. [T+] : Témoin positif d'interaction entre Core et NS5A (Goh et al., 2001). [T-] : Témoin négatif d'interaction. (-) : vecteur vide.

Cette interaction est aussi bien observée pour la protéine de la souche H77 (génotype 1a), que pour celle de la souche JFH1 (génotype 2a), ce qui indique qu'elle est conservée pour les différents génotypes (Figure 41). J'ai également, analysé l'interaction de deux mutants de TIP47 incapables de lier Rab9. Les résultats n'ont montré aucune différence avec ceux obtenus avec la protéine native, indiquant que le site de liaison de TIP47 à NS5A est différent de celui de Rab9 (Figure 41).

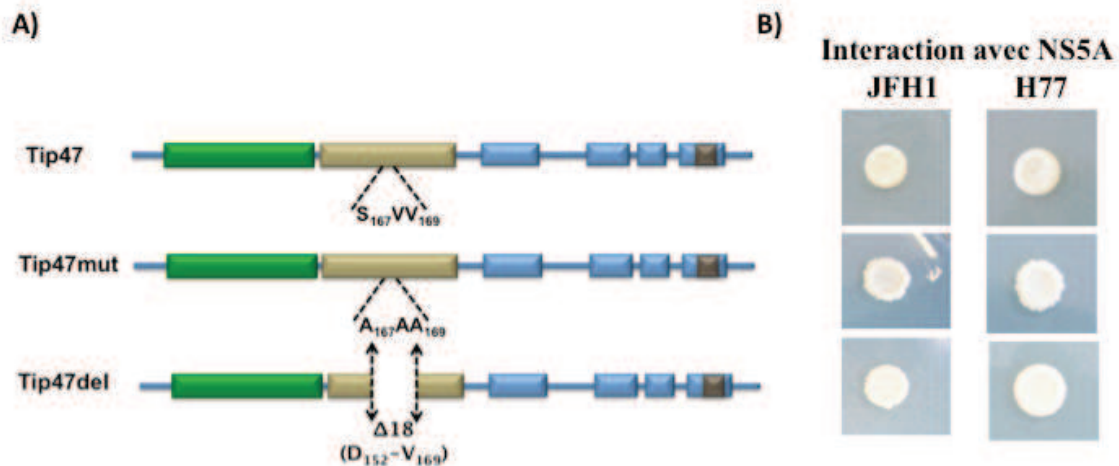


Figure 41. Le domaine de liaison à Rab9 n'est pas essentiel pour l'interaction de TIP47 avec NS5A.

A) Représentation schématique des mutants de TIP47 au niveau du domaine de liaison à Rab9. **B)** Résultats d'interaction des mutants TIP47 avec la protéine virale NS5A de la souche JFH1 (Génotype 2a) ou de la souche H77 (Génotype 1a). Tip47mut correspond à la protéine mutée au niveau de 3 résidus importants pour son interaction avec Rab9. Tip47del correspond à la protéine déléetée de toute la région d'interaction avec Rab9.

Afin de déterminer quelle région de TIP47 est impliquée dans son interaction avec NS5A, j'ai généré, par mutagenèse dirigée, différents mutants de délétion (Figure 42), que j'ai ensuite testé individuellement dans le système double-hybride. Les résultats obtenus montrent que le « *PAT domain* » de TIP47, qui correspond au 116 aa de la partie N-ter, est suffisant pour établir l'interaction avec NS5A. Des délétions supplémentaires ont révélé que la région aa 24-48 du *PAT domain* est primordiale pour cette interaction (Figure 42).

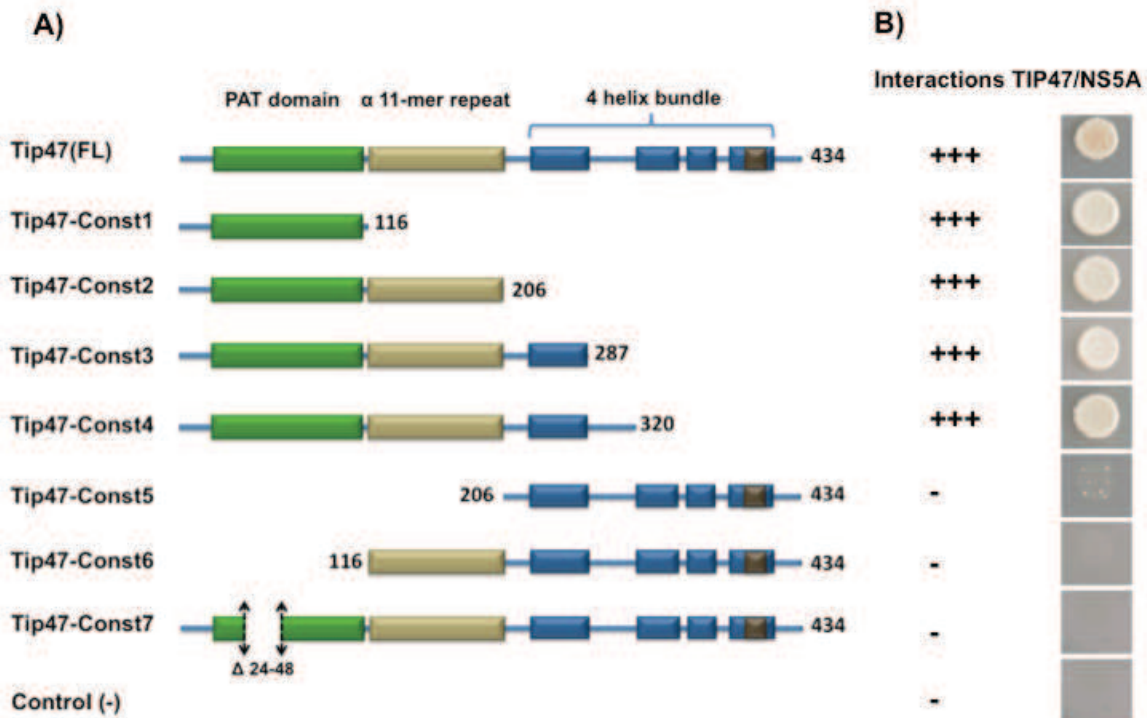


Figure 42. TIP47 interagit avec NS5A via son PAT domain.

A) Représentation schématique des différents mutants de délétion de TIP47. **B)** Résultats d'interactions entre NS5A et les différents mutants de Tip47 dans le système double hybride. Les levures ont été cotransfectées par des plasmides codant pour les différentes constructions de TIP47 en fusion avec le domaine d'activation de Gal4 (AD) et le plasmide codant pour la protéine virale NS5A (souche JFH1) en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Les levures ont été cultivées sur milieu sélectif à 30°C pendant 5 jours. (+) : interaction, (-) : pas d'interaction.

La même stratégie a été adoptée afin d'identifier les domaines de NS5A importants pour son interaction avec TIP47. J'ai établi différents mutants de délétion de NS5A que j'ai ensuite testé dans le système double hybride (Figure 43A). Alors que la délétion du domaine II de NS5A affaiblit considérablement l'interaction de cette protéine avec TIP47, la délétion du domaine I l'abolit complètement. En revanche, la délétion du domaine III ne semble pas avoir d'effet sur l'interaction (Figure 43B).

Outre TIP47, la protéine apoE joue également un rôle important dans le cycle du VHC en interagissant directement avec NS5A. En raison des similarités fonctionnelles et structurales que partagent ces deux protéines, nous avons également voulu déterminer quelle partie de NS5A est impliquée dans l'interaction avec apoE. Comme précédemment avec TIP47, nous avons testé les différents mutants de NS5A avec apoE dans le système double-hybride. Les résultats obtenus

sont strictement comparables à ceux de TIP47 (Figure 43C), indiquant que le domaine I de NS5A est essentiel à la fois pour interagir avec TIP47 et avec apoE.

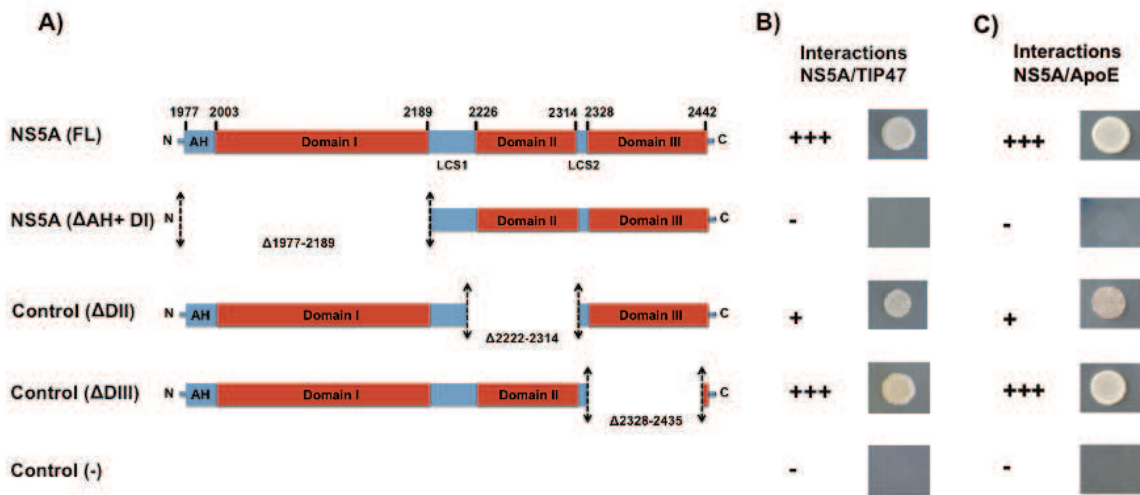


Figure 43. Le domaine I de NS5A est important pour l'interaction avec TIP47 et apoE.

A) Représentation schématique des différents mutants de délétion de NS5A. Résultats des interactions entre les mutants de NS5A et TIP47 (**B**) ou apoE (**C**). Les levures sont cotransfectées par un vecteur codant pour la protéine TIP47 ou apoE en fusion avec le domaine d'activation de Gal4 (AD) et des plasmides codant pour les différentes constructions de la protéine virale NS5A en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Les levures ont été cultivées sur milieu sélectif à 30°C pendant 5 jours. (+) : interaction, (-) : pas d'interaction.

Etant donné que l'interaction entre TIP47 et NS5A requiert le domaine I de NS5A, nous avons voulu savoir si un inhibiteur tel que le BMS-790052, actuellement connu sous le nom de Daclatasvir, pouvait l'abolir. En effet, cet inhibiteur puissant, qui est en phase III d'essais cliniques, se lierait précisément au domaine I de NS5A (Bartenschlager et al., 2013). Nos résultats montrent que l'interaction de TIP47 avec NS5A n'est pas affectée en présence du Daclatasvir même à des concentrations très élevées (Figure 44). Suggérant que le site de liaison de l'inhibiteur est probablement différent de celui qui est impliqué dans l'interaction avec TIP47.

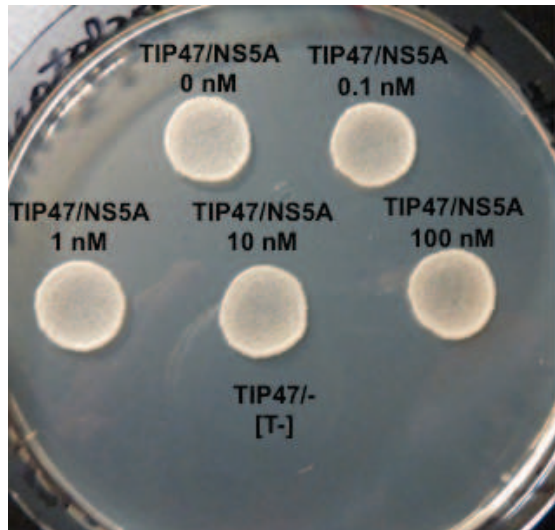


Figure 44. L'interaction entre TIP47 et NS5A n'est pas abolie en présence d'un inhibiteur de NS5A, le Daclatasvir.

Les levures sont co-transfectées par un vecteur codant pour la protéine TIP47 en fusion avec le domaine d'activation de Gal4 (AD) et un vecteur codant la protéine virale NS5A en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Les cellules cotransfectées sont cultivées pendant 24h dans du milieu Leu- Trp- additionné de concentrations croissantes de Daclatasvir (0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ou 100 nM) et 0,7% de DMSO. Une goutte de chaque culture est ensuite déposée sur des boîtes de milieu sélectif Trp- Leu- His- Ade- permettant de sélectionner les interactants.

2.3. Discussion - perspectives

Les résultats présentés dans cette deuxième partie et en Annexe II et III, suggèrent un nouveau rôle de la protéine TIP47 dans l'assemblage et l'export de particules virales infectieuses du VHC. En effet, nous avons montré que cette protéine interagit directement avec la protéine virale NS5A chargée en ARN génomique du VHC au niveau des LDs et que cette interaction est indispensable à la formation de nouveaux virions. De plus, les résultats montrent que TIP47 se trouve associée aux particules virales formées et que son interaction avec Rab9 est essentielle à leur export en dehors de la cellule hôte.

Rôle de TIP47 dans l'assemblage des virions

Comme pour d'autres virus à ARN (+), le VHC induit des altérations membranaires dans les hépatocytes conduisant à la formation du membranous web (MW). La protéine virale NS4B aidée par d'autres protéines non-structurales conduit à la formation d'invaginations dans la membrane du RE qui vont accueillir les sites de réplication de l'ARN viral (Gosert et al., 2003; Lohmann, 2013). L'assemblage des virions, quant à lui, a lieu dans des sites particuliers à l'interface entre les LDs et la membrane du RE (Lindenbach, 2013). La séparation physique entre les sites de réplication et les sites d'assemblage permet sans doute de réguler ces deux étapes distinctes du cycle viral. Cela se traduit par la localisation de la nucléocapside virale Core autour des LDs à distance des autres protéines virales qui restent associées à la membrane du RE, pour éviter, certainement, un assemblage précoce des virions (Lindenbach, 2013). Par sa double localisation à la fois au niveau des complexes de réplication et autour des LDs, la protéine virale NS5A semble faire le lien entre ces deux étapes. En effet, il a été proposé que NS5A se lie à l'ARN viral nouvellement synthétisé dans les sites de réplication et amène ensuite l'ARN vers les sites d'encapsidation au niveau des LDs où elle interagit directement avec la protéine Core (Miyanari et al., 2007).

Dans cette étude nous avons montré que TIP47 colocalise avec NS5A autour des LDs dans les cellules répliquantes. De plus les expériences de i-PCR et de co-immunoprécipitation ont révélé que l'ARN génomique du VHC pouvait être précipité

par des anticorps dirigés contre TIP47 ([Annexe II](#)). Finalement, grâce au système double hybride on a montré que TIP47 interagit directement avec NS5A.

Etant donné que TIP47, existe à la fois sous une forme libre dans le cytoplasme et sous une forme associée aux LDs, nous proposons que dans un premier temps la protéine cellulaire TIP47 s'associe à NS5A au niveau des sites de réplication, ensuite grâce à son affinité pour les LDs elle permet de transporter NS5A chargé de l'ARN viral néosynthétisé vers ces organites où elle pourra interagir avec Core pour lui délivrer l'ARN viral et enclencher son encapsidation ([Annexe II](#)). Ce scénario est d'autant plus probable, qu'il a été observé dans une étude protéomique comparative sur les LDs que la surexpression de la protéine virale Core dans des cellules hépatiques induit la translocation de TIP47 du cytoplasme vers les LDs ([Sato et al., 2006](#)).

En utilisant le système double hybride chez la levure, nous avons identifié le *PAT-domain* de TIP47 comme étant suffisant pour assurer l'interaction avec NS5A. De plus, nous avons montré que la délétion $\Delta 24-48$ dans le *PAT-domain* abolit complètement l'interaction TIP47-NS5A. L'utilisation de ces mutants dans un système de culture cellulaire a permis de confirmer l'importance de cette interaction pour la réplication virale ([Annexe II](#)). Il serait intéressant de tester un peptide dérivé de cette séquence en système HCVcc pour voir son impact sur le cycle viral.

D'autre part, nous avons montré que la partie N-terminale de NS5A est importante pour sa liaison avec TIP47, puisque la délétion de cette région abolit complètement l'interaction entre ces deux protéines. Ces résultats sont en accord avec les données d'une étude publiée récemment qui a également rapporté un rôle important de TIP47 dans le cycle du VHC ([Vogt et al., 2013](#)). Dans cette étude les auteurs ont réalisé un criblage double-hybride chez la levure en utilisant l'hélice AH de la partie N-terminale de NS5A comme appât et ont identifié TIP47 comme interagissant majeur.

Outre le VHC, des études antérieures ont également associé TIP47 dans la morphogénèse d'autres virus tels que le VIH, le virus de la dengue ou le virus de la vaccine. Dans les cellules infectées par le VIH, TIP47 permet d'incorporer la glycoprotéine d'enveloppe Env dans les virions nouvellement formés en se liant à la fois au domaine cytoplasmique de la protéine Env et au domaine MA de la protéine de matrice Gag ([Lopez-Vergès et al., 2006](#)). Pour ce qui est du virus de la dengue, il a été montré que TIP47 est nécessaire pour permettre l'association de la protéine C

de la capside aux LDs (Carvalho et al., 2012) qui sont indispensables pour l'assemblage des virions (Samsa et al., 2009). Quant au virus de la vaccine, il a été montré que la protéine virale p37 s'associe à TIP47 pour faciliter l'assemblage des formes extracellulaires du virus (Chen et al., 2009).

Rôle de TIP47 dans l'export des virions

En plus de son rôle dans l'assemblage, nos travaux montrent que TIP47 est également impliquée dans l'export de particules virales infectieuses (Annexe III). En effet, TIP47 colocalise avec les particules intracellulaires et fait partie intégrante des particules virales secrétées dans le milieu extracellulaire.

Le rôle de TIP47 dans l'export de particules virales est lié à sa fonction de protéine cargo et à sa capacité à lier son cofacteur Rab9, puisque l'utilisation de mutants TIP47 incapables de lier Rab9 (TIP47del ou TIP47mut) inhibe la sécrétion de particules virales infectieuses.

L'analyse des lysats cellulaires par western blot montre que dans les cellules exprimant les mutants TIP47 il y a moins de protéine virale Core.

Les études de microscopie confocale, ont permis de montrer que les mutants de TIP47 colocalisent avec la protéine Core au niveau de structures circulaires ouvertes dont la morphologie ainsi que la présence de marqueurs spécifiques (p62 et LAMP2) indiquent qu'il s'agit d'autophagosomes.

L'autophagie est un système de dégradation intracellulaire du contenu cytoplasmique. Après leur formation, les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes permettant aux hydrolases lysosomales de dégrader le contenu des autophagosomes (Xie and Klionsky, 2007). L'inhibition de la fonction des lysosomes par l'utilisation de bafilomycin ou du chlorure d'ammonium restore le niveau intracellulaire de la protéine Core (Annexe III).

Ainsi nous proposons un modèle dans lequel l'interaction de TIP47 avec Rab9 permet d'adresser les particules virales nouvellement formées vers la voie sécrétoire. En revanche, lorsque cette interaction est détruite, les particules virales sont détournées de la voie d'export normale vers les compartiments d'autophagosomes où elles seront dégradées.

Comparaisons entre TIP47 et apoE

Nos données attribuent un double rôle de TIP47 à la fois dans l'assemblage et dans la sécrétion de particules virales infectieuses. Au niveau de l'assemblage, TIP47 interagit directement avec NS5A pour permettre le transfert de l'ARN génomique depuis les sites de réplication vers les LDs où a lieu l'assemblage des virions. Au niveau de l'export, TIP47 associée aux particules virales formées, participe à leurs export en association avec la GTPase Rab9.

ApoE est un autre exemple de protéine cellulaire qui intervient à plusieurs niveaux du cycle viral du VHC. En effet, comme TIP47, apoE est également capable d'interagir avec NS5A. Elle est impliquée aussi bien dans l'assemblage que dans l'export de particules virales infectieuses (Benga et al., 2010) et elle est également retrouvée à la surface des particules virales secrétées (Merz et al., 2011). Bien que TIP47 et apoE soient localisées dans des compartiments distincts (le cytoplasme et le RE, respectivement), elles semblent partager des similarités structurales et fonctionnelles. En effet, les données cristallographiques ont révélé que le domaine N-terminal d'apoE et le domaine C-terminal de Tip47 montrent une grande homologie structurale qui consiste en un faisceau de quatre hélices α amphipathiques (Hickenbottom et al., 2004). Ce faisceau d'hélices s'ouvre pendant la liaison aux lipides pour permettre d'enchâsser les surfaces hydrophobes des hélices dans les chaînes acyles de la monocouche phospholipidique des lipoprotéines et des LDs, respectivement (Brasaemle, 2007; Bulankina et al., 2009). Les résultats du test double-hybride indiquent que NS5A se lie aussi bien à TIP47 qu'à apoE *via* sa partie N-terminale. Alors que l'hélice AH de NS5A semble être suffisante pour établir une interaction avec TIP47 (Vogt et al., 2013), le sous-domaine de NS5A impliqué dans l'interaction avec apoE reste encore inconnu. Il serait intéressant de voir si les sites de liaison d'apoE et TIP47 se chevauchent ou si, au contraire, ils sont bien distincts. Cela pourrait donner une idée sur la régulation des étapes de l'assemblage et de l'export aux quels participent ces deux protéines. En raison de sa localisation cytoplasmique TIP47 intervient probablement à un stade précoce de l'assemblage. ApoE interviendrait à un stade ultérieur, sans doute au moment du bourgeonnement des virions dans la lumière du RE. En revanche, comment expliquer que TIP47 s'associe aux virions produits ?

L'une des possibilités est que TIP47 soit transférée sur les virions lors de leur bourgeonnement dans la lumière du RE. En effet, cette étape pourrait être accompagnée du transfert des lipides depuis les LDs cytoplasmiques, contenant TIP47, vers les LuLDs chargés en apoE. Une autre possibilité, serait que TIP47 se dissocie des virions au moment de leur bourgeonnement dans le RE. En revanche, dans la lumière du RE ces virions vont s'associer aux LuLDs qui contiennent apoE et vont emprunter la voie sécrétoire pour être exportés, en passant par l'appareil de Golgi et l'endosome de recyclage (Coller et al., 2012). Au cours de ce transit, TIP47 s'associerait au corps lipidique de la LVP grâce à son domaine « *apoE-Like* » et participerait à son export en collaboration avec Rab9.

Par des expériences d'immunofluorescence il serait possible de déterminer la répartition de Tip47 et d'apoE dans les cellules infectées et voir leur co-localisation avec les protéines structurales du virus et des marqueurs de compartiments subcellulaires tel que les endosomes, l'appareil de Golgi,... pour pouvoir reconstituer la voie empruntée par le virus dans la cellule. Ces résultats pourront être confirmés par analyse biochimique des fractions subcellulaires après purification sur gradient de densité.

De telles expériences permettraient d'établir un schéma précis de la voie de synthèse des particules du VHC et ainsi de progresser dans la compréhension des étapes d'assemblage et de sécrétion de ce virus.

CONCLUSION GENERALE

Mon travail de thèse a abouti à une meilleure compréhension du rôle de deux protéines cellulaires importantes pour le cycle de développement du VHC.

Tout d'abord, nous avons montré que la protéine ribosomale RACK1 est spécifiquement requise pour la traduction IRES-dépendante du VHC et qu'elle n'est pas nécessaire à la traduction de la majorité des ARNm cellulaires. Nos résultats, confortent l'hypothèse du code du ribosome et désignent RACK1 comme un élément qui participe à la traduction spécialisée de certains transcrits.

Ensuite, concernant la protéine TIP47, nous avons montré que cette protéine avait un double rôle à la fois dans l'assemblage et dans la sécrétion de particules virales infectieuses. D'une part, TIP47 interagit avec NS5A autour des LDs pour permettre l'assemblage des virions. D'autre part, elle participe à l'export des particules virales grâce à sa fonction de protéine cargo et à sa capacité à lier son cofacteur Rab9.

Au delà du fait que ces deux protéines cellulaires pourraient servir de cibles thérapeutiques pour contenir l'infection par le VHC, ces travaux permettront sans doute d'ouvrir la voie à d'autres investigations, notamment sur le plan fonctionnel, afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent l'interaction intime qui existe entre le virus et son hôte.

REFERENCES

A

Adams, D.R., Ron, D., and Kiely, P.A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun. Signal* 9, 22.

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., and Zhang, Q.X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12766–12771.

Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol.* 69, 6367–6375.

Ali, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2249–2254.

Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V., and Popper, H. (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1, 459–463.

André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchet, C., Paranhos-Baccalà, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J. Virol.* 76, 6919–6928.

Anwar, A., Ali, N., Tanveer, R., and Siddiqui, A. (2000). Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J. Biol. Chem.* 275, 34231–34235.

Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4, e1000035.

B

Bai, Y., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2013). Hepatitis C virus 3'UTR regulates viral translation through direct interactions with the host translation machinery. *Nucleic Acids Res.* 41, 7861–7874.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687.

Bartenschlager, R., Cosset, F.-L., and Lohmann, V. (2010). Hepatitis C virus replication cycle. *J. Hepatol.* 53, 583–585.

Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* 19, 95–103.

Bartenschlager, R., Lohmann, V., and Penin, F. (2013). The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 482–496.

Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., et al. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *278*, 41003–41012.

Bartosch, B., Dubuisson, J., and 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., Bukh, J., Meunier, J.-C., Granier, C., Engle, R.E., Blackwelder, W.C., Emerson, S.U., Cosset, F.-L., and Purcell, R.H. (2003b). In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 14199–14204.

Battle, D.J., Kasim, M., Yong, J., Lotti, F., Lau, C.-K., Mouaikel, J., Zhang, Z., Han, K., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2006). The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *71*, 313–320.

Baum, S., Bittins, M., Frey, S., and Sedorf, M. (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem. J.* *380*, 823–830.

Bedard, K.M., Walter, B.L., and Semler, B.L. (2004). Multimerization of poly(rC) binding protein 2 is required for translation initiation mediated by a viral IRES. *RNA* *10*, 1266–1276.

Belon, C.A., and Frick, D.N. (2009). Helicase inhibitors as specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Future Virol* *4*, 277–293.

Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* *330*, 1203–1209.

Benga, W.J.A., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., et al. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* *51*, 43–53.

Beran, R.K.F., Lindenbach, B.D., and Pyle, A.M. (2009). The NS4A protein of hepatitis C virus promotes RNA-coupled ATP hydrolysis by the NS3 helicase. *J. Virol.* *83*, 3268–3275.

Berger, K.L., Kelly, S.M., Jordan, T.X., Tartell, M.A., and Randall, G. (2011a). 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.

Berger, K.L., Kelly, S.M., Jordan, T.X., Tartell, M.A., and Randall, G. (2011b). 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.

Besson, A., Wilson, T.L., and Yong, V.W. (2002). The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility. *J. Biol. Chem.* *277*, 22073–22084.

Bickel, P.E., Tansey, J.T., and Welte, M.A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta* *1791*, 419–440.

Billerbeck, E., De Jong, Y., Dorner, M., De la Fuente, C., and Ploss, A. (2013). Animal models for hepatitis C. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 49–86.

Binder, M., Quinkert, D., Bochkarova, O., Klein, R., Kezmic, N., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2007). Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras. *J. Virol.* *81*, 5270–5283.

Bissig, K.-D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J. Clin. Invest.* *120*, 924–930.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* *80*, 6964–6972.

Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* *76*, 13001–13014.

Bode, J.G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P.C., and Häussinger, D. (2003). IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J.* *17*, 488–490.

Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., Lewis, J.D., and Stark, H. (2005). Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* *13*, 1695–1706.

Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R., and 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., and 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., Montserret, R., Hope, R.G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* *281*, 22236–22247.

Boulant, S., Targett-Adams, P., and 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.

Bourd-Boittin, K., Le Pabic, H., Bonnier, D., L'Helgoualc'h, A., and Thérêt, N. (2008). RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 26000–26009.

Bradrick, S.S., Walters, R.W., and Gromeier, M. (2006). The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res.* *34*, 1293–1303.

Brady, M.T., MacDonald, A.J., Rowan, A.G., and Mills, K.H.G. (2003). Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. *Eur. J. Immunol.* *33*, 3448–3457.

Brasaemle, D.L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* *48*, 2547–2559.

Brenndörfer, E.D., Karthe, J., Frelin, L., Cebula, P., Erhardt, A., Schulte am Esch, J., Hengel, H., Bartenschlager, R., Sällberg, M., Häussinger, D., et al. (2009). Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* 49, 1810–1820.

Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A., and Francesco, R.D. (2002). Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides. *J. Virol.* 76, 3482–3492.

Brimacombe, C.L., Grove, J., Meredith, L.W., Hu, K., Syder, A.J., Flores, M.V., Timpe, J.M., Krieger, S.E., Baumert, T.F., Tellinghuisen, T.L., et al. (2011). Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* 85, 596–605.

Brocard, M., Paulous, S., Komarova, A.V., Deveaux, V., and Kean, K.M. (2007). Evidence that PTB does not stimulate HCV IRES-driven translation. *Virus Genes* 35, 5–15.

Buchkovich, N.J., Yu, Y., Pierciey, F.J., Jr, and Alwine, J.C. (2010). Human cytomegalovirus induces the endoplasmic reticulum chaperone BiP through increased transcription and activation of translation by using the BiP internal ribosome entry site. *J. Virol.* 84, 11479–11486.

Bukh, J. (2012). Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* 142, 1279–1287.e3.

Bulankina, A.V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J.G., Rudolph, M.G., Burger, K.N.J., and Höning, S. (2009). TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J. Cell Biol.* 185, 641–655.

Bung, C., Bochkava, Z., Terenin, I., Zinovkin, R., Shatsky, I.N., and Niepmann, M. (2010). Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett.* 584, 837–842.

C

Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J. Virol.* 76, 3720–3730.

Carvalho, F.A., Carneiro, F.A., Martins, I.C., Assunção-Miranda, I., Faustino, A.F., Pereira, R.M., Bozza, P.T., Castanho, M.A.R.B., Mohana-Borges, R., Da Poian, A.T., et al. (2012). Dengue virus capsid protein binding to hepatic lipid droplets (LD) is potassium ion dependent and is mediated by LD surface proteins. *J. Virol.* 86, 2096–2108.

Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., and Rice, C.M. (2013). Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9505–9510.

Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhäuser, N., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426, 579–584.

Chan, E.K., and Tan, E.M. (1989). Epitopic targets for autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1, 376–381.

Chandler, D.E., Penin, F., Schulten, K., and Chipot, C. (2012). The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002702.

Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z., and 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., Chantier, T., et al. (2008). Hepatitis C virus infection protein network. *Mol. Syst. Biol.* *4*, 230.

Chatterji, U., Bobardt, M., Selvarajah, S., Yang, F., Tang, H., Sakamoto, N., Vuagniaux, G., Parkinson, T., and Gallay, P. (2009). The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J. Biol. Chem.* *284*, 16998–17005.

Chen, H.-H., Chang, J.-G., Lu, R.-M., Peng, T.-Y., and Tarn, W.-Y. (2008). The RNA binding protein hnRNP Q modulates the utilization of exon 7 in the survival motor neuron 2 (SMN2) gene. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6929–6938.

Chen, M., Sällberg, M., Sönnernborg, A., Weiland, O., Mattsson, L., Jin, L., Birkett, A., Peterson, D., and Milich, D.R. (1999). Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* *116*, 135–143.

Chen, Y., Honeychurch, K.M., Yang, G., Byrd, C.M., Harver, C., Hruby, D.E., and Jordan, R. (2009). Vaccinia virus p37 interacts with host proteins associated with LE-derived transport vesicle biogenesis. *Viol. J.* *6*, 44.

Chevaliez, S. (2011). Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* *17*, 116–121.

Chevaliez, S., and Pawlotsky, J.-M. (2012). Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* *26*, 381–389.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* *244*, 359–362.

Christie, J.M., Healey, C.J., Watson, J., Wong, V.S., Duddridge, M., Snowden, N., Rosenberg, W.M., Fleming, K.A., Chapel, H., and Chapman, R.W. (1997). Clinical outcome of hypogammaglobulinaemic patients following outbreak of acute hepatitis C: 2 year follow up. *Clin. Exp. Immunol.* *110*, 4–8.

Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J.* *21*, 2893–2902.

Coelmont, L., Hanouille, X., Chatterji, U., Berger, C., Snoeck, J., Bobardt, M., Lim, P., Vliegen, I., Paeshuyse, J., Vuagniaux, G., et al. (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.

Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., and Randall, G. (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog.* *5*, e1000702.

Coller, K.E., Heaton, N.S., Berger, K.L., Cooper, J.D., Saunders, J.L., and Randall, G. (2012). Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* *8*, e1002466.

Conrad, K.D., and Niepmann, M. (2013). The role of microRNAs in hepatitis C virus RNA replication. *Arch. Virol.*

Costa-Mattioli, M., Svitkin, Y., and Sonenberg, N. (2004). La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 6861–6870.

Counihan, N.A., Rawlinson, S.M., and Lindenbach, B.D. (2011). Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog.* *7*, e1002302.

Craig, A.W., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Belsham, G.J., and Sonenberg, N. (1997). The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 163–169.

Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., et al. (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J. Exp. Med.* *195*, 35–41.

D

Da Costa, D., Turek, M., Felmlee, D.J., Girardi, E., Pfeffer, S., Long, G., Bartenschlager, R., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2012). Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J. Virol.* *86*, 11919–11925.

Dembélé, D., and Kastner, P. (2014). Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics* *15*, 14.

Díaz, E., and Pfeffer, S.R. (1998). TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* *93*, 433–443.

Díaz-Toledano, R., Ariza-Mateos, A., Birk, A., Martínez-García, B., and Gómez, J. (2009). In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res.* *37*, 5498–5510.

Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Andreev, D.E., Ivanov, P.A., Dunaevsky, J.E., Merrick, W.C., and Shatsky, I.N. (2010). GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J. Biol. Chem.* *285*, 26779–26787.

Dolganiuc, A., Chang, S., Kodys, K., Mandrekar, P., Bakis, G., Cormier, M., and Szabo, G. (2006). Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J. Immunol.* *177*, 6758–6768.

Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., et al. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* *474*, 208–211.

E

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and 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., and Glenn, J.S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J. Virol.* *78*, 11288–11295.

Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* *3*, 87–98.

Etchison, D., Milburn, S.C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* *257*, 14806–14810.

Evans, M.J., Rice, C.M., and Goff, S.P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 13038–13043.

Evans, M.J., Von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* *446*, 801–805.

F

Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.

Fafi-Kremer, S., Fauvelle, C., Felmlee, D.J., Zeisel, M.B., Lepiller, Q., Fofana, I., Heydmann, L., Stoll-Keller, F., and Baumert, T.F. (2012). Neutralizing antibodies and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Viruses* *4*, 2016–2030.

Fang, J.W., and Moyer, R.W. (2000). The effects of the conserved extreme 3' end sequence of hepatitis C virus (HCV) RNA on the in vitro stabilization and translation of the HCV RNA genome. *J. Hepatol.* *33*, 632–639.

Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *PNAS* *93*, 15394–15399.

Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., and Holland, P.V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* *292*, 767–770.

Felmlee, D.J., Hafirassou, M.L., Lefevre, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2013). Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses* *5*, 1292–1324.

Ferraris, P., Blanchard, E., and Roingeard, P. (2010). Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J. Gen. Virol.* *91*, 2230–2237.

Filipovska, A., and Rackham, O. (2013). Specialization from synthesis: how ribosome diversity can customize protein function. *FEBS Lett.* *587*, 1189–1197.

Floreani, A. (2013). Hepatitis C and pregnancy. *World J. Gastroenterol.* *19*, 6714–6720.

Fofana, I., Krieger, S.E., Grunert, F., Glaubien, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., Mee, C.J., et al. (2010). Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* *139*, 953–964, 964.e1–4.

Fofana, I., Fafi-Kremer, S., Carolla, P., Fauvelle, C., Zahid, M.N., Turek, M., Heydmann, L., Cury, K., Hayer, J., Combet, C., et al. (2012). Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology* *143*, 223–233.e9.

Fontanes, V., Raychaudhuri, S., and Dasgupta, A. (2009). A cell-permeable peptide inhibits hepatitis C virus replication by sequestering IRES transacting factors. *Virology* 394, 82–90.

Fraser, C.S., Hershey, J.W.B., and Doudna, J.A. (2009). The pathway of hepatitis C virus mRNA recruitment to the human ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 397–404.

Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J. Virol.* 76, 5326–5338.

Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* 75, 12047–12057.

Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P., and Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J. Virol.* 79, 380–392.

Fukushi, S., Katayama, K., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Ando, T., and Oya, A. (1994). Complete 5' Noncoding Region Is Necessary for the Efficient Internal Initiation of Hepatitis C Virus RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199, 425–432.

G

Gale, M.J., Jr, Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230, 217–227.

Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M.M.C. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J. Virol.* 78, 3480–3488.

Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., and Olson, W.C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4498–4503.

Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* 82, 2120–2129.

Gastaminza, P., Dryden, K.A., Boyd, B., Wood, M.R., Law, M., Yeager, M., and Chisari, F.V. (2010). Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J. Virol.* 84, 10999–11009.

Gawlik, K., and Gallay, P.A. (2014). HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunol. Res.*

Gerbasi, V.R., Weaver, C.M., Hill, S., Friedman, D.B., and Link, A.J. (2004). Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8276–8287.

Ghosn, J., Leruez-Ville, M., and Chaix, M.-L. (2005). [Sexual transmission of hepatitis C virus]. *Presse Med* 34, 1034–1038.

Gibson, T.J. (2012). RACK1 research - ships passing in the night? *FEBS Lett.* *586*, 2787–2789.

Gingras, A.C., Svitkin, Y., Belsham, G.J., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 5578–5583.

Goergen, D., and Niepmann, M. (2012). Stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA-122 occurs under different conditions in vivo and in vitro. *Virus Res.* *167*, 343–352.

Goh, P.Y., Tan, Y.J., Lim, S.P., Lim, S.G., Tan, Y.H., and Hong, W.J. (2001). The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* *290*, 224–236.

Gosert, R., Chang, K.H., Rijnbrand, R., Yi, M., Sangar, D.V., and Lemon, S.M. (2000). Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites In vivo. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1583–1595.

Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* *77*, 5487–5492.

Gottwein, J.M., and Bukh, J. (2008). Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. *Adv. Virus Res.* *71*, 51–133.

Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruyschaert, J.-M., Diesis, E., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2009a). Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J. Virol.* *83*, 6257–6268.

Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F., and Moradpour, D. (2009b). An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. *J. Virol.* *83*, 11378–11384.

Gouttenoire, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2010). Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev. Med. Virol.* *20*, 117–129.

Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 10583–10587.

Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.-H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. (2003). HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* *302*, 659–662.

Gratacós, F.M., and Brewer, G. (2010). The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *1*, 457–473.

Grompe, M., al-Dhalimy, M., Finegold, M., Ou, C.N., Burlingame, T., Kennaway, N.G., and Soriano, P. (1993). Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev.* *7*, 2298–2307.

Groppe, R., and Palmenberg, A.C. (2007). Cardiovirus 2A protein associates with 40S but not 80S ribosome subunits during infection. *J. Virol.* *81*, 13067–13074.

H

Hahm, B., Cho, O.H., Kim, J.E., Kim, Y.K., Kim, J.H., Oh, Y.L., and Jang, S.K. (1998a). Polypyrimidine tract-binding protein interacts with HnRNP L. *FEBS Lett.* *425*, 401–406.

Hahm, B., Kim, Y.K., Kim, J.H., Kim, T.Y., and Jang, S.K. (1998b). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* *72*, 8782–8788.

Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M.M.C., Miyamura, T., et al. (2005). Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* *79*, 13473–13482.

Han, Q., Manna, D., Belton, K., Cole, R., and Konan, K.V. (2013). Modulation of hepatitis C virus genome encapsidation by nonstructural protein 4B. *J. Virol.* *87*, 7409–7422.

Hashem, Y., Des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H.Y., Grassucci, R.A., Pestova, T.V., Hellen, C.U.T., and Frank, J. (2013). Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature*.

Haudecoeur, R., Peuchmaur, M., Ahmed-Belkacem, A., Pawlotsky, J.-M., and Boumendjel, A. (2013). Structure-activity relationships in the development of allosteric hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: ten years of research. *Med Res Rev* *33*, 934–984.

Hellen, C.U.T. (2009). IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim. Biophys. Acta* *1789*, 558–570.

Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* *27*, 3300–3310.

Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., Jr, and Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.* *16*, 1295–1298.

Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* *6*, 425–456.

Herod, M.R., Jones, D.M., McLauchlan, J., and McCormick, C.J. (2012). Increasing rate of cleavage at boundary between non-structural proteins 4B and 5A inhibits replication of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* *287*, 568–580.

Hickenbottom, S.J., Kimmel, A.R., Londos, C., and Hurley, J.H. (2004). Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure* *12*, 1199–1207.

Honda, M., Brown, E.A., and Lemon, S.M. (1996). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* *2*, 955–968.

Hong, Z., Cameron, C.E., Walker, M.P., Castro, C., Yao, N., Lau, J.Y., and Zhong, W. (2001). A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* *285*, 6–11.

Horner, S.M., and Gale, M., Jr (2013). Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat. Med.* *19*, 879–888.

Houghton, M. (2009). The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J. Hepatol.* *51*, 939–948.

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 7271–7276.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* *4*, 44–57.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* *37*, 1–13.

Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr, and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 5848–5853.

Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R.S., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., and Cameron, C.E. (2005). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* *280*, 36417–36428.

Hung, L.-H., Heiner, M., Hui, J., Schreiner, S., Benes, V., and Bindereif, A. (2008). Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: a combined microarray and RNAi analysis. *RNA* *14*, 284–296.

Hwang, B., Lim, J.H., Hahm, B., Jang, S.K., and Lee, S.-W. (2009). hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *378*, 584–588.

I

Imbert, I., Dimitrova, M., Kien, F., Kieny, M.P., and Schuster, C. (2003). Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* *84*, 1549–1557.

Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K., and Shimoda, S. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* *31*, 399–409.

Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C.W., Weinlich, S., Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., and Behrens, S.-E. (2007). Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA* *13*, 1675–1692.

Ito, T., and Lai, M.M. (1999). An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* *254*, 288–296.

Ito, T., Tahara, S.M., and Lai, M.M. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* *72*, 8789–8796.

J

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 113–127.

Jacobson, I.M., Gordon, S.C., Kowdley, K.V., Yoshida, E.M., Rodriguez-Torres, M., Sulkowski, M.S., Shiffman, M.L., Lawitz, E., Everson, G., Bennett, M., et al. (2013).

Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *N. Engl. J. Med.* 368, 1867–1877.

Jang, S.K., Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* 62, 2636–2643.

Jangra, R.K., Yi, M., and Lemon, S.M. (2010). Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J. Virol.* 84, 6615–6625.

Jannot, G., Bajan, S., Giguère, N.J., Bouasker, S., Banville, I.H., Piquet, S., Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2011). The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO Rep.* 12, 581–586.

Jiang, J., and Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J. Virol.* 83, 12680–12691.

Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and 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., and Rice, C.M. (2007). Hepatitis C Virus p7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus. *J. Virol.* 81, 8374–8383.

Jones, D.M., Patel, A.H., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2009). The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J. Virol.* 83, 2163–2177.

Jopling, C. (2012). Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol* 9, 137–142.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.

K

Kadrmas, J.L., Smith, M.A., Pronovost, S.M., and Beckerle, M.C. (2007). Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. *Dev. Dyn.* 236, 2207–2215.

Kafasla, P., Mickleburgh, I., Llorian, M., Coelho, M., Gooding, C., Cherny, D., Joshi, A., Kotik-Kogan, O., Curry, S., Eperon, I.C., et al. (2012). Defining the roles and interactions of PTB. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 815–820.

Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., and Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* 64, 334–339.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125, 1808–1817.

Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lopez, M.Z., Lohmann, V., Luban, J., et al. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C

virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog.* 5, e1000546.

Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D. (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214–220.

Khan, A.G., Whidby, J., Miller, M.T., Scarborough, H., Zatorski, A.V., Cygan, A., Price, A.A., Yost, S.A., Bohannon, C.D., Jacob, J., et al. (2014). Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature*.

Khusial, P., Plaag, R., and Zieve, G.W. (2005). LSM proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. *Trends Biochem. Sci.* 30, 522–528.

Kieft, J.S. (2008). Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem. Sci.* 33, 274–283.

Kieft, J., and Martinez-Salas, E. (2009). Preface: functionally critical RNA structures found in positive-sense RNA viruses. *Virus Res.* 139, 135–136.

Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., and Doudna, J.A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7, 194–206.

Kiely, P.A., O’Gorman, D., Luong, K., Ron, D., and O’Connor, R. (2006). Insulin-like growth factor I controls a mutually exclusive association of RACK1 with protein phosphatase 2A and beta1 integrin to promote cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4041–4051.

Kiely, P.A., Baillie, G.S., Lynch, M.J., Houslay, M.D., and O’Connor, R. (2008). Tyrosine 302 in RACK1 is essential for insulin-like growth factor-I-mediated competitive binding of PP2A and beta1 integrin and for tumor cell proliferation and migration. *J. Biol. Chem.* 283, 22952–22961.

Kim, J.H., Paek, K.Y., Ha, S.H., Cho, S., Choi, K., Kim, C.S., Ryu, S.H., and Jang, S.K. (2004). A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7878–7890.

Kim, J.H., Park, S.M., Park, J.H., Keum, S.J., and Jang, S.K. (2011a). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J.* 30, 2454–2464.

Kim, M., Ha, Y., and Park, H.-J. (2006). Structural requirements for assembly and homotypic interactions of the hepatitis C virus core protein. *Virus Res.* 122, 137–143.

Kim, S., Welsch, C., Yi, M., and Lemon, S.M. (2011b). Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. *J. Virol.* 85, 6645–6656.

Kohler, J.J., Nettles, J.H., Amblard, F., Hurwitz, S.J., Bassit, L., Stanton, R.A., Ehteshami, M., and Schinazi, R.F. (2014). Approaches to hepatitis C treatment and cure using NS5A inhibitors. *Infect Drug Resist* 7, 41–56.

Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., and 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.

Komar, A.A., and Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10, 229–240.

Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383–397.

Kong, L.K., and Sarnow, P. (2002). Cytoplasmic expression of mRNAs containing the internal ribosome entry site and 3' noncoding region of hepatitis C virus: effects of the 3' leader on mRNA translation and mRNA stability. *J. Virol.* *76*, 12457–12462.

Kong, L., Giang, E., Nieuwma, T., Kadam, R.U., Cogburn, K.E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Ward, A.B., et al. (2013). Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* *342*, 1090–1094.

Kouba, T., Rutkai, E., Karásková, M., and Valášek, L.S. (2012). The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res.* *40*, 2683–2699.

Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* *80*, 5308–5320.

Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* *266*, 19867–19870.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs”. *Nature* *438*, 685–689.

L

Lan, K.-H., Lan, K.-L., Lee, W.-P., Sheu, M.-L., Chen, M.-Y., Lee, Y.-L., Yen, S.-H., Chang, F.-Y., and Lee, S.-D. (2007). HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *J. Hepatol.* *46*, 759–767.

Landry, D.M., Hertz, M.I., and Thompson, S.R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRES. *Genes Dev.* *23*, 2753–2764.

Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., and Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* *327*, 198–201.

Lavanchy, D. (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver International* *29*, 74–81.

Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin. Microbiol. Infect.* *17*, 107–115.

Lee, A.S.-Y., Burdeinick-Kerr, R., and Whelan, S.P.J. (2013). A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 324–329.

Lee, K.-H., Woo, K.-C., Kim, D.-Y., Kim, T.-D., Shin, J., Park, S.M., Jang, S.K., and Kim, K.-T. (2012). Rhythmic interaction between Period1 mRNA and hnRNP Q leads to circadian time-dependent translation. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 717–728.

Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr, and Lemon, S.M. (2005a). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 2992–2997.

Li, X.-D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2005b). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 17717–17722.

Li, Y., Masaki, T., Yamane, D., McGivern, D.R., and Lemon, S.M. (2013). Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 1881–1886.

Liang, T.J., and Ghany, M.G. (2013). Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1907–1917.

Lin, W., Kim, S.S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Kim, K.A., Holtzman, M.J., and Chung, R.T. (2006). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J. Virol.* *80*, 9226–9235.

Lindenbach, B.D. (2013). Virion assembly and release. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 199–218.

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., McKeating, J.A., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* *309*, 623–626.

Lindenbach, B.D., Prágai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K.F., Pyle, A.M., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J. Virol.* *81*, 8905–8918.

Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., and Yates, J.R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotech* *17*, 676–682.

Liu, Z., Yang, F., Robotham, J.M., and Tang, H. (2009). Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex. *J. Virol.* *83*, 6554–6565.

Locker, N., Easton, L.E., and Lukavsky, P.J. (2007). HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J.* *26*, 795–805.

Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 10149–10154.

Lohmann, V. (2013). Hepatitis C virus RNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 167–198.

Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J.O., and Bartenschlager, R. (1998). Biochemical and kinetic analyses of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Virology* *249*, 108–118.

Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* *285*, 110–113.

Lopez-Vergès, S., Camus, G., Blot, G., Beauvoir, R., Benarous, R., and Berlioz-Torrent, C. (2006). Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 14947–14952.

Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., and Rice, C.M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* *442*, 831–835.

Love, R.A., Brodsky, O., Hickey, M.J., Wells, P.A., and Cronin, C.N. (2009). Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. *J. Virol.* *83*, 4395–4403.

Lozach, P.-Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.-L., and Altmeyer, R. (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J. Biol. Chem.* *279*, 32035–32045.

Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Jr, Dwek, R.A., Biggin, P.C., Vénien-Bryan, C., and Zitzmann, N. (2009). The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 12712–12716.

Lukavsky, P.J. (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* *139*, 166–171.

Luo, G., Hamatake, R.K., Mathis, D.M., Racela, J., Rigat, K.L., Lemm, J., and Colonno, R.J. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* *74*, 851–863.

Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (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., Felmlee, D.J., and Baumert, T.F. (2012). Cholesterol uptake and hepatitis C virus entry. *J. Hepatol.* *57*, 215–217.

Lyons, A.J., and Robertson, H.D. (2003). Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet. *J. Biol. Chem.* *278*, 26844–26850.

M

Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011). Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J. Virol.* *85*, 86–97.

Maasoumy, B., and Wedemeyer, H. (2012). Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* *26*, 401–412.

Machlin, E.S., Sarnow, P., and Sagan, S.M. (2011). Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 3193–3198.

Makeyev, A.V., and Lieberhaber, S.A. (2002). The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA* *8*, 265–278.

Mamidipudi, V., Zhang, J., Lee, K.C., and Cartwright, C.A. (2004a). RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 6788–6798.

Mamidipudi, V., Chang, B.Y., Harte, R.A., Lee, K.C., and Cartwright, C.A. (2004b). RACK1 inhibits the serum- and anchorage-independent growth of v-Src transformed cells. *FEBS Lett.* *567*, 321–326.

Maraia, R.J., and Lamichhane, T.N. (2011). 3' processing of eukaryotic precursor tRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *2*, 362–375.

Martínez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., and Fernandez, N. (2008). New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 89, 611–626.

Martino, L., Pennell, S., Kelly, G., Bui, T.T.T., Kotik-Kogan, O., Smerdon, S.J., Drake, A.F., Curry, S., and Conte, M.R. (2012). Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. *Nucleic Acids Res.* 40, 1381–1394.

Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., et al. (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.

Matsson, H., Davey, E.J., Draptchinskaja, N., Hamaguchi, I., Ooka, A., Levéen, P., Forsberg, E., Karlsson, S., and Dahl, N. (2004). Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4032–4037.

Mauro, V.P., and Edelman, G.M. (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12031–12036.

McCaffrey, K., Gouklani, H., Boo, I., Pountourios, P., and Drummer, H.E. (2011). The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *J. Gen. Virol.* 92, 112–121.

McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* 21, 3980–3988.

McPhee, F., Hernandez, D., Yu, F., Ueland, J., Monikowski, A., Carifa, A., Falk, P., Wang, C., Fridell, R., Eley, T., et al. (2013). Resistance analysis of hepatitis C virus genotype 1 prior treatment null responders receiving daclatasvir and asunaprevir. *Hepatology* 58, 902–911.

Meerovitch, K., Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1989). A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes Dev.* 3, 1026–1034.

Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2012). MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog.* 8, e1002829.

Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., et al. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* 7, 927–933.

Merz, A., Long, G., Hiet, M.-S., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J. Biol. Chem.* 286, 3018–3032.

Meuleman, P., and Leroux-Roels, G. (2009). HCV animal models: a journey of more than 30 years. *Viruses* 1, 222–240.

Miller, S., and Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 363–374.

Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1089–1097.

Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., and Wiersma, S.T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* *57*, 1333–1342.

Moradpour, D., and Penin, F. (2013). Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 113–142.

Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lohmann, V. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* *78*, 13278–13284.

Moraes, K.C.M., Quaresma, A.J.C., Maehnss, K., and Kobarg, J. (2003). Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D). *Biol. Chem.* *384*, 25–37.

Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., and Moradpour, D. (2011). Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* *18*, 305–315.

Mosley, J.W., Operskalski, E.A., Tobler, L.H., Andrews, W.W., Phelps, B., Dockter, J., Giachetti, C., and Busch, M.P. (2005). Viral and host factors in early hepatitis C virus infection. *Hepatology* *42*, 86–92.

Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J.* *20*, 5443–5452.

Myasnikov, A.G., Simonetti, A., Marzi, S., and Klaholz, B.P. (2009). Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 300–309.

N

Nadal, A., Martell, M., Lytle, J.R., Lyons, A.J., Robertson, H.D., Cabot, B., Esteban, J.I., Esteban, R., Guardia, J., and Gómez, J. (2002). Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. *J. Biol. Chem.* *277*, 30606–30613.

Nagai, K., Oubridge, C., Ito, N., Avis, J., and Evans, P. (1995). The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 235–240.

Nasheri, N., Singaravelu, R., Goodmurphy, M., Lyn, R.K., and Pezacki, J.P. (2011). Competing roles of microRNA-122 recognition elements in hepatitis C virus RNA. *Virology* *410*, 336–344.

Nathan, C. (2012). Fresh approaches to anti-infective therapies. *Sci Transl Med* *4*, 140sr2.

Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L., and 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.

Neumann-Haefelin, C., and Thimme, R. (2013). Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 243–262.

Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumeechockchai, W., and 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.

Niepmann, M. (2009). Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim. Biophys. Acta* *1789*, 529–541.

Niepmann, M. (2013). Hepatitis C virus RNA translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 143–166.

Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep.* *5*, 1137–1141.

Nishimura, T., Saito, M., Takano, T., Nomoto, A., Kohara, M., and Tsukiyama-Kohara, K. (2008). Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* *31*, 435–448.

O

Oh, J.W., Ito, T., and Lai, M.M. (1999). A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J. Virol.* *73*, 7694–7702.

Otsuka, M., Takata, A., Yoshikawa, T., Kojima, K., Kishikawa, T., Shibata, C., Takekawa, M., Yoshida, H., Omata, M., and Koike, K. (2011). Receptor for activated protein kinase C: requirement for efficient microRNA function and reduced expression in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* *6*, e24359.

Otto, G.A., and Puglisi, J.D. (2004). The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* *119*, 369–380.

P

Pacheco, A., López de Quinto, S., Ramajo, J., Fernández, N., and Martínez-Salas, E. (2009). A novel role for Gemin5 in mRNA translation. *Nucleic Acids Res.* *37*, 582–590.

Paek, K.Y., Kim, C.S., Park, S.M., Kim, J.H., and Jang, S.K. (2008). RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* *82*, 12082–12093.

Paredes, A.M., and Blight, K.J. (2008). A genetic interaction between hepatitis C virus NS4B and NS3 is important for RNA replication. *J. Virol.* *82*, 10671–10683.

Park, H.-G., Yoon, J.-Y., and Choi, M. (2007). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D/AUF1 interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J. Biosci.* *32*, 1263–1272.

Park, S.M., Paek, K.Y., Hong, K.Y., Jang, C.J., Cho, S., Park, J.H., Kim, J.H., Jan, E., and Jang, S.K. (2011). Translation-competent 48S complex formation on HCV IRES requires the RNA-binding protein NSAP1. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7791–7802.

Pawlotsky, J.-M. (2013). Treatment of chronic hepatitis C: current and future. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 321–342.

Pawlotsky, J.-M. (2014). What are the pros and cons of the use of host-targeted agents against hepatitis C? *Antiviral Res.* *105*, 22–25.

Pawlotsky, J.-M. *New Hepatitis C Therapies: The Toolbox, Strategies, And Challenges.* Gastroenterology.

Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320–325.

Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.O., Deléage, G., and Pawlotsky, J.M. (2001). Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J. Virol.* 75, 5703–5710.

Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* 279, 40835–40843.

Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., et al. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6025–6030.

Pestova, T.V., Borukhov, S.I., and Hellen, C.U. (1998a). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394, 854–859.

Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., and Hellen, C.U. (1998b). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12, 67–83.

Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., and Hellen, C.U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332–335.

Pestova, T.V., De Breyne, S., Pisarev, A.V., Abaeva, I.S., and Hellen, C.U.T. (2008). eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *EMBO J.* 27, 1060–1072.

Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., and Schweizer, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.* 41, 44.

Petz, M., Them, N., Huber, H., Beug, H., and Mikulits, W. (2012). La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* 40, 290–302.

Phan, T., Beran, R.K.F., Peters, C., Lorenz, I.C., and 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.

Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., and Bartenschlager, R. (2001). Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J. Virol.* 75, 1252–1264.

Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and 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., Cosset, F.-L., et al. (2006). Construction and

characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 7408–7413.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* *282*, 938–941.

Pisarev, A.V., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* *131*, 286–299.

Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2008). Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* *135*, 1237–1250.

Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., De Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* *457*, 882–886.

Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* *77*, 4070–4080.

Polyak, S.J., Khabar, K.S., Paschal, D.M., Ezelle, H.J., Duverlie, G., Barber, G.N., Levy, D.E., Mukaida, N., and Gretch, D.R. (2001). Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* *75*, 6095–6106.

Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Héliot, L., Rouillé, Y., et al. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.* *7*, e1001278.

Powdrill, M.H., Tchesnokov, E.P., Kozak, R.A., Russell, R.S., Martin, R., Svarovskaia, E.S., Mo, H., Kouyos, R.D., and Götte, M. (2011). Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 20509–20513.

R

Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* *331*, 730–736.

Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J. Clin. Invest.* *119*, 1745–1754.

Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (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.

Robert, F., Kapp, L.D., Khan, S.N., Acker, M.G., Kolitz, S., Kazemi, S., Kaufman, R.J., Merrick, W.C., Koromilas, A.E., Lorsch, J.R., et al. (2006). Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4632–4644.

Roberts, A.P.E., Lewis, A.P., and Jopling, C.L. (2011). miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7716–7729.

Romanelli, M.G., Diani, E., and Lievens, P.M.-J. (2013). New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *Int J Mol Sci* *14*, 22906–22932.

Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., et al. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* *8*, e1003056.

Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 839–843.

Ron, D., Jiang, Z., Yao, L., Vagts, A., Diamond, I., and Gordon, A. (1999). Coordinated movement of RACK1 with activated betaIPKC. *J. Biol. Chem.* *274*, 27039–27046.

Rosenfeld, A.B., and Racaniello, V.R. (2005). Hepatitis C virus internal ribosome entry site-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae* is independent of polypyrimidine tract-binding protein, poly(rC)-binding protein 2, and La protein. *J. Virol.* *79*, 10126–10137.

Rowan, A.G., Fletcher, J.M., Ryan, E.J., Moran, B., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., and Mills, K.H.G. (2008). Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. *J. Immunol.* *181*, 4485–4494.

Rushbrook, S.M., Ward, S.M., Unitt, E., Vowler, S.L., Lucas, M., Klenerman, P., and Alexander, G.J.M. (2005). Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J. Virol.* *79*, 7852–7859.

S

Sainz, B., Jr, Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., et al. (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.

Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., and Gamarnik, A.V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* *5*, e1000632.

Santolini, E., Migliaccio, G., and La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* *68*, 3631–3641.

Sarrazin, C., Hézode, C., Zeuzem, S., and Pawlotsky, J.-M. (2012). Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* *56 Suppl 1*, S88–100.

Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., and Nishijima, M. (2006). Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J. Biochem.* *139*, 921–930.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* *21*, 5017–5025.

Scheel, T.K.H., and Rice, C.M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* *19*, 837–849.

Scheller, N., Mina, L.B., Galão, R.P., Chari, A., Giménez-Barcons, M., Noueiry, A., Fischer, U., Meyerhans, A., and Díez, J. (2009). Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 13517–13522.

Schoggins, J.W., and Rice, C.M. (2013). Innate immune responses to hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 219–242.

Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F., and Tautz, N. (2009). Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 5342–5347.

Schreiber, G.B., Busch, M.P., Kleinman, S.H., and Korelitz, J.J. (1996). The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N. Engl. J. Med.* *334*, 1685–1690.

Schuster, C., Isel, C., Imbert, I., Ehresmann, C., Marquet, R., and Kieny, M.P. (2002). Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA. *J. Virol.* *76*, 8058–8068.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M.T., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 957–962.

Shiina, M., and Rehmann, B. (2008). Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology* *47*, 385–395.

Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y.Y., Kaneko, S., Shimotohno, K., and Murakami, S. (2004). Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* *78*, 2738–2748.

Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R.K., Kempf, B.J., Spaniel, C., Barton, D.J., and Lemon, S.M. (2012). Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 941–946.

Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002). Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* *277*, 11149–11155.

Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* *197*, 1645–1655.

Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev. Cell* *18*, 175–189.

Simister, P., Schmitt, M., Geitmann, M., Wicht, O., Danielson, U.H., Klein, R., Bressanelli, S., and Lohmann, V. (2009). Structural and Functional Analysis of Hepatitis C Virus Strain JFH1 Polymerase. *J. Virol.* *83*, 11926–11939.

Simmonds, P. (2013). The origin of hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 1–15.

Siridechadilok, B., Fraser, C.S., Hall, R.J., Doudna, J.A., and Nogales, E. (2005). Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* *310*, 1513–1515.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731–745.

Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J. Virol.* 80, 11579–11588.

Spain, M., Janssen, H.L.A., and Boonstra, A. (2012). Immunology of hepatitis C virus infections. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26, 391–400.

Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. *Science* 291, 1959–1962.

Spahn, C.M.T., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R.A., Sarnow, P., and Frank, J. (2004). Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* 118, 465–475.

Stapleford, K.A., and Lindenbach, B.D. (2011). Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J. Virol.* 85, 1706–1717.

Steenbergen, R.H.G., Joyce, M.A., Lund, G., Lewis, J., Chen, R., Barsby, N., Douglas, D., Zhu, L.F., Tyrrell, D.L., Tyrrell, D.L.J., et al. (2010). Lipoprotein profiles in SCID/uPA mice transplanted with human hepatocytes become human-like and correlate with HCV infection success. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G844–854.

Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* 2, 2078–2095.

Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2013). Cell culture systems for hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 369, 17–48.

Sumpter, R., Jr, Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M., Jr (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79, 2689–2699.

Syed, G.H., Amako, Y., and Siddiqui, A. (2010). Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 33–40.

T

Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., and Lai, M.M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285, 107–110.

Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 48576–48587.

Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374–379.

Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* 4, e1000032.

Terenin, I.M., Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., and Shatsky, I.N. (2008). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 836–841.

Thomas, D.L. (2013). Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat. Med.* *19*, 850–858.

Timpe, J.M., Stamatakis, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M.J., Harris, H.J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G.L., Balfe, P., et al. (2008). Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* *47*, 17–24.

Tischendorf, J.J.W., Beger, C., Korf, M., Manns, M.P., and Krüger, M. (2004). Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) inhibits Hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation, but does not affect HCV replication. *Arch. Virol.* *149*, 1955–1970.

Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2011). Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* *145*, 333–334.

Tsai, B.P., Wang, X., Huang, L., and Waterman, M.L. (2011). Quantitative profiling of in vivo-assembled RNA-protein complexes using a novel integrated proteomic approach. *Mol. Cell Proteomics* *10*, M110.007385.

V

Vanwolleghem, T., Libbrecht, L., Hansen, B.E., Desombere, I., Roskams, T., Meuleman, P., and Leroux-Roels, G. (2010). Factors determining successful engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice. *J. Hepatol.* *53*, 468–476.

Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccalà, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P., and Bartenschlager, R. (2008). Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J. Virol.* *82*, 11503–11515.

Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J.-M., Landrieu, I., Leroy, A., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G., and Hanouille, X. (2011). Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *J. Biol. Chem.* *286*, 20441–20454.

Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., and Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J. Virol.* *84*, 10159–10168.

Vogt, D.A., Camus, G., Herker, E., Webster, B.R., Tsou, C.-L., Greene, W.C., Yen, T.-S.B., and Ott, M. (2013). Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog.* *9*, e1003302.

Voisset, C., and Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol. Cell* *96*, 413–420.

Volta, V., Beugnet, A., Gallo, S., Magri, L., Brina, D., Pesce, E., Calamita, P., Sanvito, F., and Biffo, S. (2013). RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 1439–1450.

W

Wächter, K., Köhn, M., Stöhr, N., and Hüttelmaier, S. (2013). Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biol. Chem.* *394*, 1077–1090.

Waggoner, S.N., Hall, C.H.T., and Hahn, Y.S. (2007). HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4⁺ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 1407–1419.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* *11*, 791–796.

Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* *140*, 1334–1344.

Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* *19*, 111–122.

Weinlich, S., Hüttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S.-E., Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D.H. (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* *15*, 1528–1542.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* *12*, 492–499.

Williams, I.T., Bell, B.P., Kuhnert, W., and Alter, M.J. (2011). Incidence and transmission patterns of acute hepatitis C in the United States, 1982-2006. *Arch. Intern. Med.* *171*, 242–248.

Wilson, J.A., Zhang, C., Huys, A., and Richardson, C.D. (2011). Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J. Virol.* *85*, 2342–2350.

Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res.* *36*, 3054–3064.

Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog.* *6*, e1001087.

Wu, G.Y., Konishi, M., Walton, C.M., Olive, D., Hayashi, K., and Wu, C.H. (2005). A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* *128*, 1416–1423.

X

Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1102–1109.

Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P., and Prieto, J. (1998). Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* *244*, 513–520.

Y

Yaka, R., Thornton, C., Vagts, A.J., Phamluong, K., Bonci, A., and Ron, D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 5710–5715.

Yang, F., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kenworthy, R., and Tang, H. (2008). Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J. Virol.* *82*, 5269–5278.

Yao, N., Reichert, P., Taremi, S.S., Prosise, W.W., and Weber, P.C. (1999). Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure* *7*, 1353–1363.

Yi, M., and Lemon, S.M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* *77*, 3557–3568.

Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M., et al. (2003). Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep.* *4*, 602–608.

Yoon, J.C., Shiina, M., Ahlenstiel, G., and Rehermann, B. (2009). Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* *49*, 12–21.

You, S., Stump, D.D., Branch, A.D., and Rice, C.M. (2004). A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* *78*, 1352–1366.

Yu, G.-Y., Lee, K.-J., Gao, L., and Lai, M.M.C. (2006). Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J. Virol.* *80*, 6013–6023.

Z

Zeisel, M.B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., and Baumert, T.F. (2011). Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J. Hepatol.* *54*, 566–576.

Zeisel, M.B., Felmlee, D.J., and Baumert, T.F. (2013). Hepatitis C virus entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 87–112.

Zeller, C.E., Parnell, S.C., and Dohlman, H.G. (2007). The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J. Biol. Chem.* *282*, 25168–25176.

Zhang, C., Huys, A., Thibault, P.A., and Wilson, J.A. (2012a). Requirements for human Dicer and TRBP in microRNA-122 regulation of HCV translation and RNA abundance. *Virology* *433*, 479–488.

Zhang, J., Dinh, T.N., Kappeler, K., Tsaprailis, G., and Chen, Q.M. (2012b). La autoantigen mediates oxidant induced de novo Nrf2 protein translation. *Mol. Cell Proteomics* *11*, M111.015032.

Zhao, X., Tang, Z.-Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., Von Weizsäcker, F., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2002). Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.* *109*, 221–232.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 9294–9299.

Zignego, A.L., Ferri, C., Pileri, S.A., Caini, P., Bianchi, F.B., and Italian Association of the Study of Liver Commission on Extrahepatic Manifestations of HCV infection (2007).

Etude du rôle des protéines cellulaires RACK1 et TIP47 dans l'infection par le virus de l'hépatite C

Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* 39, 2–17.

Annexe I

The ribosomal protein RACK1 is a specific host factor required for IRES-mediated translation of fly and human viruses.

Karim Majzoub¹, Mohamed Lamine Hafirassou^{2,3}, Yann Verdier⁴, Carine Meignin^{1,2}, Stefano Marzi⁵, Franck Martin⁵, Hidehiro Fukuyama^{1,6}, Joëlle Vinh⁴, Jules A. Hoffmann^{1,2,7}, Thomas F. Baumert^{2,3,8,*}, Catherine Schuster^{2,3}, Jean-Luc Imler^{1,2,*}

¹CNRS UPR9022, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France.

²Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

³Inserm UMR1110, Institut de Virologie, Strasbourg, France.

⁴USR3149, ESPCI ParisTech, Paris, France.

⁵CNRS UPR9002, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France.

⁶INSERM Equipe Avenir, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France.

⁷Institut d'Etudes Avancées de l'Université de Strasbourg

⁸Pôle hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

‡ To whom correspondence should be addressed: Thomas.Baumert@unistra.fr;

JL.Imler@unistra.fr.

SUMMARY

Fighting viral infections is hampered by the scarcity of viral targets and their variability resulting in development of resistance. Viruses depend on cellular molecules for their life cycle, which are attractive alternative targets, provided that they are dispensable for normal cell functions. Using the model organism *Drosophila melanogaster*, we identify the ribosomal protein RACK1 as a cellular factor required for infection by the internal ribosome entry site (IRES)-containing virus *Drosophila C virus* (DCV). We further demonstrate that inhibition of RACK1 in human liver cells impairs hepatitis C virus (HCV) IRES-mediated translation and infection. Inhibition of RACK1 in *Drosophila* and human cells does not affect cell viability and proliferation, and RACK1-silenced adult flies are viable, indicating that this protein is not essential for general translation. Our findings demonstrate a specific function for ribosomal protein RACK1 in selective mRNA translation and uncover a promising target for the development of broad antiviral intervention.

INTRODUCTION

Viral infections are a significant threat for all living organisms. In humans, acute and chronic viral infections cause a wide spectrum of diseases, including life-threatening inflammation and cancer. A major challenge for the control of viral infections is that viruses, due to the small size of their genomes, offer few intrinsic targets either for recognition by the immune system or for inhibition by antiviral effector molecules. Furthermore, the error-prone viral polymerases allow RNA viruses to rapidly escape detection by the immune system and to resist the adverse effects of directly acting antiviral molecules. Significantly, viruses rely on numerous host factors for essential functions during their life cycle. These are not subject to rapid sequence changes and hence provide good alternative targets for antiviral therapy. Therefore, a central challenge is to identify cellular factors required for viral replication but dispensable for normal cell function.

RNA replication, transcription and translation are critical steps in the life cycle of RNA viruses, which involve interactions with host-cell molecules. In the model organism *Drosophila melanogaster*, the small interfering (si) RNA pathway targets viral RNAs. Indeed, flies mutant for the genes encoding the core components of this pathway, i.e. *Dicer-2*, *R2D2* and *Argonaute (AGO)2*, are more susceptible to viral infection than wild-type controls, and succumb with increased viral titers {vanRij:2006wm, GalianaArnoux:2006uy, Wang:2006tb}-CITATION_IS_EMPTY. *Dicer-2* contains two RNase III domains and processes double stranded (ds) RNAs (e.g. viral replication intermediates) into 21 nucleotide (nt)-long siRNA duplexes. These are loaded onto AGO2, a central component of the RNA Induced Silencing Complex (RISC), and one of the strands (passenger strand) is discarded, while the

other is used to guide the RISC towards complementary RNA molecules (e.g. viral RNAs; reviewed in (Ding, 2010; Galiana-Arnoux et al., 2006; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006)). The dsRNA binding protein R2D2 forms a heterodimer with Dicer-2 and helps directing it towards long dsRNAs (Cenik et al., 2011). In addition, R2D2 also participates in the loading of the siRNAs onto the RISC (Liu et al., 2003). Remarkably, several insect viruses have evolved mechanisms to counter the antiviral action of Dicer-2, R2D2 and AGO2 (Li et al., 2002; Nayak et al., 2010; van Mierlo et al., 2012; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006). For example, the B2 protein from Flock House virus (FHV) binds dsRNAs and thus antagonizes Dicer-2 (Chao et al., 2005).

Two additional small RNA pathways have been described in flies, namely the Piwi interacting (pi)RNA pathway and the micro (mi)RNA pathway (reviewed in (Czech and Hannon, 2010; Ghildiyal and Zamore, 2009; Ishizu et al., 2012)). They share with the siRNA pathway their requirement for small RNAs that direct Argonaute proteins (Piwi, Aubergine and AGO3 for piRNAs; AGO1 for miRNAs) towards their targets. Both the piRNA and siRNA pathways are important defense mechanisms against viruses and transposons (reviewed in (Ding, 2010)). On the other hand, the miRNA pathway is a fine-tuning mechanism modulating gene expression in both plants and animals (reviewed in (Bartel, 2009)). While the siRNA pathway is the main antiviral defense mechanism in plants, worms, and insects, no clear antiviral role has been assigned to the single Dicer protein encoded by mammalian genomes. Instead, an innate immune response based on interferon induction, together with adaptive immunity, mediates resistance to viral infections in vertebrates (Beutler et al., 2007). Interestingly however, viral infections can be modulated by miRNAs in mammals. Examples include viral miRNAs that regulate the transition from latent to lytic viral

gene expression in large DNA viruses (e.g. Herpesviruses) (Umbach et al., 2008), and cellular miRNAs, such as the abundant hepatocellular miRNA miR122, required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) (Jopling et al., 2005).

Although the core components of the siRNA pathway have been well-characterized biochemically, *in vivo* studies are unveiling an added layer of complexity regarding their function and regulation (e.g. (Cernilogar et al., 2011; Marques et al., 2010; Okamura et al., 2009)). In particular, AGO2 and Dicer-2 appear to carry functions independent from RNA interference in some contexts *in vivo*. For example, AGO2, but not Dicer-2, regulates gene expression upon interaction with chromatin insulators (Moshkovich et al., 2011). Reciprocally, Dicer-2, but not AGO2, was shown to play a role in the induction of the antiviral molecule Vago upon viral infection in *Drosophila* or *Culex* mosquito cells (Deddouche et al., 2008; Paradkar et al., 2012). Hence, it is becoming apparent that in a physiological context, interaction of the core components of the siRNA pathway with cellular cofactors dictates their subcellular localization, and affects their substrate choice and function.

In order to gain insight into the protein environment of Dcr-2, R2D2 and AGO2 in the context of viral infections in *Drosophila*, and to identify novel host factors involved in the control of viral replication in this model organism, we have performed a proteomic analysis of the complexes assembling around these three molecules in infected cells. The evolutionarily conserved ribosomal protein RACK1 copurified with AGO2 and R2D2 in cells infected by the picorna-like virus DCV, and we show here that this factor is mandatory for DCV replication, but largely dispensable for cell viability and proliferation. We further demonstrate that RACK1 is required for IRES-dependent translation in *Drosophila*, and in human hepatocytes, where this factor is an essential determinant of hepatitis C virus infection. Our data suggest that targeting

RACK1 could effectively prevent HCV infection in hepatocytes, without affecting normal cell functions.

RESULTS

RACK1 copurifies with components of the siRNA pathway in DCV-infected cells

We performed a proteomic analysis of the siRNA pathway, which controls RNA virus infections in insects and interacts with viral RNA and associated proteins at crucial stages of the replication cycle (Figure S1). To identify the proteins interacting with the core components of the siRNA pathway, we used a biotin-tag affinity purification system, which allows high efficiency recovery of molecules expressed at physiological levels in *Drosophila* cells, using the exceptionally high affinity of avidin for biotin (de Boer et al., 2003). Dicer-2 (Dcr-2), R2D2 and AGO2 were tagged at the N- or C-terminus with a 15 amino-acid biotin-tag sequence, and stably expressed in a S2 derived cell line expressing the bacterial biotin ligase BirA3 (Fukuyama et al., 2012). Expression from the vectors is controlled by the baculovirus OpIE2 immediate early promoter, which is moderately active in *Drosophila* cells. BirA expressing cell lines transfected with the six expression plasmids (three proteins, tagged at their N- or C-terminal extremities) were selected for the interactome experiments. The tagged proteins and their associated partners were then extracted from cells either mock treated or infected by the RNA viruses DCV, FHV or Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Samples (42 in total) were collected at the peak of viral production, and biotinylated proteins were recovered in single step affinity purification on Streptavidin coupled beads. The pulled down proteins were digested with trypsin and processed by NanoLC-FT ICR mass spectrometry (Figure S1) (Fukuyama et al., 2012).

We identified a total of 101 proteins interacting with Dcr-2, R2D2 or AGO2 in S2 cells, either non infected or challenged by DCV, FHV or VSV (see Figure 1A, Table S1). The cellular extracts were not treated with RNase, allowing the copurification with the protein baits Dicer-2, R2D2 and AGO2 of RNA-bound molecules. Examples include the viral suppressor of RNAi B2 from FHV, which competes with Dicer-2 for binding to dsRNA (Chao et al., 2005), and the recently described cellular dsRNA binding protein Blanks (Gerbasí et al., 2011) (Figure 1A). Among these RNA interacting proteins, we recovered 16 ribosomal proteins, of which RACK1 and RpS28b were only found in cells infected by DCV (Table S1).

RACK1 is required for *Dicistroviridae* infection of *Drosophila* cells

To address the functional relevance of this finding, we systematically depleted the 16 ribosomal proteins from S2 cells by RNAi, and tested DCV replication. Knockdown of most ribosomal genes affected cell viability or proliferation and did not yield interpretable results with regards to DCV infection (Figure 1B). By contrast, depletion of RACK1 (Figure S2A) did not affect cell viability, but resulted in a significant decrease of DCV titer in infected cells. Furthermore, RACK1 silencing did not affect replication of either FHV or VSV (Figure 2A,B), indicating that the RACK1-depleted cells are not only viable and able to proliferate, but can also support replication of other viruses. To test whether the effect of RACK1 was specific to DCV, or to the family to which it belongs, we infected cells with Cricket Paralysis Virus (CrPV), another member of the *Dicistroviridae* family. Replication of CrPV was also strongly impaired when RACK1 was depleted (Figure 2B).

We next confirmed these findings *in vivo*. RACK1 null mutant flies are not viable, indicating that RACK1 exerts developmental functions (Kadrmaz et al., 2007). In agreement with this finding, silencing RACK1 expression with an shRNA driven by the broadly active *actin5C* promoter was embryonic lethal. When the thermosensitive Gal80 system was used to express the shRNA only in adult flies, development occurred normally and the adult flies expressed significantly reduced levels of RACK1 at the permissive temperature of 29°C (Figure 2C). The reduced levels of RACK1 did not affect the viability of the flies, although it reduced longevity by 20% at this temperature. In addition, the eggs laid by RACK1-silenced females showed a phenotype similar to that of RACK1 mutants (Figure S2B) (Kadrmaz et al., 2007). Thus, even though RACK1 is required during development, it appears to be largely dispensable in adult flies. As expected, when these flies were challenged with DCV, both viral RNA and capsid protein levels were reduced at 1 and 2 days post-infection compared to controls (Figure 2D). Overall, our data indicate that replication of the *Dicistroviridae* DCV and CrPV requires the ribosomal factor RACK1, which is otherwise dispensable for the viability of S2 cells and adult flies.

RACK1 is required for viral IRES-dependent translation

Our data indicate that RACK1 is required for a step of viral replication specific to *Dicistroviridae*. Whereas VSV and FHV use a canonical strategy of cap-dependent initiation of translation, DCV RNA recruits the 40S ribosomal subunit through IRES sequences to initiate its translation. Furthermore, although initially identified as a scaffolding protein involved in protein kinase C signaling, RACK1 is now recognized as a component of the 40S subunit of the ribosome (Coyle et al., 2009; Rabl et al.,

2011; Sengupta et al., 2004). This suggested to us that RACK1 was required for viral translation. We first verified that RACK1 is indeed required at the ribosome level for CrPV replication. We silenced RACK1 expression in a stable cell line using an shRNA targeting the 5' untranslated region (Figure S2C), and observed a marked decrease in CrPV replication (Figure S2D). Transfection of a vector expressing wild-type RACK1 restored CrPV replication in these cells (Figure 3A). By contrast, expression of mutant proteins unable to interact with either RpS17 (D108Y) (Kuroha et al., 2010) or 18S rRNA (R38D/K40A) (Coyle et al., 2009) did not rescue CrPV replication (Figure 3A). We conclude that RACK1 is required in the 40S ribosomal subunit for CrPV replication.

To confirm that RACK1 is involved in translation from *Dicistroviridae* RNAs, we quantified the viral RNA present in polysomes from control S2 cells and from RACK1-silenced derivatives of these cells (Figure S2C). Ribosomes and polysomes from both cell lines were isolated through sucrose gradient centrifugation, and RNA was precipitated and analyzed by qRT-PCR. Depletion of RACK1 did not affect the amounts of *actin5C* mRNA, or of FHV RNA, in the polysome fractions (Figure 3B), in agreement with the observation that neither cell viability nor FHV replication is affected in the absence of RACK1. By contrast, a dramatic reduction of CrPV RNA was observed in the polysome fraction when RACK1 was silenced (Figure 3B). Similar results were observed with DCV (data not shown). These results highlight the involvement of RACK1 in the translation of *Discistroviridae*.

Finally, we tested whether depletion of *RACK1* affected translation of Luciferase reporters placed under the control of the two IRES elements from CrPV (Figure 3C). Translation of a 5' cap-dependent RNA was not affected in the absence of RACK1, although it was affected when expression of eIF4E was knocked down. A

significant reduction of translation was however observed for the 5' IRES reporter in RACK1 silenced cells. By contrast, translation driven by the intergenic (IGR) IRES (Jan and Sarnow, 2002; Spahn et al., 2004) was not affected by the level of RACK1 in the cells (Figure 3C).

RACK1 is an essential host factor for HCV infection

RACK1 is an evolutionarily strongly conserved factor, and we asked whether it plays a role in the translation driven by the IRES of a mammalian virus. To address this question, we chose hepatitis C virus (HCV), a major cause of liver disease and hepatocellular carcinoma with still unsatisfactory treatment options. HCV is a positive strand RNA virus member of the *Flaviviridae* family depending on a highly structured IRES for its translation (Spahn et al., 2001). Transfection of an siRNA targeting RACK1 markedly reduced expression of the protein in Huh7.5.1 cells, a hepatic cell line highly permissive for HCV infection (Figure 4A) (Lindenbach et al., 2005). Infection of RACK1-depleted Huh7.5.1 cells by cell culture-derived HCV (Jc1 strain) was strongly and significantly reduced, as revealed both by immunodetection of the viral core protein (Figure 4A) and the focus forming assay (Figure 4B). A similar inhibition of infection was observed for HCV Luc-Jc1, a well-characterized recombinant virus expressing a Luciferase reporter (Figure 4C). Inhibition of RACK1 was as efficient as the silencing of the key HCV host factors CD81 (Dorner et al., 2011) and Cyclophilin A (CypA) (Kaul et al., 2009) (Figure 4B,C). RACK1 silencing did not affect infection of cells by adenovirus-5, which does not use IRES-dependent translation (Figure 4D). We next depleted RACK1 in Huh7.5.1 cells containing the replicating reporter virus HCV Luc-Jc1, and observed a marked impairment of HCV

replication (Figure 4E), demonstrating that RACK1 is required for HCV translation/replication rather than entry. Importantly, RACK1-specific siRNAs did not affect cell viability, in contrast to silencing of the ribosomal protein RPS3 (Figure 4F).

To confirm that the inhibition of HCV replication is indeed mediated by the effect of RACK1 on IRES-mediated translation, we established stable cell lines expressing an IRES_{HCV}-luciferase reporter construct (Wolf et al., 2008) or a classical capped reporter gene (Figure 4G), and transfected these cells with RACK1-specific siRNAs. Silencing of RACK1 markedly and specifically decreased IRES_{HCV}-dependent translation, to a similar extent as an antiviral siRNA directed against the IRES_{HCV} (Figure 4H). By contrast, silencing of ribosomal protein RPS3 inhibited translation from both IRES- and 5' cap-dependent reporter constructs (Figure 4H).

The effect of RACK1 on viral translation is independent of the miRNA pathway

While this work was in progress, two groups reported a role for RACK1 in miRNA function in both the model organism *Caenorhabditis elegans* and humans (Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011). Expression in S2 cells of two previously described miRNA reporters, *Par-6* and *nerfin-1* (Eulalio et al., 2007), was derepressed when RACK1 was silenced, indicating that in *Drosophila* as well, RACK1 can regulate miRNA function (Figure 5A,B). We note however that the derepression is much stronger for the miR1 reporter than for the miR9b reporter, suggesting that the role of RACK1 may be specific of a subset of miRNAs. By contrast, silencing of *Dcr-1* or *AGO1* derepressed equally well the two miR reporters (Figure 5A, B). To test whether miRNAs play a role in viral replication, we monitored accumulation of viral RNAs in cells depleted of *Dcr-1* or *AGO1*. Silencing of *Dcr-1*

had no effect on the viral RNA load of the four viruses tested (Figure 5C). Silencing of *AGO1* did reduce to some extent CrPV and DCV RNA load. However, this reduction was variable in the case of DCV, and not to the extent of the reduction observed when *RACK1* is silenced for DCV and CrPV (Figure 5C). Thus, although the miRNA pathway may have a contribution in the replication of *Dicistroviridae*, our data suggest that the strong effect of *RACK1* cannot be accounted for only by its effect on miRNA function. This was confirmed by the observation that silencing of *Dcr-1* or *AGO1* has no effect on translation driven by the IRES_{CrPV-5'}, unlike silencing of *RACK1* (Figure 5D).

In mammalian hepatocytes, HCV translation depends on *AGO2* and *miR122* (Conrad et al., 2013; Roberts et al., 2011). To determine whether the contribution of *RACK1* to HCV translation was dependent on *miR122*, we turned to HEK-293T cells, which do not express this miRNA ((Da Costa et al., 2012), Figure S3). Silencing *RACK1* in these cells efficiently repressed translation driven by the IRES_{HCV}, suggesting that *RACK1* and *miR122* affect HCV translation by different mechanisms (Figure 5E). Thus, the role of *RACK1* on IRES_{HCV}-dependent translation does not depend on *miR122*.

The position of *RACK1* in the 40S subunit is consistent with an active role in HCV translation

To further characterize the involvement of *RACK1* in IRES_{HCV}-mediated translation, we performed structural modeling analysis. Previous cryo-electron microscopy studies have highlighted the interaction of the 40S subunit with the HCV IRES, and have shown that binding of the HCV IRES triggers a pronounced

conformational change in the small subunit of the ribosome (Spahn et al., 2001; 2004). HCV IRES has been also visualized on the 80S human ribosome and RACK1 localized in its vicinity (Boehringer et al., 2005; Sengupta et al., 2004). The recent solving of the crystal structure of the small subunit of the ribosome at 3.9Å (Rabl et al., 2011) and of the whole 80S at 3Å (Ben-Shem et al., 2011) allows us to analyze the position of RACK1 in the 40S subunit in the absence or presence of the HCV IRES with pseudo-atomic details. RACK1 is located in close proximity to the IRES of HCV (Figure 6A). Although no direct contacts between RACK1 and IRES_{HCV} could be observed, a recent study indicates that a peripheric domain of the translation initiation factor eIF3, which is required for IRES_{HCV}-dependent translation (Kieft, 2008), is in contact with RACK1 (Figure 6B) (Hashem et al., 2013). This domain may be the functional link between RACK1 and IRES_{HCV}-dependent translation. Furthermore, the conformational change triggered upon IRES_{HCV} binding affects the region where RACK1 is located, supporting a functional link between IRES_{HCV} and RACK1 (Figure 6A). By contrast, the IRES_{CrPV-IGR}, which does not depend on RACK1 (Figure 2C), interacts with a distinct site of the 40S subunit, directly contacting RpS25 (Figure 6C) (Schuler et al., 2006; Spahn et al., 2004). Altogether, these structural observations confirm the critical role played by RACK1 in IRES-dependent translation.

DISCUSSION

Defining the protein niche of Dicer-2, R2D2 and AGO2 in infectious context

To identify novel host factors involved in the control of viral replication in *Drosophila*, we have used a broad proteomic approach based on a one-step purification technique taking advantage of the exquisite affinity of avidin for biotin. Using the three bait proteins Dicer-2, R2D2 and AGO2, we have identified 101 proteins, forming the core of a network of 188 protein interactions. The RNAi pathway is conserved during evolution and 16% of the interactants identified here were previously reported in studies on the interactome of Dicer, TRBP (an ortholog of R2D2) or AGO in worms and mammals (Chi et al., 2011; Duchaine et al., 2006). Furthermore, in *Drosophila*, several proteins recently described for their involvement in RNA silencing, such as Hsc70-3 and -4 (Dorner et al., 2006; Iwasaki et al., 2010), Blanks (Gerbası et al., 2011), Sister of Yb and Vreteno (Handler et al., 2011), were pulled-down together with Dicer-2, R2D2 and/or AGO2. Importantly, the comparison of the siRNA pathway interactome in cells uninfected or challenged with three different viruses revealed a dynamic pattern of interactions. The observed shift in the composition of the protein environment of the antiviral siRNA pathway probably reflects differences in the viral life cycles. This is illustrated by (i) the recovery of a mitochondrial protein, mtTFB1, with AGO2 only in cells infected by FHV, which replicates on the outer membrane of this organelle; (ii) the association of the poly(A) binding protein (PABP) (known to bind to the poly(A) tail of mRNAs and to interact with the eIF4F complex bound to the 5' cap to initiate translation) with AGO2 only in cells infected by VSV, the only virus used here expressing capped and polyadenylated mRNAs; or (iii) the association of RACK1 with AGO2 and R2D2 only in

cells infected by the IRES-containing virus DCV. Overall, the interactome dataset obtained in this proteomic analysis will be useful for future studies on the control of viral infections.

A new function for RACK1 in IRES-dependent translation

The RACK1 protein has been extensively studied during the last two decades, and shown to be involved in different aspects of cell regulation. RACK1 is an adapter protein, interacting with a variety of signaling molecules (e.g. PKC, Src, MAPK) (Arimoto et al., 2008; Mamidipudi et al., 2004), and is a component of the 40S subunit of the ribosome (Coyle et al., 2009; Sengupta et al., 2004). RACK1 is thus ideally suited to connect signal transduction pathways to the regulation of translation (Nilsson et al., 2004). Indeed, RACK1 was found to interact with the initiation factor eIF6, which associates with the 60S subunit of the ribosome, and prevents its association with the 40S subunit. RACK1-assisted phosphorylation by PKC of eIF6 was observed to trigger its release from the 60S subunit, thus promoting the formation of 80S active ribosomes (Ceci et al., 2003).

Our data indicate that formation of active ribosomes is not strictly dependent on RACK1. Indeed, depletion of RACK1 does not affect cell viability of *Drosophila* S2 or human Huh7.5.1 cells in tissue culture. *In vivo* as well, translation can occur in the absence of RACK1, as lethality in *RACK1* mutant animals does not occur before larval stages for *Drosophila* and gastrulation in mice (Kadrmaz et al., 2007; Volta et al., 2013). In agreement with this observation, translation of a 5' cap-dependent reporter was not affected in the absence of RACK1 in *Drosophila* and human cells. Nevertheless, the fact that *RACK1* mutant animals cannot complete their

development suggests that this protein is required for the translation of some cellular mRNAs, in addition to viral IRES-containing RNAs. Interestingly, previous studies have highlighted the role of another protein from the 40S subunit of the ribosome, RpS25, in IRES-dependent translation (Landry et al., 2009). Performed on yeast and mammalian tissue-culture cells with IRES reporter assays, these experiments concluded that RpS25 is essential for the activity of two viral IRES, IRES_{HCV} and IRES_{CrPV-IGR}. The mechanism used by RpS25 and RACK1 to promote translation is probably different for several reasons: (i) RpS25 is required for IRES_{CrPV-IGR}, unlike RACK1; (ii) in addition to IRES-dependent translation, RpS25 also mediates ribosome shunting in adenovirus (Hertz et al., 2013), whereas *RACK1* silencing does not affect adenovirus replication; (iii) structural data place RpS25 at a distance from RACK1 on the 40S subunit of the ribosome, providing an explanation for its importance on the activity of the IRES_{CrPV-IGR}. Several other ribosomal proteins (e.g. RpL38, RpL40) were recently proposed to be involved in specific translation of some 5' cap-dependent mRNAs (Kondrashov et al., 2011; Lee et al., 2013), indicating that transcript-specific regulation can occur in the absence of IRES elements. Our data lend support to an evolving picture of the eukaryotic ribosome, which includes structurally peripheral components such as RACK1 involved in the modulation of translation of specific mRNAs.

A central unresolved issue is the nature of the *cis*-acting elements defining a possible “ribosome code” (Mauro and Edelman, 2002; Topisirovic and Sonenberg, 2011). In the case of RACK1, these *cis*-acting elements include viral IRES. Interestingly, the IRES_{CrPV-IGR} is active in the absence of RACK1, unlike the IRES_{CrPV-5'} or the IRES_{HCV}. This IRES (class I IRES) is capable on its own, without any initiation factors, of binding directly the 40S subunit and of recruiting the 60S

subunit to form an active 80S ribosome, thus bypassing the loading of the initiator methionyl-tRNA_i (Jan and Sarnow, 2002; Pestova et al., 2004). By contrast, other IRES that have been characterized depend to varying degrees on a subset of initiation factors. For example, the function of IRES_{HCV} (class II IRES) requires two canonical eIFs, eIF2 and 3, as well as Met-tRNA_i (Kieft, 2008). This suggests that the effect of RACK1 on translation initiation may require one of these factors. Interestingly, the eIF3 complex binds to the 40S ribosomal subunit, and to the IRES_{HCV} (e.g. (Kieft et al., 2001)). Furthermore, RACK1 was shown to associate with one of the eIF3 subunits in order to assemble a translation pre-initiation complex in yeast (Hashem et al., 2013; Kouba et al., 2012). Thus, the effect of RACK1 on translation may be mediated through eIF3. Alternatively, the requirement for RACK1 may reflect the position of the IRES at the 5' extremity of the viral mRNA. In support of this hypothesis, the IRES_{HCV} was not sensitive to RACK1 depletion when it was cloned in bicistronic reporters (data not shown).

RACK1 as a target for broad antiviral intervention

Our results open interesting therapeutic perspectives for chronic hepatitis C, a major cause of liver cirrhosis and cancer, for which antiviral resistance remains an important challenge. Because HCV translation initiates viral genome neosynthesis via the formation of the replication complex, RACK1-mediated translation is a crucial step in virus propagation. Thus, RACK1 is a novel host target for antiviral therapy, which is complementary to other approaches targeting viral enzymes such as the protease, the polymerase or the nonstructural protein NS5A.

The current standard-of-care (SOC) for chronic genotype 1 HCV infection consists of pegylated interferon (IFN)-alfa, ribavirin and a protease inhibitor (Hofmann and Zeuzem, 2012). A large number of other promising direct-acting antivirals (DAAs) are being evaluated in clinical trials. However, recent phase III randomized clinical trials demonstrate that limited response for distinct genotypes remains an important challenge in a significant fraction of patients (Jacobson et al., 2013; McPhee et al., 2013). Furthermore, difficult-to-treat patients, such as partial non-responders or null-responders to prior therapy, patients with advanced liver disease, HIV-coinfected or immune-compromised patients will most likely require additional or alternative approaches (Barreiro et al., 2012; Jacobson et al., 2013). A promising strategy to address antiviral resistance to SOC and DAAs are host-targeting agents (HTAs). Compared to the high variability of viral proteins targeted by DAAs, the variability of host factors targeted by HTAs is low (Nathan, 2012). By imposing a genetic barrier to resistance higher than that of DAAs, host-targeting agents may avoid emergence of viral escape variants. Indeed, we, and others, have shown that agents targeting host entry potentially inhibit highly infectious escape variants of HCV (Fofana et al., 2010; Lupberger et al., 2011; Zhu et al., 2012). Given that HTAs interfere with host targets, one caveat is the possibly greater risk of cellular toxicity as compared to DAAs. Interestingly, our data obtained in cell culture models did not reveal any major toxicity linked to RACK1 inhibition. Thus, our proof-of-concept studies in state-of-the-art cell culture models open a highly attractive and innovative perspective to discover and develop small molecules targeting RACK1 for treatment of SOC-resistant chronic hepatitis C.

We note that several other viruses causing human disease use 5' cap-independent mechanisms for the translation of their RNAs. These include HIV,

enteroviruses such as poliovirus, rhinoviruses, cardioviruses such as EMCV, coxsackieviruses or aphthoviruses such as FMDV, hepatitis A virus (Martinez-Salas et al., 2008), which may also be sensitive to RACK1-targeting antiviral approaches. Animal viruses relying on IRES-mediated translation, which represent a significant economic burden and for which treatment options are limited, or completely absent, such as pestiviruses (Peterhans et al., 2010), may also be sensitive to RACK1 inhibition. Therefore, the development of RACK1 inhibitors may have benefits for treating infections by human viruses other than HCV, and may even be relevant for veterinary medicine.

RACK1 and regulatory RNA functions

While this work was in preparation, two reports described a role for RACK1 in miRNA function in nematodes and human cells (Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011). We confirm here that in *Drosophila* as well, RACK1 can affect miRNA function. However, the importance of the requirement for RACK1 for the silencing was variable depending on the tested miR reporter, suggesting that the requirement for RACK1 may be miR- or target-specific. The differences observed between the *in vivo* phenotypes of *RACK1* and *AGO1* or *Dicer-1* mutant flies support this hypothesis. Indeed, flies mutant for the miRNA pathway exhibit embryonic lethality (Lee et al., 2004; Okamura et al., 2004), whereas RACK1 mutants reach the larval stage (Kadmas et al., 2007). Furthermore, shRNA-mediated conditional knockdown of AGO1 in adult flies resulted in rapid lethality, unlike silencing of RACK1 (data not shown). Based on our observation that RACK1 interacts with AGO2, it is possible that RACK1 preferentially affects the subset of miRNAs loaded onto AGO2.

Regarding viral infections, the fact that AGO2 interacts with RACK1 suggests the existence of a connection between translation and antiviral RNA interference. It raises the possibility that the siRISC complex inhibits translation of viral proteins. Based on *in vitro* experiments, it is generally assumed that AGO2 functions as a slicer, cleaving viral RNAs complementary to the guide siRNAs (Nayak and Andino, 2011), but direct evidence that AGO2 degrades viral RNAs *in vivo* is lacking. AGO2 can inhibit translation in some contexts, albeit by a different mechanism than AGO1. Interestingly, in *Drosophila*, AGO2 inhibits translation at the level of the 5' cap structure, competitively binding the cap-binding eIF4E protein and preventing its association with eIF4G and the 40S-bound initiation factor eIF3 (Iwasaki et al., 2009). An intriguing possibility is that binding to RACK1 allows AGO2 to also control translation of 5' cap-independent transcripts, as suggested by *in vitro* studies (Iwasaki and Tomari, 2009).

In summary, we have shown that the protein RACK1 is involved in translation of IRES-containing viral mRNAs and largely dispensable for translation of cellular mRNAs. Our findings comfort the ribosome code or ribosome filter hypothesis, and point to RACK1 as a promising tool to characterize the mechanism of transcript-specific translation and, in particular, the *cis*-acting elements modulating RNA translation in a RACK1-dependent manner. The identification of a ribosomal protein required for IRES-dependent translation of viral mRNAs further opens interesting perspectives for the design of a novel class of antiviral therapeutics targeting specific components of the ribosome, e.g. RACK1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein purification and identification by mass spectrometry

Protein purification and identification by mass spectrometry from stable S2 cells expressing bait proteins tagged at their N- or C-terminal extremities was performed as described, using the on-beads tryptic digestion method (Fukuyama et al., 2012). Validation of the proteins identified was performed in two steps: (1) FDR<1% with at least one peptide score above 30, and (2) two distinct sequences with an ion score >30, or one sequence only but with an ion score >30 and a Mudpit score >49. Proteins passing filter 2 but not 1 were manually checked and validated if the identified sequence was specific to the associated gene after control of the MS/MS spectrum. Proteins that passed filter 1, but not the more stringent filter 2, were not considered. All proteomic raw data are available in the Pride database under accession numbers 24806-24848 (<http://www.ebi.ac.uk/pride>).

Silencing candidate gene expression by RNAi and screening

Following identification, dsRNAs targeting the candidate genes were designed using the E-RNAi algorithm (<http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>). Knock-down in drosophila S2 cells was performed in 96-well plates using the bathing method, and cells were challenged with virus 4 days later. Viral load was determined by RT-QPCR. Alternatively, infected cells were fixed and labeled with anti-capsid antibodies for immunofluorescence analysis using the InCELL1000 Analyzer workstation (GE LifeSciences). Image data processing was performed using the InCELL Analyzer software.

Structural modeling of the IRES in the 40S subunit

The model of the IRES_{HCV}-40S subunit was built using the cryo-EM structure of the complex between the IRES and the 40S subunit at 20Å resolution (Spahn et al., 2001). The atomic model of the human ribosome obtained by cryoEM at 4.8Å resolution (Anger et al., 2013) was fitted in the corresponding density of the rabbit 40S, which revealed a good fitting of the platform area, where RACK1 is located. A model of the IRES_{HCV} based on the structure of its individual domains solved by NMR and X-ray crystallography, was then built.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information includes Extended Experimental procedures and three Supplementary Figures and two Supplementary Tables.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), and grants from the NIH (PO1 AI070167, to J.A.H. and J.-L.I.); the Investissement d'Avenir program Laboratoire d'Excellence, (HepSys ANR-10-LAB-28, to T.B. and NetRNA ANR-10-LABX-36, to J.-L.I. and S.M.), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-MIEN-006-01 to J.-L.I.), the Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS 2010-307/2011-415, to C.S.), the Fondation pour la Recherche Médicale (to C.M.). Financial support from the TGE FT-ICR for conducting the research and from the ESPCI ParisTech and the Fonds pour la Recherche et la Technologie of the french

Ministry of Research for the LTQ FT acquisition are gratefully acknowledged. M.L.H. and K.M. were supported by fellowships from ANRS and CNRS/Région Alsace, respectively. We thank R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany) for providing Jc1 and Luc-Jc1 expression vectors; F.V. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) for Huh7.5.1 cells; M. Beckerle (University of Utah, USA) for providing RACK1 antiserum; S. Thompson (Birmingham, AL, USA) for sharing the plasmid pSRT208; the transgenic RNAi Project (TRiP) at Harvard Medical School (NIH/NIGMS R01-GM084947) for providing transgenic RNAi fly stocks. We also thank E. Santiago and N. Ftaich for technical assistance; B. Fischer (siRNA screening platform at IGBMC) for the InCell1000 analysis; and E. Westhof for critical reading of the manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. RACK1 is required for DCV replication, but not for viability or proliferation in *Drosophila* cells.

(A) Interactome of Dcr-2, R2D2 and AGO2 in control and virus infected cells. A schematic representation of all detected interactions (merged data from non-infected, DCV-, FHV- and VSV-infected cells) is shown. The ribosomal proteins are shown in yellow. The dsRNA binding viral protein B2 is shown in blue. See Table S1 for the whole dataset and the statistical analysis. (B) Quantification by qRT-PCR of DCV viral RNA levels (top graph) and of cell numbers as estimated by DAPI staining (bottom graph) in cells treated with the indicated dsRNAs to induce silencing. The viability Z-scores indicated on the bars of the bottom panel are taken from (Boutros et al., 2004): a Z-score above 3 indicates that the depletion of the corresponding gene causes cell death. Cells treated with a dsRNA corresponding to GFP sequences are used as a reference. Data represent the mean and s.e.m. of at least three independent experiments. ns: non significant; * $p < 0.05$.

Figure 2. RACK1 is required for replication of DCV and CrPV, but not FHV and VSV

(A, B) S2 cells were treated with either control (*GFP*) or *RACK1* dsRNA for 4 days, before challenge with DCV, FHV, VSV or CrPV. Viral infection was monitored by immunofluorescence 16h later using antibodies recognizing capsid proteins (A) or qRT-PCR (B). (C) Silencing of *RACK1* expression in transgenic flies expressing a small hairpin (sh) RNA targeting the 5' UTR from the *RACK1* gene, using the Gal4-UAS system and the broadly expressed actin-Gal4 driver controlled by the

thermosensitive (TS) tub-Gal80 repressor. A shRNA targeting the mCherry protein was used as a control. The life span of RACK1 depleted flies is shown in the bottom graph. (D) *RACK1* silenced flies infected by DCV after 5 days at 29°C show a decrease of the viral RNA and protein, as indicated by qRT-PCR and western blot. Data represent the mean and s.e.m. from at least three independent experiments. *ns*: non significant; dpi: days post-infection; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 3. The ribosomal protein RACK1 is required for IRES-mediated translation.

(A) Stable S2 transformants expressing a shRNA targeting the 5' UTR of *RACK1* were transfected with vectors expressing three versions of RACK1 (WT, R38D/K40E or D108Y). Expression of the transfected RACK1 was monitored by western blot using an antibody recognizing the N-terminal tag HA. The cells were infected with CrPV for 16h, and viral RNA loads were determined by qRT-PCR. Data represent the mean and s.e.m. from three independent experiments. The insert shows the position of the RACK1 residues R38, K40 (as green densities) and D108 (as cyan density) involved in interaction with the 40S subunit. *ns*: non significant; ** $p < 0.01$. (B) Quantification of viral mRNA in polysomes from control (brown) vs *RACK1*-depleted (blue) cells. (C) RACK1 is required for translation regulated by the 5' IRES, but not the intergenic (IGR) IRES, of CrPV. The genome organization of CrPV is shown at the top. S2 cells were treated with dsRNAs corresponding to *GFP* (control), *AGO2*, *eIF4E* or *RACK1* dsRNA for 3 days, before transfection of the indicated Luciferase reporters (5'CAP, IRES_{CrPV-IGR} or IRES_{CrPV-5'}). Luciferase activity was monitored 48h later. The ratio of the activity of the IRES-dependent luciferase and the 5' cap-dependent luciferase is plotted and normalized to the control for the three reporters.

Data represent the mean and s.e. from six independent experiments. ns: non significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 4. RACK1 is a specific host-factor required for IRES-mediated translation of HCV.

(A-D) Huh7.5.1 cells were transfected with siRNAs either control (siCTRL) or targeting RACK1 (siRACK1), CD81 (siCD81), Cyclophilin A (siCypA), HCV IRES (siHCV) or ribosomal protein RSP3 (siRibo), before infection three days later with HCV Jc1 (B), HCV Luc-Jc1 (C) or luciferase encoding adenovirus (D). Viral infection was monitored 3 days post-infection, by immunoblotting using antibodies recognizing HCV core protein (A); by counting foci forming units (ffu/ml) (B); or by quantifying luciferase activity (C, D). (E) HCV Luc-Jc1 replicating cells were transfected with siCTRL, two different siRNAs targeting RACK1 (siRACK1-1 and -2) or siCypA, and replication was monitored during 5 days by luciferase activity quantification. (F) Cell viability was measured during 5 days using MTT assay. (G, H) Huh7.5.1. cell lines stably expressing an IRES (IRES_{HCV}-Luc) or a 5' cap-translated (CTRL-Luc) luciferase reporter gene (G) were transfected with siCTRL, siRACK1, siHCV or siRPS3. Translation was monitored 72h later by luciferase activity quantification. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Figure 5. The effect of RACK1 on viral translation is independent of the miRNA pathway

(A, B) RACK1 is required for miR1 and miR9b silencing. The structure of the *Par-6* 3' UTR and *nerfin-1* 3' UTR reporter constructs is represented on top, and the luciferase

activity in cells silenced for the indicated genes is shown below. (C) Effect of the depletion of *AGO1*, *Dcr-1* and *RACK1* on replication in *Drosophila* S2 cells of CrPV, DCV, FHV and VSV. Cells were transfected with the indicated dsRNAs, and infected four days later. Viral RNA was extracted 24hpi, and quantified by qRT-PCR. (D) Silencing of *AGO1* or *Dcr-1* does not affect the activity of a Luciferase reporter gene controlled by the IRES_{CrPV-5'} in *Drosophila* S2 cells. (E) Silencing of *RACK1* affects the activity of the IRES_{HCV}-luciferase reporter in miR122 deficient HEK-293T cells. Data represent the mean and s.e.m. of at least three independent experiments. ns: non significant; * p<0.05; ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 6. The position of RACK1 in the 40S subunit supports a role in HCV translation.

(A) Fitting of the atomic model of the 40S and IRES_{HCV} to the 40S-IRES cryo-electron microscopy structure. The atomic model of the human 40S ribosome (pdb 3J3A and 3J3D (Anger et al., 2013)) and IRES_{HCV} was fitted onto the cryo-electron microscopy density map of the complexes IRES_{HCV}-40S at 20Å resolution (Spahn et al., 2001). RACK1 is in red, the 40S subunit in light transparent brown, and IRES_{HCV} in blue. Other ribosomal proteins close to HCV IRES are in yellow (RpS17, RpS0, RpS26, RpS14, RpS5 and RpS28). RpS25 is in green. The changes on the 40S structure, observed upon IRES_{HCV} binding, are in blue on the density map, close to RACK1. Information on IRES_{HCV} model building and fitting are provided in the supplementary material. (B) Fitting of the atomic model of the 40S and IRES_{CrPV-IGR} to the 40S-IRES cryo-electron microscopy structure. The atomic model of the human 40S ribosome and IRES_{CrPV-5'} was fitted onto the cryo-electron microscopy density map of the complexes IRES_{CrPV-5'}- human 40S ribosome at 20.3Å resolution (emd-

1090; (Spahn et al., 2004)). Colors are as in panel A. The IRES_{CrPV-IGR} atomic model is from (Schuler et al., 2006) (pdb 2NOQ).

References

- Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 497, 80–85.
- Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H., and Takekawa, M. (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nature Cell Biology* 10, 1324–U167.
- Barreiro, P.P., Vispo, E.E., Labarga, P.P., and Soriano, V.V. (2012). Management and treatment of chronic hepatitis C in HIV patients. *Semin Liver Dis* 32, 138–146.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 1524–1529.
- Beutler, B., Eidenschenk, C., Crozat, K., Imler, J.L., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., and Akira, S. (2007). Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nature Reviews Immunology* 7, 753–766.
- Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., Lewis, J.D., and Stark, H. (2005). Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13, 1695–1706.
- Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S.A., Paro, R., and Perrimon, N. (2004). Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303, 832–835.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhauser, N., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27(BBP)) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426, 579–584.
- Cenik, E.S., Fukunaga, R., Lu, G., Dutcher, R., Wang, Y., Hall, T.M., and Zamore, P.D. (2011). Phosphate and R2D2 Restrict the Substrate Specificity of Dicer-2, an ATP-Driven Ribonuclease. *Molecular Cell* 42, 172–184.
- Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, A.M., Parsi, K.M., Breiling, A., Sardo, Lo, F., Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., et al. (2011). Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature* 480, 391–395.

Chao, J.A., Lee, J.H., Chapados, B.R., Debler, E.W., Schneemann, A., and Williamson, J.R. (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 952–957.

Chi, Y.H., Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (2011). A proteomic study of TAR-RNA binding protein (TRBP)-associated factors. *Cell Biosci* 1, 9.

Conrad, K.D., Giering, F., Erfurth, C., Neumann, A., Fehr, C., Meister, G., and Niepmann, M. (2013). microRNA-122 Dependent Binding of Ago2 Protein to Hepatitis C Virus RNA Is Associated with Enhanced RNA Stability and Translation Stimulation. *PLoS One* 8, –e56272.

Coyle, S.M., Gilbert, W.V., and Doudna, J.A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 29, 1626–1634.

Czech, B.B., and Hannon, G.J.G. (2010). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 12, 19–31.

Da Costa, D.D., Turek, M.M., Felmlee, D.J.D., Girardi, E.E., Pfeffer, S.S., Long, G.G., Bartenschlager, R.R., Zeisel, M.B.M., and Baumert, T.F.T. (2012). Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *Journal of Virology* 86, 11919–11925.

de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2003). Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7480–7485.

Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. *Nature Immunology* 9, 1425–1432.

Ding, S.W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* 10, 632–644.

Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., et al. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208–211.

Dorner, S., Lum, L., Kim, M., Paro, R., Beachy, P.A., and Green, R. (2006). A genomewide screen for components of the RNAi pathway in *Drosophila* cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11880–11885.

Duchaine, T.F., Wohlschlegel, J.A., Kennedy, S., Bei, Y., Conte, D.J., Pang, K., Brownell, D.R., Harding, S., Mitani, S., Ruvkun, G., et al. (2006). Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* 124, 343–354.

Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S.-F., Doerks, T., Dörner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes & Development* 21, 2558–2570.

Fofana, I., Krieger, S.E., Grunert, F., Glauben, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., Mee, C.J., et al. (2010). Monoclonal Anti-Claudin 1 Antibodies Prevent Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 139, 953–U339.

Fukuyama, H., Ndiaye, S., Hoffmann, J., Rossier, J., Liuu, S., Vinh, J., and Verdier, Y. (2012). On-bead tryptic proteolysis: An attractive procedure for LC-MS/MS analysis of the *Drosophila* caspase 8 protein complex during immune response against bacteria. *J Proteomics* 75, 4610–4619.

Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *drosophila*. *Nature Immunology* 7, 590–597.

Gerbasi, V.R., Preall, J.B., Golden, D.E., Powell, D.W., Cummins, T.D., and Sontheimer, E.J. (2011). Blanks, a nuclear siRNA/dsRNA-binding complex component, is required for *Drosophila* spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 3204–3209.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94–108.

Handler, D., Olivieri, D., Novatchkova, M., Gruber, F.S., Meixner, K., Mechtler, K., Stark, A., Sachidanandam, R., and Brennecke, J. (2011). A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors. *The EMBO Journal* 30, 3977–3993.

Hashem, Y., Georges, des, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H.Y., Grassucci, R.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., and Frank, J. (2013). Structure of the Mammalian Ribosomal 43S Preinitiation Complex Bound to the Scanning Factor DHX29. *Cell* 153, 1108–1119.

Hertz, M.I., Landry, D.M., Willis, A.E., Luo, G., and Thompson, S.R. (2013). Ribosomal Protein S25 Dependency Reveals a Common Mechanism for Diverse Internal Ribosome Entry Sites and Ribosome Shunting. *Molecular and Cellular Biology* 33, 1016–1026.

Hofmann, W.P., and Zeuzem, S. (2012). HEPATITIS C IN 2011 A new standard of care and the race towards IFN-free therapy. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9, 67–68.

Ishizu, H., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2012). Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & Development* 26, 2361–2373.

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and

- Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Molecular Cell* 39, 292–299.
- Iwasaki, S.S., and Tomari, Y.Y. (2009). Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly* 3, 204–206.
- Iwasaki, S., Kawamata, T., and Tomari, Y. (2009). *Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2 Employ Distinct Mechanisms for Translational Repression. *Molecular Cell* 34, 58–67.
- Jacobson, I.M., Gordon, S.C., Kowdley, K.V., Yoshida, E.M., Rodriguez-Torres, M., Sulkowski, M.S., Shiffman, M.L., Lawitz, E., Everson, G., Bennett, M., et al. (2013). Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *N. Engl. J. Med.* 368, 1867–1877.
- Jan, E.E., and Sarnow, P.P. (2002). Factorless Ribosome Assembly on the Internal Ribosome Entry Site of Cricket Paralysis Virus. *Journal of Molecular Biology* 324, 14–14.
- Jannot, G., Bajan, S., Giguere, N.J., Bouasker, S., Banville, I.H., Piquet, S., Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2011). The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO Rep* 12, 581–586.
- Jopling, C.L., Yi, M.K., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309, 1577–1581.
- Kadmas, J.L., Smith, M.A., Pronovost, S.M., and Beckerle, M.C. (2007). Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. *Dev Dyn* 236, 2207–2215.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J., and Bartenschlager, R. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathogens* 5, e1000546.
- Kieft, J.S., Zhou, K.H., Jubin, R., and Doudna, J.A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7, 194–206.
- Kieft, J.S. (2008). Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in Biochemical Sciences* 33, 274–283.
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383–397.
- Kouba, T., Rutkai, E., Karaskova, M., and Valasek, L.S. (2012). The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Research* 40, 2683–2699.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent

translation arrest. *EMBO Rep* 11, 956–961.

Landry, D.M., Hertz, M.I., and Thompson, S.R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes & Development* 23, 2753–2764.

Lee, A.S.-Y., Burdeinick-Kerr, R., and Whelan, S.P.J. (2013). A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 324–329.

Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69–81.

Li, H., Li, W.X., and Ding, S.W. (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319–1321.

Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623–626.

Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P., and Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301, 1921–1925.

Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature Medicine* 17, 589–595.

Mamidipudi, V., Zhang, J., Lee, K.C., and Cartwright, C.A. (2004). RACK1 regulates G(1)/S progression by suppressing Src kinase activity. *Molecular and Cellular Biology* 24, 6788–6798.

Marques, J.T., Kim, K., Wu, P.-H., Alleyne, T.M., Jafari, N., and Carthew, R.W. (2010). Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 24–30.

Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., and Fernandez, N. (2008). New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *The Journal of General Virology* 89, 611–626.

Mauro, V.P., and Edelman, G.M. (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12031–12036.

McPhee, F., Hernandez, D., Yu, F., Ueland, J., Monikowski, A., Carifa, A., Falk, P., Wang, C., Fridell, R., Eley, T., et al. (2013). Resistance analysis of hepatitis C virus genotype 1 prior treatment null responders receiving daclatasvir and asunaprevir. *Hepatology* –.

Moshkovich, N., Nisha, P., Boyle, P.J., Thompson, B.A., Dale, R.K., and Lei, E.P.

(2011). RNAi-independent role for Argonaute2 in CTCF/CP190 chromatin insulator function. *Genes & Development* 25, 1686–1701.

Nathan, C. (2012). Fresh Approaches to Anti-Infective Therapies. *Sci Transl Med* 4.

Nayak, A., Berry, B., Tassetto, M., Kunitomi, M., Acevedo, A., Deng, C., Krutchinsky, A., Gross, J., Antoniewski, C., and Andino, R. (2010). Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in *Drosophila*. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 547–554.

Nayak, A., and Andino, R. (2011). Slicer activity in *Drosophila melanogaster* S2 extract. *Methods Mol. Biol.* 721, 231–244.

Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5, 1137–1141.

Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development* 18, 1655–1666.

Okamura, K., Liu, N., and Lai, E.C. (2009). Distinct Mechanisms for MicroRNA Strand Selection by *Drosophila* Argonautes. *Molecular Cell* 36, 431–444.

Otsuka, M., Takata, A., Yoshikawa, T., Kojima, K., Kishikawa, T., Shibata, C., Takekawa, M., Yoshida, H., Omata, M., and Koike, K. (2011). Receptor for Activated Protein Kinase C: Requirement for Efficient MicroRNA Function and Reduced Expression in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 6, –e24359.

Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.-B., and Walker, P.J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 18915–18920.

Pestova, T.V., Lomakin, I.B., and Hellen, C. (2004). Position of the CrPVIREs on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep* 5, 906–913.

Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., and Schweizer, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res* 41, –44.

Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* 331, 730–736.

Roberts, A.P.E., Lewis, A.P., and Jopling, C.L. (2011). miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Research* 39, 7716–7729.

Schuler, M., Connell, S.R., Lescoute, A., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Schroer, B., Mielke, T., Penczek, P.A., Westhof, E., and Spahn, C.M. (2006). Structure of the

ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA. *Nature Structural & Molecular Biology* *13*, 1092–1096.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural & Molecular Biology* *11*, 957–962.

Spahn, C.M., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R.A., Sarnow, P., and Frank, J. (2004). Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* *118*, 465–475.

Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* *291*, 1959–1962.

Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2011). Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* *145*, 333–334.

Umbach, J.L., Kramer, M.F., Jurak, I., Karnowski, H.W., Coen, D.M., and Cullen, B.R. (2008). MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* *454*, 780–U108.

van Mierlo, J.T., Bronkhorst, A.W., Overheul, G.J., Sadanandan, S.A., Ekstrom, J.-O., Heestermaans, M., Hultmark, D., Antoniewski, C., and van Rij, R.P. (2012). Convergent Evolution of Argonaute-2 Slicer Antagonism in Two Distinct Insect RNA Viruses. *PLoS Pathogens* *8*, –e1002872.

van Rij, R.P., Saleh, M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., and Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* *20*, 2985–2995.

Volta, V., Beugnet, A., Gallo, S., Magri, L., Brina, D., Pesce, E., Calamita, P., Sanvito, F., and Biffo, S. (2013). RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency. *Cell Mol Life Sci* *70*, 1439–1450.

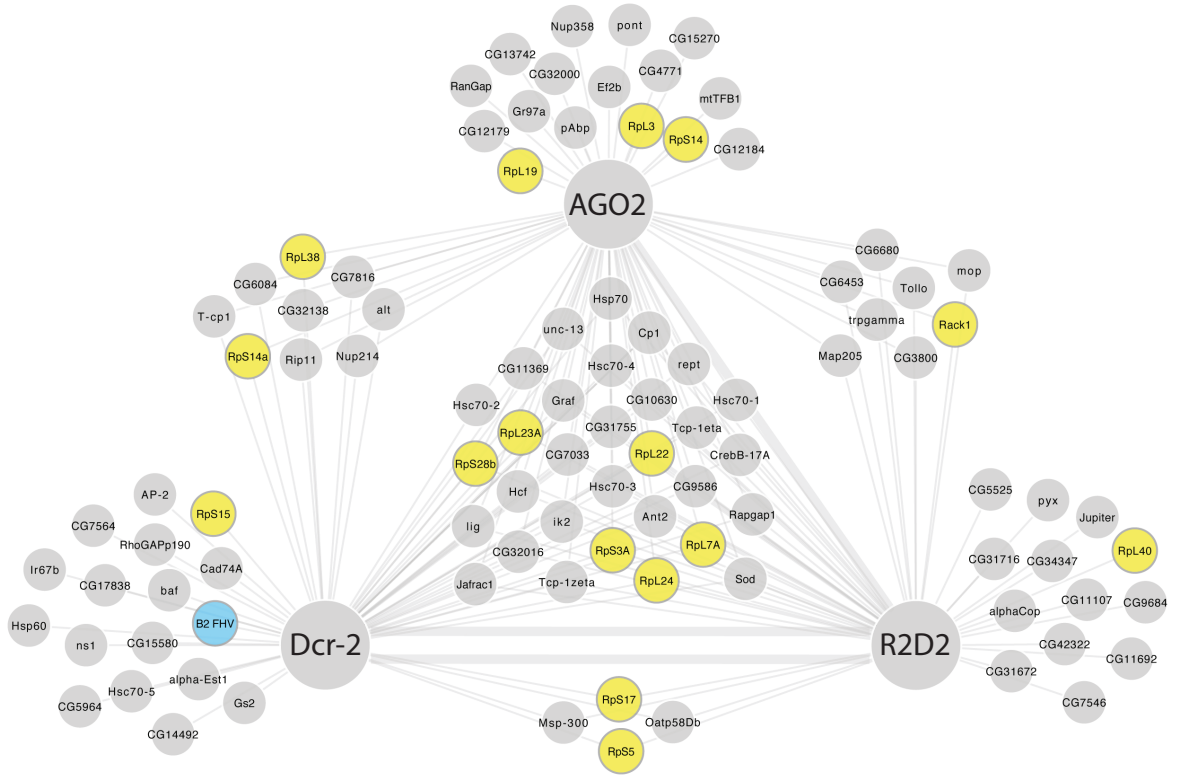
Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., and Ding, S.W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* *312*, 452–454.

Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Research* *36*, 3054–3064.

Zhu, H., Wong-Staal, F., Lee, H., Syder, A., McKelvy, J., Schooley, R.T., and Wyles, D.L. (2012). Evaluation of ITX 5061, a Scavenger Receptor B1 Antagonist: Resistance Selection and Activity in Combination With Other Hepatitis C Virus Antivirals. *J Infect Dis* *205*, 656–662.

FIGURE 1

A.



B.

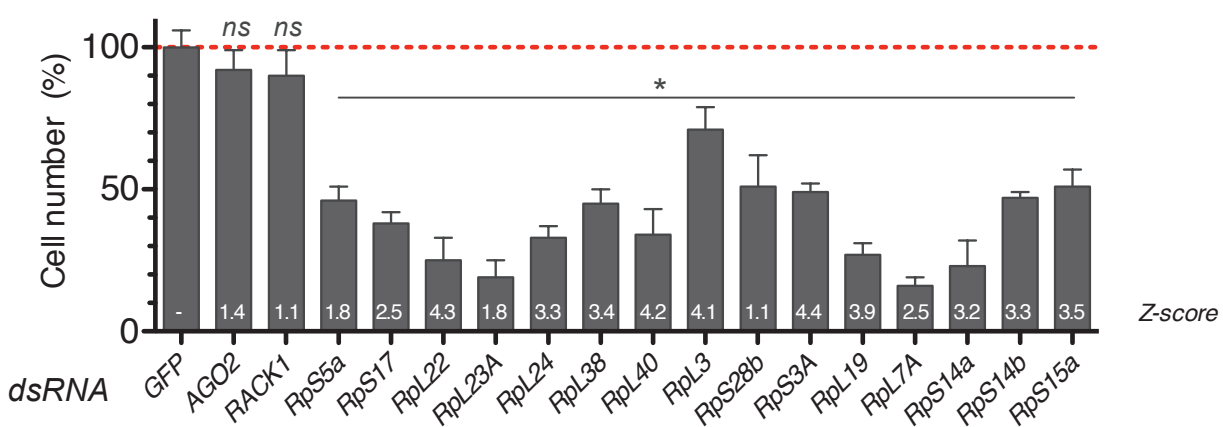
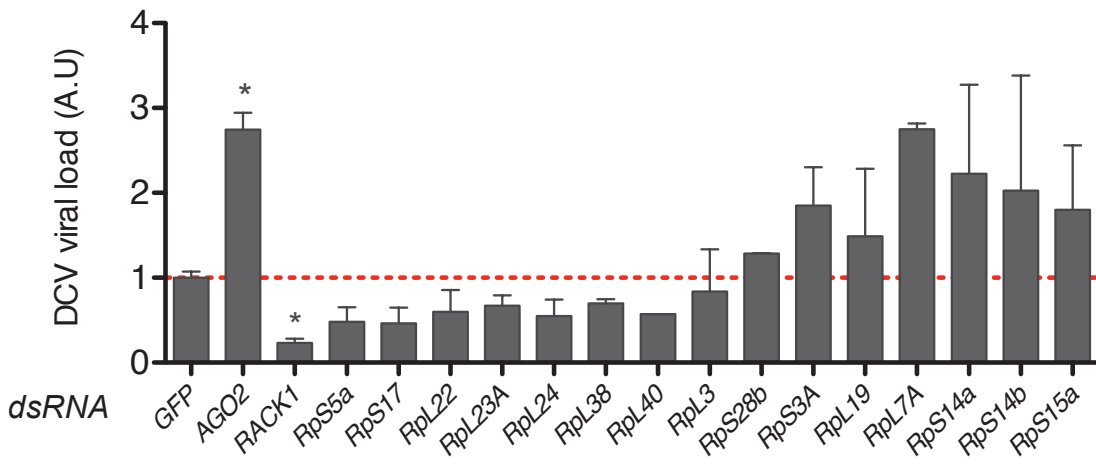


FIGURE 2

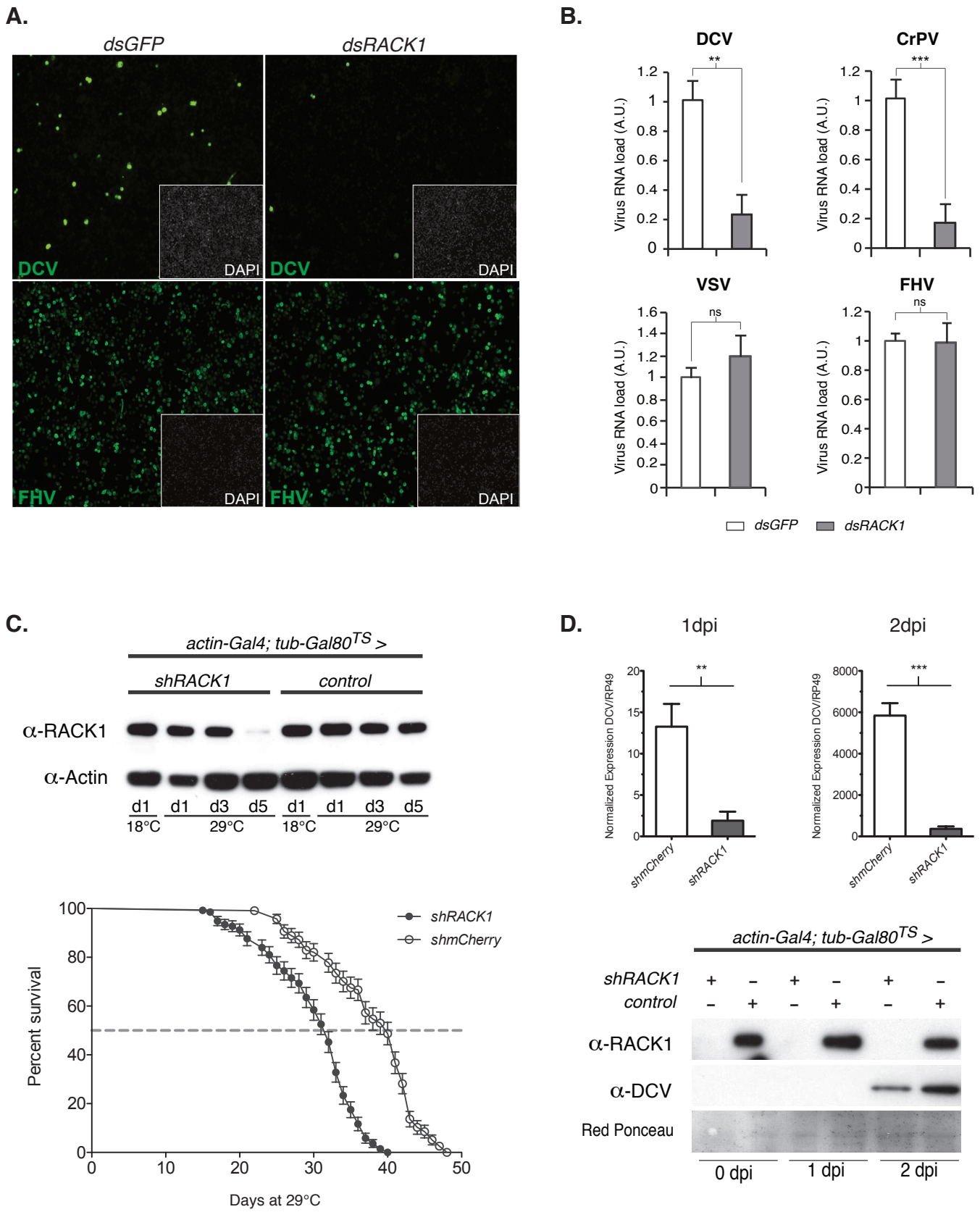
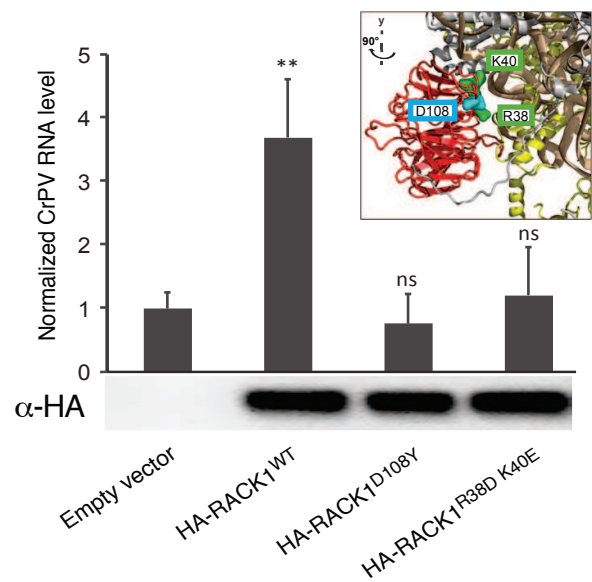
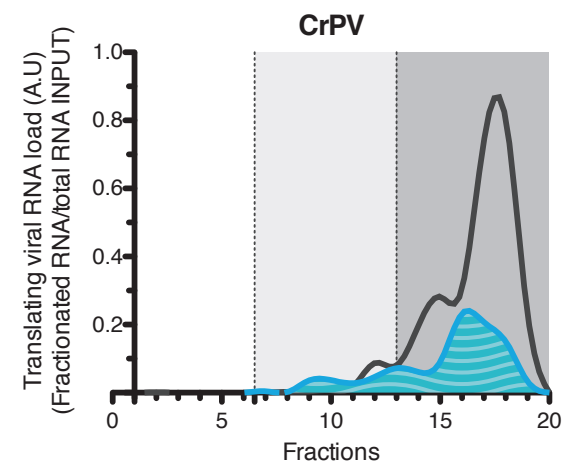
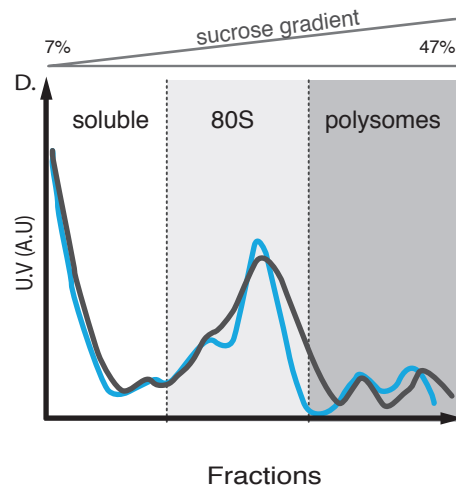


FIGURE 3

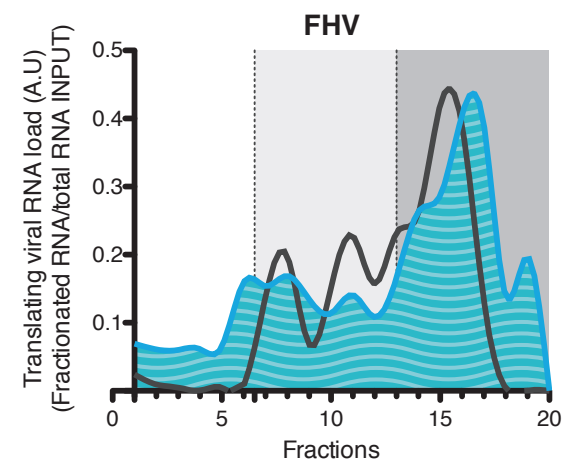
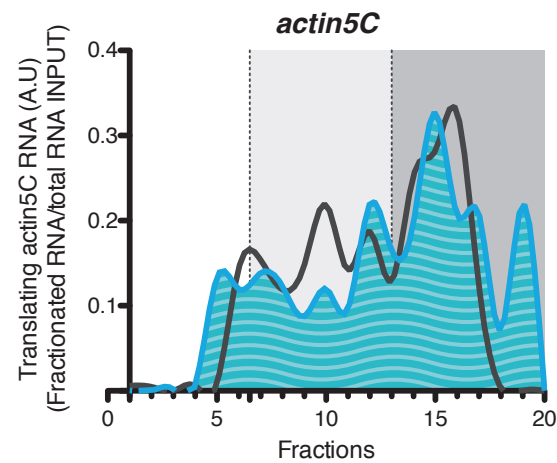
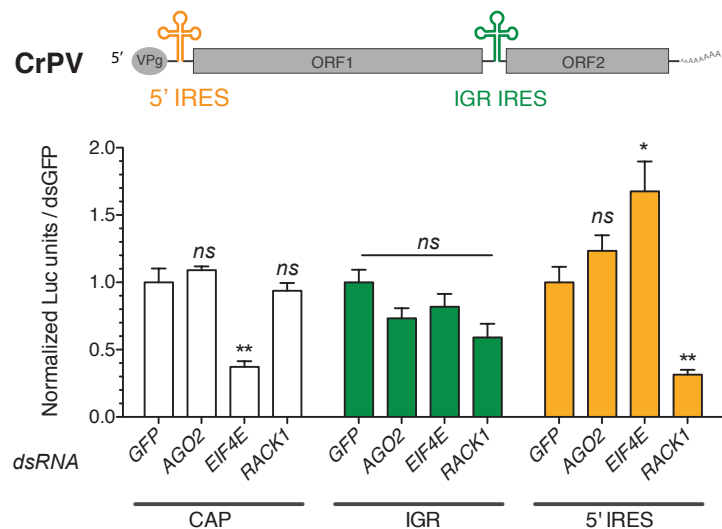
A.



B.



C.



— no *shRNA* — *shRACK1*

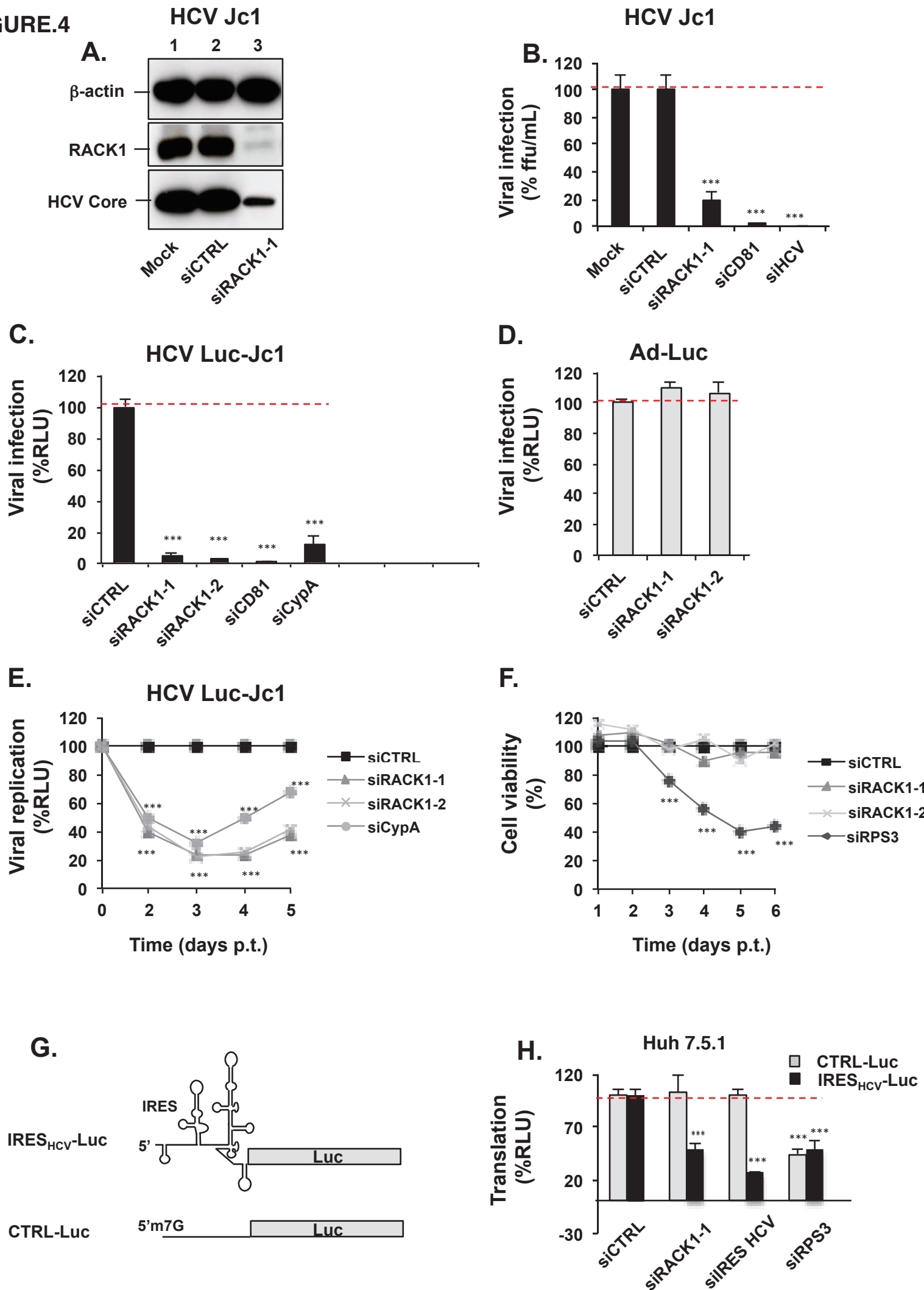
FIGURE.4

FIGURE 5

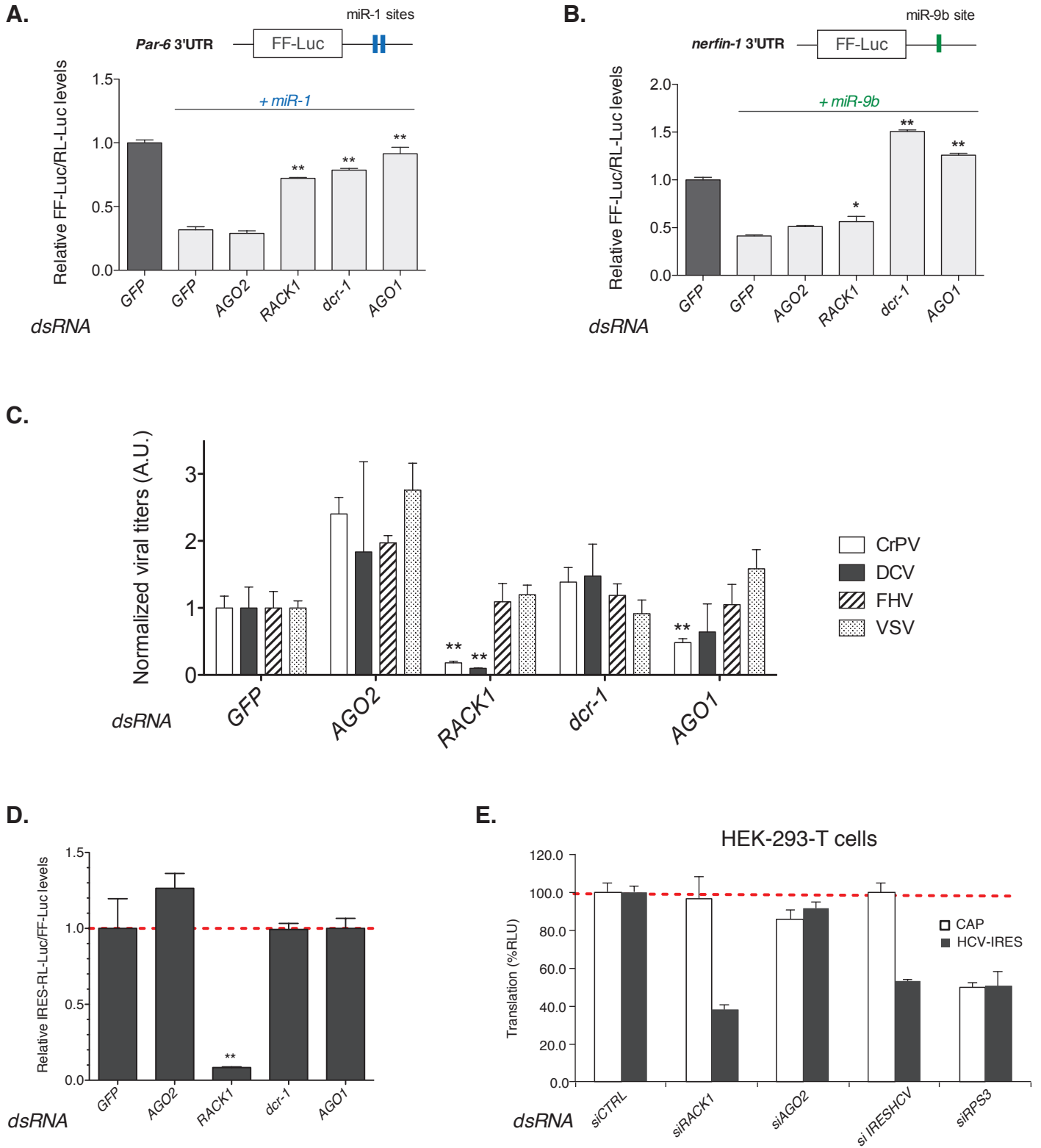
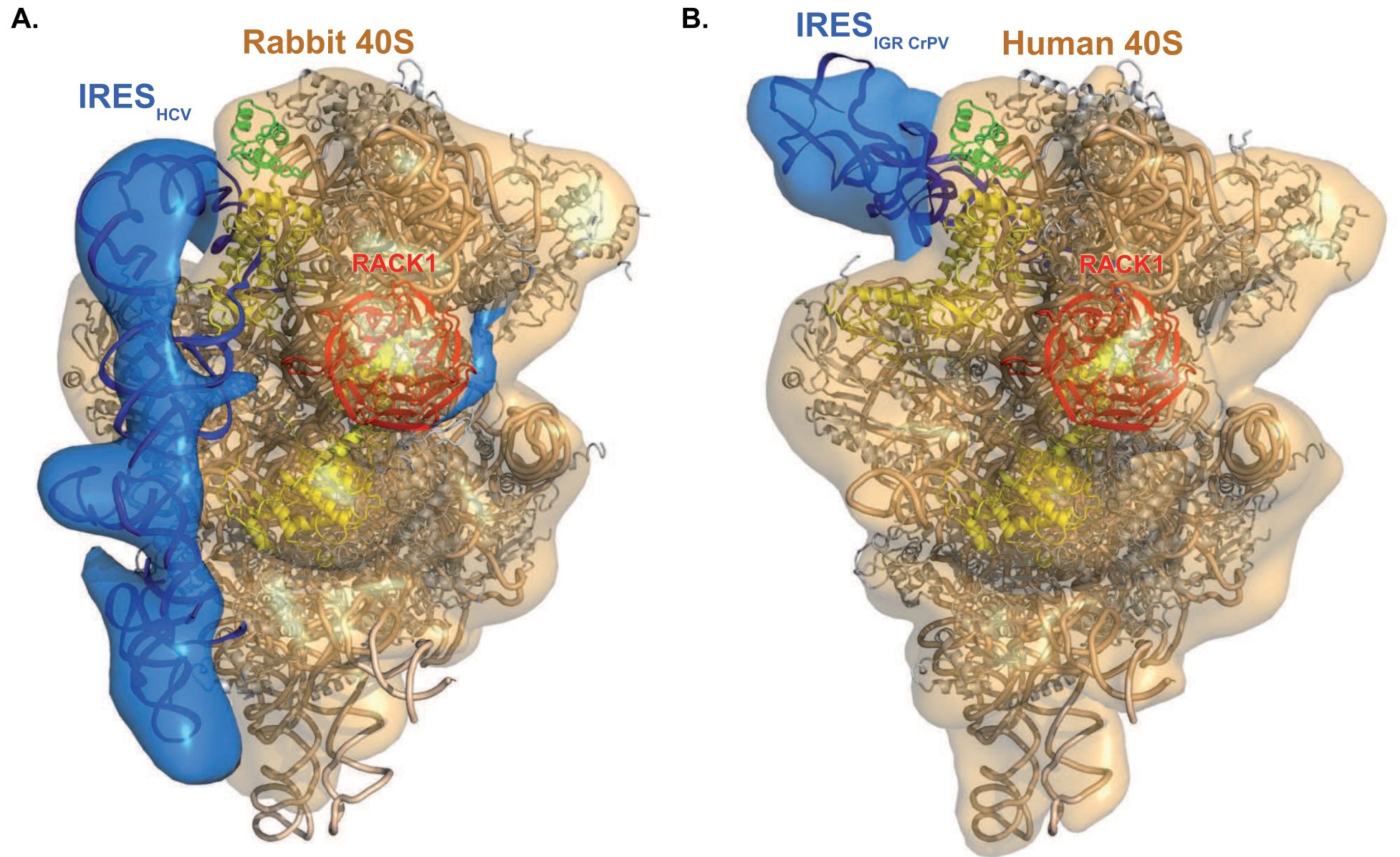


FIGURE 6



Supplementary Figure 1.

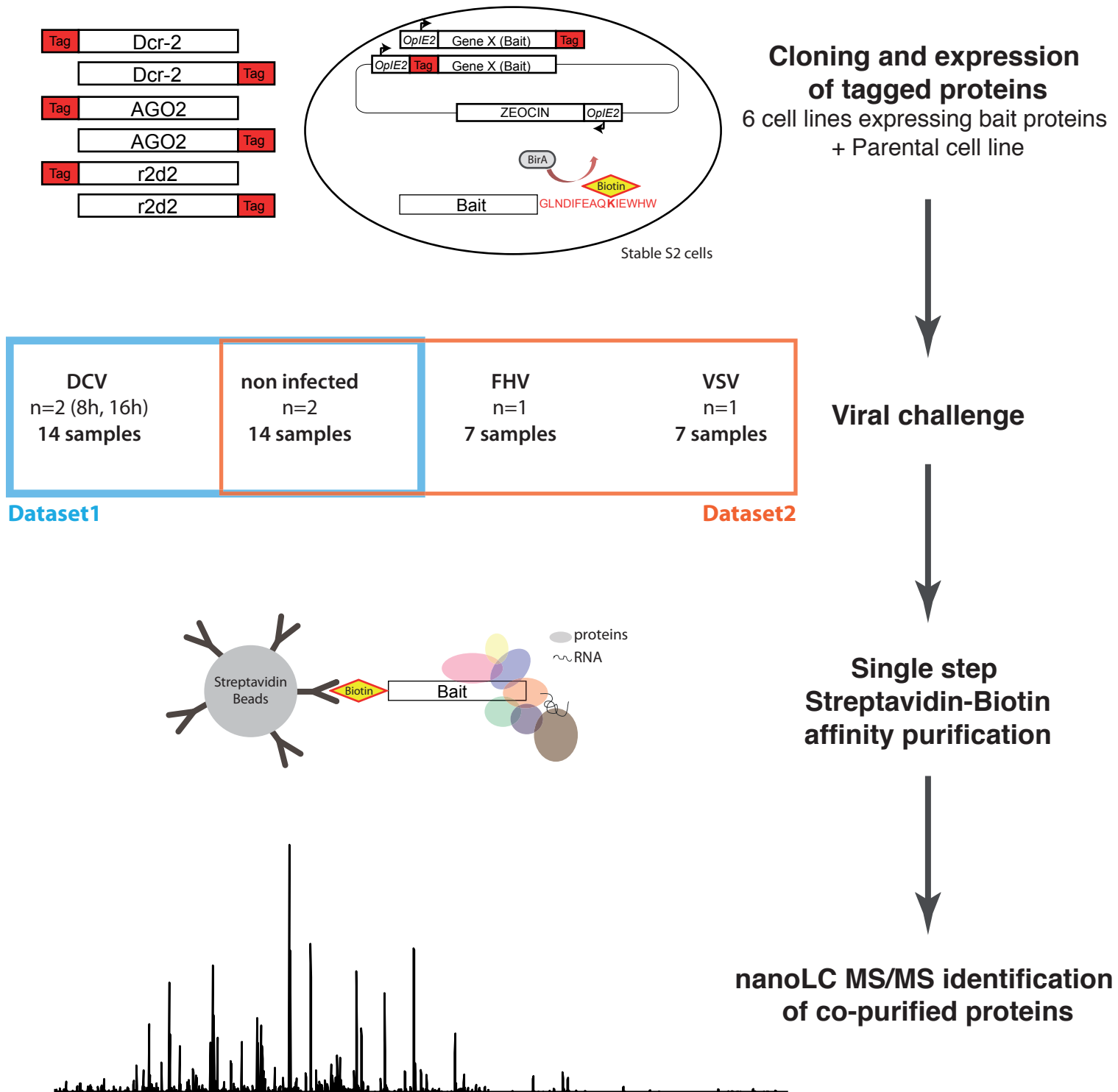


Fig. S1. Strategy used to define the siRNA pathway interactome. The bait proteins (Dcr-2, AGO2 and r2d2) were tagged at their amino- or carboxy-terminal extremities with a 15 amino-acid biotinylation target sequence (in red, with modified Lys in bold). S2 cells expressing the bacterial biotin ligase BirA were stably transfected with the corresponding expression constructs. Cells were then either non-infected or infected with DCV (8h and 16h), FHV (16h) or VSV (48h). Cell lysates were affinity purified in a single step on streptavidin beads, digested with trypsin, and analyzed by nanoLC MS/MS on a FT ICR mass spectrometer.

Supplementary Figure 2

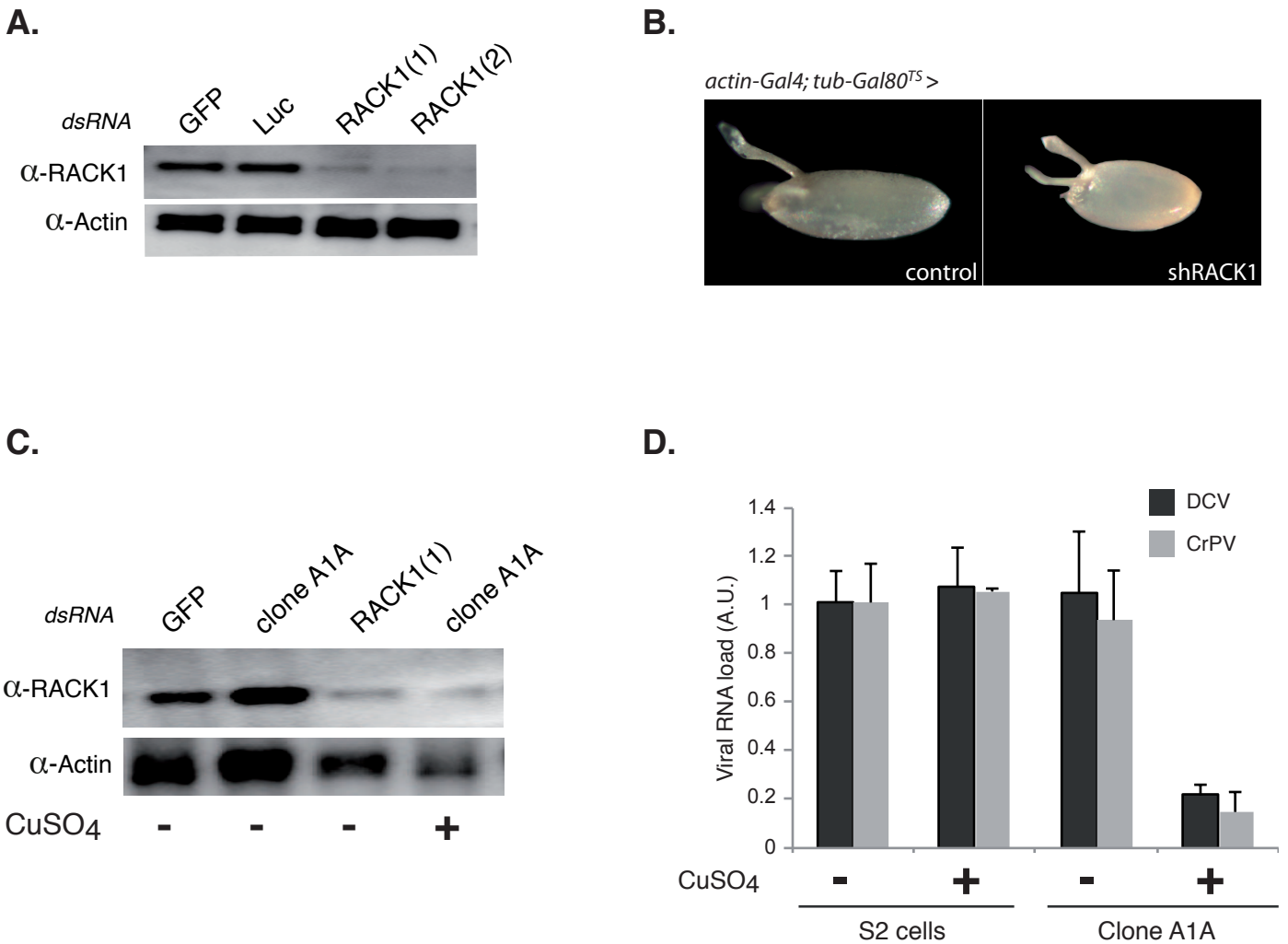


Fig. S2. Silencing of RACK1 expression in drosophila. (A) RACK1 expression was silenced in S2 cells by incubating cells with two preparations of dsRNA targeting different regions of RACK1 for 4 days. RACK1 expression was monitored by western blot using specific anti-RACK1 antibodies. (B) Embryos laid by shRACK1 expressing females show a dorsalized phenotype, similar to RACK1 mutants. (C) Silencing of RACK1 with the same shRNA targeting the 5' UTR from the RACK1 gene as in panel b in stably transfected S2 cells. Expression of the shRNA is driven by the copper-inducible metallothionein promoter. Data from a representative clone (A1A) are shown. Bathing with dsRNA targeting RACK1 is used as a positive control. (D) Reduced viral replication of DCV and CrPV in shRACK1-expressing S2-A1A cells. Data show the mean and s.e.m. of three independent infections.

Supplementary Figure 3

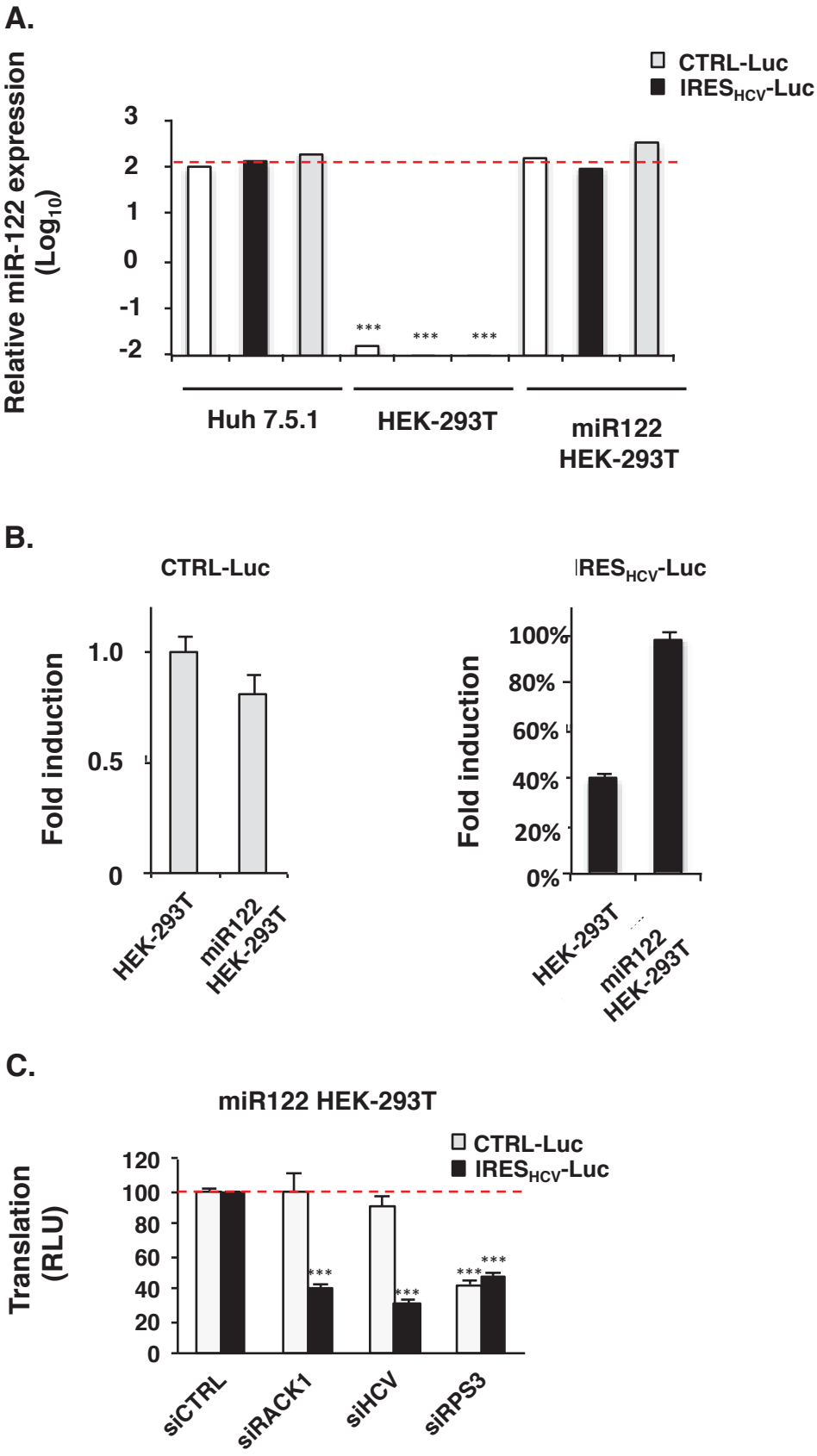


Fig. S2. miR122 complementation of HEK-293T cells stably transfected with an IRES_{HCV}-luciferase reporter construct (black bars) or a classical capped reporter gene (grey bars). A. miR122 quantification by quantitative RT-PCR in Huh 7.5.1, HEK-293T and miR122 complemented HEK-293T cells (miR122 HEK-293T), *** p <0.001. B. Translation level of capped or IRES dependent reporters in mir122-HEK-293T compared to miR122 deficient HEK-293T cells, translation was monitored 72h later by luciferase activity quantification. C. miR122 complemented HEK-293T cell lines stably expressing an IRES (IRES_{HCV}-Luc) or a 5'cap-translated (CTRL-Luc) luciferase reporter gene were transfected with siCTRL, siRACK1, siHCV or siRPS3. Translation was monitored 72h later by luciferase activity quantification, *** p <0.001.

The ribosomal protein RACK1 is a specific host factor required for IRES-mediated translation of fly and human viruses.

Majzoub *et al.*

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Molecular cloning

cDNAs from the *Dcr-2*, *AGO2* and *r2d2* genes were amplified by standard PCR and inserted into a pDONR221 vector (Invitrogen) using the Gateway® cloning technology (see Table S2 for the sequence of all primers used in this study). The PCR fragments were recombined (BP reaction) with pDONR221 to obtain pENTRY-N-Dcr-2, pENTRY-N-AGO2, pENTRY-N-r2d2 or pENTRY-Dcr-2-C, pENTRY-AGO2-C and pENTRY-r2d2-C, and sequenced. An insect expression vector was then generated: the pDEST vectors pDEST-BIO-N or pDEST-BIO-C are based on the pIZ/V5-His (Invitrogen)-backbone and contain the biotin-tag sequence (encoding the GLNDIFEAQKIEWHE peptide) at the 5' or 3' end of the *ccdB* gene, a chloramphenicol resistance gene flanked by *attR1* and *attR2* sites, and DCV intergenic internal ribosomal entry site fused with a truncated cDNA encoding the transmembrane and cytoplasmic region of human CD4, to allow sorting of stably transfected cells.

To construct the IRES_{CrPV-IGR} reporter vector, the Renilla Luciferase- IRES_{CrPV-IGR} - Firefly Luciferase cassette was amplified from the pSRT208 plasmid (Landry et al., 2009), with primers containing KpnI and NotI restriction sites, and inserted into the corresponding sites of the pACT5C-His vector. Regarding the IRES_{CrPV-5'}, cDNA

was prepared from CrPV infected cells, and used as template for PCR with primers complementary to the IRES_{CrPV-5'} (See Table S2). The PCR product was cloned in a pRL-ACT5C vector giving pACT5C- IRES_{5'CrPV} - Renilla Luciferase. Importantly, the Met initiator codon of the Renilla Luciferase was deleted and replaced by the first 16 codons of the CrPV ORF1 protein. All plasmids were verified by sequencing.

The plasmid containing the shRNA targeting the 5'UTR of the *RACK1* gene was constructed by annealing the two oligos pre-designed by the TRiP project (<http://www.flyrnai.org/TRiP-TTR.html>) (Ni et al., 2011) (see Table S2) and flanked by SpeI and EcoRI restriction sites and ligating them between the corresponding sites of the *Drosophila* pMT-V5His vector (Invitrogen). Stable S2 cell lines bearing the plasmid were selected as described (Dimarcq et al., 1997).

The RACK1 variants (R38D K40E and D108Y) unable to bind to the ribosome were constructed by site directed mutagenesis using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The residues R38, K40, and D108 from *Drosophila* RACK1 correspond to the previously characterized residues R36, K38 and D109 from yeast RACK1 (Asc1p) (Coyle et al., 2009; Kuroha et al., 2010). Briefly, a wild-type *RACK1* cDNA clone (ORF from DmRACK1 cloned in pDONR221) was used as a template for the PCR using the mismatched primers listed in Table S2. The DONOR clones were verified by sequencing, and then recombined using the Gateway LR reaction to pAHW plasmid (from the *Drosophila* Gateway collection) to express with the *Actin5C* promoter N-terminally HA tagged versions of RACK1 wt or mutants. The same DONOR clones were used to generate plasmids ready to inject in fly embryos (Genetic Services), for transgenesis based on the *phiC31* system. The resulting vectors express RACK1 with an N-terminal HA tag, from the *HSP* promoter.

Reporter plasmids bearing the HCV IRES and the 14 first nucleotides of the HCV core sequence (nt 343 to 357) fused to a luciferase reporter gene (IRES_{HCV}-Luc) or control plasmid expressing the luciferase reporter gene (CTRL-Luc) have been described (Wolf et al., 2008). IRES_{HCV}-Luc and CTRL-Luc encode an IRES-translated mRNA and a cap-dependent mRNA, respectively (Figure 4G). Plasmids were stably transfected into Huh7.5.1 cells using geneticin® (Sigma) selection. Cells were then reverse transfected with 10nM siRNA specific for RACK1 (siRACK1), HCV IRES (siHCV), ribosomal protein RPS3 (siRPS3) or with control siRNA (siCTRL). Three days later, IRES-mediated and cap-dependent translation were analyzed by luciferase activity of the reporter gene in cell lysates as described (Wolf et al., 2008).

Cell lines, transfection and luciferase assays

Drosophila S2 cells (Invitrogen) were transfected with plasmid DNAs by the CaPO₄ precipitation method. 1F3 cells were obtained upon transfection of S2 cells with the pPAC-HA-BirA plasmid encoding the biotin ligase BirA, the Attacin A-luciferase reporter plasmid pJL169 and the puromycin selection plasmid pJL1. The expression vectors pDEST-BIOTIN-N-or-C Dcr-2, AGO2 and r2d2 were transfected into the parental 1F3 cell line and stable clones were selected firstly with zeocine (125 µg.mL⁻¹) and puromycin (1 µg.mL⁻¹), and secondly by flow cytometry monitoring the expression of hCD4 (clone RPA-T4; GE Healthcare). After three rounds of flow cytometry screenings, clones giving moderate and stable expression profiles were characterized by western blot for the expression of the tagged proteins. Stable cell lines containing the vector expressing the inducible shRNA targeting the 5'UTR of RACK1 were also selected with puromycine. The selected clones were subsequently

tested for the depletion of RACK1 following the addition of CuSO₄ (0.5mM) to the medium.

Reporter plasmids to monitor activity of the two CrPV IRES were transfected in *Drosophila* S2 cells soaked in dsRNA targeting *GFP* or *RACK1*. 48 hours later, cells were lysed and luciferase activity was measured with the Promega dual-luciferase assay, using a Berthold Luminometer. Reporter plasmid to monitor activity of the IRES_{HCV} contained the IRES and the 14 first nucleotides of core sequences fused to the firefly luciferase reporter gene (IRES_{HCV}-Luc), whereas the control plasmid expressed a 5' cap-dependent firefly luciferase reporter gene (CTRL-Luc), as described (Wolf et al., 2008). These reporter plasmids were stably transfected in Huh7.5.1 cells using geneticin® selection. The cells were then reverse transfected with 10nM siRNAs (Silencer® Select siRNA, Ambion) specific for either RACK1 (siRACK1), ribosomal protein RPS3 (siRibo) or control (siCTRL). Three days later, cell lysates were tested for IRES-mediated and cap-dependent translation using luciferase activity.

Protein purification and identification by Mass Spectrometry

Cells expressing the bait proteins were either mock infected or infected with DCV at multiplicity of infection (MOI) 1 for 8 or 16h, with FHV at MOI 0.1 for 16h or with VSV at MOI 10 for 48h. Protein purification and identification was performed as described (Fukuyama et al., 2012). Briefly, 20 million cells for each condition were lysed in 1mL of TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 100 mM NaF, 5 µM ZnCl₂, 1mM Na₃VO₄, 10mM EGTA, pH8.0, Complete Protease Inhibitor Cocktail containing EDTA from Roche). Lysates were

kept on ice for 30 min then centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Supernatants were mixed with 150µl of pre-washed streptavidin–sepharose beads and incubated for 30 min at 4 °C in a rotative agitator. Beads were washed three times with 1mL Wash buffer I (50 mM Tris–HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.1% Triton X-100, 100 mM NaF, 5µM ZnCl₂, 1mM Na₃VO₄, 10mM EGTA, pH8.0), one time with 1mL Wash buffer II (Wash buffer I without Triton X-100), and suspended in 1mL Wash buffer II plus Complete Protease Inhibitor Cocktail containing EDTA. The on-beads tryptic digestion method was used on the purified samples (Fukuyama et al., 2012). After reduction/alkylation (DTT, 5mM final, 30 min, 56 °C/ Iodoacetamide 25mM final, 20 min in the dark), 10ng trypsin (modified sequencing grade, Roche) in 150mM ammonium carbonate was added and samples were incubated overnight at 37°C with shaking. Then, the reaction was stopped with 10µL 10% formic acid (FA). Peptides were recovered and the beads were discarded by filtering through C18 Tips (Proxeon). Peptides were eluted with 20µL 50% methanol, 5% FA. 5µL of peptides diluted 1:5 in water (5% of the total amount of material) were purified on a capillary reversed phase column (nano C18 Acclaim PepMap100 Å; 75µm internal diameter, 15cm length; Dionex), at a constant flow rate of 220nL.min⁻¹, with a gradient 2% to 40% buffer B (water/acetonitrile/FA 10:90:0.1 (v:v:v)) in buffer A (water/acetonitrile/FA 98:2:0.1 (v:v:v)) over 45min.

The MS analysis was performed on a FT ICR mass spectrometer (LTQ-FT Ultra, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) with the top 7 acquisition method: MS resolution 60,000; mass range 500-2000 Th; followed by 7 MS/MS (LTQ) on the 7 most intense peaks, with a dynamic exclusion for 90s. The raw data were processed using Xcalibur 2.0.7 software and Mascot deamon. Each sample was first analyzed in triplicate then an exclusion list was added for three next runs. The database search

was done on merged data using Mascot search engine (Matrix Science Mascot 2.3) on the 17D melanogaster database (16535 sequences) concatenated with protein sequences of DCV, FHV and VSV. Proteome Discoverer 1.3 (ThermoFisher Scientific) and Mascot were used to search the data and filter the results. The following parameters were used: up to 2 miss cleavages; MS tolerance 10ppm; MSMS tolerance 1Da; full tryptic peptides; partial modifications: carbamidomethylation (C), oxidation (M, H, W), Phosphorylation (Y). Validation was performed on proteins identified using two filters: (1) only proteins identified with a FDR<1% (Peptide Validator Mascot significance threshold) and at least 1 peptide score above 30 were selected; (2) only proteins identified with 2 distinct sequences with ion score above 30, or 1 sequence with ion score above 30 with and a MudPIT score above 49. Proteins identified by a peptide matching another protein were not taken into account and were filtered out for gene selection and subsequent validation tests. According to a preliminary study (data not shown), proteins that passed filter (2) and not filter (1) were manually checked: they were validated if the identified sequence was specific to the associated gene after control of the MS/MS spectrum (see Table S1). Protein that passed filter (1) and not the more stringent filter (2) were not considered. All proteomic raw data are available in the Pride database under accession numbers 24806-24848 (<http://www.ebi.ac.uk/pride>).

RNAi experiments and viral titer quantification

dsRNA against selected genes were designed using the online E-RNAi algorithm developed by Boutros and collaborators (<http://www.dkfz.de/signaling/e-mai3/>). cDNAs were prepared from S2 cells or OregonR flies and DNA templates

were obtained by touch-down PCR using sets of primers containing the T7 polymerase recognition sequence at their 5' end. The list of primers used and their sequence is presented in Table S2. dsRNAs were then synthesized using the T7 MegaScript® (Ambion) and annealed. Products length for both DNA and dsRNA was verified by agarose gel electrophoresis. 30,000 S2 cells were bathed in 30µL of serum-free medium containing 3µg of dsRNA per well of a 96-well plate for 45 min. The soaked cells were then supplemented with 170µL complete medium and incubated 4 days at 24°C (Boutros et al., 2004). Validation of RACK1 silencing was done by western blot, using a specific anti-DmRACK1 rabbit antiserum (Kadmas et al., 2007). Silenced cells were infected with DCV (MOI 1), CrPV (MOI 1), FHV (MOI 0.1) or VSV (MOI 10) for either 16 h (DCV, CrPV and FHV) or 48 h (VSV). Viral RNA load was measured by qRT-PCR using the “Cell to Ct” SYBR green kit (Ambion), according to the manufacturer’s instructions, on a CFX384 Touch™ Real-Time PCR platform (Bio-Rad). The virus specific primers used in this analysis are listed in Table S2. Normalization was performed with the housekeeping gene *RpL32*. At least three independent biological replicates were performed for each experiment.

For DCV and FHV, immunofluorescence experiments were performed as follows: infected cells were washed twice with PBS, then fixed for 10 min with a 4% solution of paraformaldehyde (PFA). Blocking was performed by incubation of the fixed cells with PBS supplemented with 10% FCS. Cells were then washed twice and incubated for 2h at room temperature with the primary antibody (@ DCV VP2 (Dostert et al., 2005) or FHV CP (Krishna et al., 2003), 1/5000). Cells were washed twice then incubated with an anti-rabbit FITC coupled secondary antibodies for 1h. Images were acquired using the InCELL1000 Analyzer workstation (GE

LifeSciences). Image data processing was performed using the InCELL Analyzer software.

Toxicity assay

Cytotoxic effects of gene silencing on cells were assessed, day 1 to 6 post siRNA transfection, in triplicate by analyzing their ability to metabolize 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma). Formazan crystals were solubilized 5 h after adding MTT (0.6 mg.mL⁻¹) as described (Lupberger et al., 2011).

Polysome profiling

S2-C7A or S2 cells \pm 0.5mM CuSO₄ were stimulated for 5 days then challenged with FHV (MOI 0.1) or CrPV (MOI 1). 16 hours post-infection cells were treated with 100 μ g/mL cycloheximide in PBS for 10 minutes and kept on ice. After centrifugation, cell pellets were frozen in liquid nitrogen. Then, lysis buffer containing 5mM HEPES, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 2mM dithiothreitol, 100 μ g/mL cycloheximide, protease inhibitor and 1U/ μ L RNAsine, adjusted at pH 7.2 was added. After centrifugation, lysates were collected and put into 7-47% sucrose gradients containing 5mM HEPES, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100 and 2mM dithiothreitol. Gradients and lysates were ultracentrifuged for 2h30 at 37,000 rpm and fractions were collected and monitored using BioRad Econo UV monitor.

RNAs from twenty polysomal fractions were precipitated with Guanidine-HCl 8M and absolute ethanol. Input and polysomal RNA were then purified with

Macherey - Nagel DNA purification kit. RNAs were quantified and 200ng of RNAs of every fraction were used for reverse transcription. A quantitative PCR with specific primers was then performed. Quantification values of each fraction were normalized to the relative quantity of viral RNAs detected in the input of each condition.

HCV infection and replication assays

Huh7.5.1 human hepatoma cells were infected with cell culture-derived HCV (HCVcc strains Jc1 and Luc-Jc1, half-maximal tissue culture infectious dose (TCID₅₀ 10⁴ mL⁻¹ for both viruses)) as described (Lupberger et al., 2011; Pietschmann et al., 2006). 2 days before infection, gene silencing was performed by reverse transfection with 10 nM of siRNA (all from Ambion®) specific for RACK1 (siRACK1-1 : 5'-CAGGCUAUCUGAACACGGU-3' and siRACK1-2: 5'-CAAACACCUUUACACGCUA-3'), HCV host entry factor CD81 (siCD81) (Koutsoudakis et al., 2007), HCV replication factor Cyclophilin A (siCypA) (Kaul et al., 2009), HCV IRES (siHCV) (Dimitrova et al., 2008) or a nonspecific control siRNA (siCTRL) (Lupberger et al., 2011). Viral infection and RACK1 depletion was analyzed by western blotting and quantified by counting of focus forming units (ffu)/mL following immunostaining using a HCV core-specific antibody (for HCV Jc1) (mAbC7-50, Affinity BioReagents, CO, USA) or by luciferase reporter gene expression in cell lysates (for Luc-Jc1) 3 days post incubation with virus as described (Koutsoudakis et al., 2007). For analysis of HCV replication, Huh7.5.1 cells were electroporated with replication-competent HCV Luc-Jc1 RNA (Koutsoudakis et al., 2007). Three days later, cells were reverse transfected with the siRNAs described above. Viral replication was analyzed day 0 to 5 post transfection by quantification of luciferase activity (Benga et al., 2010).

miR122 quantification

Real time PCR quantification of mature miR-122 was performed using the miScript PCR System (Qiagen). Total RNA was isolated from the different cell lines by using the TRIzol[®] reagent (Invitrogen[™]) and then subjected to reverse transcription step by using the miScript II RT Kit (Qiagen) with the miScript HiSpec Buffer, according to the manufacturer's recommendations. The obtained cDNA was used as a template in real time PCR experiment for mature microRNAs quantification, by using the miScript SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen) and the suitable miScript Primer Assays (miR-122 or RNU6). Each sample was assayed in triplicate for each single experiment. Real time PCR experiments were performed in the Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen) and the data were analyzed in the Rotor-Gene software by using the comparative Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) method.

Adenovirus infection

Recombinant adenovirus expressing a luciferase reporter gene under the CMV promoter (Ad-Luc) was transduced as described using an MOI of 2.5 (Wolf et al., 2008). Adenovirus cDNA was obtained from Vector Biolabs[®] (Philadelphia, USA). Gene silencing was performed as described above. Infection was analyzed 3 days post incubation with virus by quantification of luciferase activity.

Fly stocks

The TRiP lines (shRACK1 (#34693), shmCherry (#35787)) were obtained from the Bloomington *Drosophila* stock center. The drivers used were Actin5C-Gal4/CyO, Actin5C-Gal4/CyO; Tub-Gal80ts/TM6Tb. Transgenic lines for expression of HA-RACK1 wt or mutants were inserted at *attP2* sites (68A4 on 3L) (Genetic Services). Expression of HA-RACK1 wt, but not the mutants, rescued the developmental defects of *RACK1*^{1.8} null mutant flies (Kadmas et al., 2007). All flies used were *Wolbachia*-free.

IRES – 40S structural model

To build the near-atomic resolution model of the HCV IRES – 40S complex, we used the cryoelectron microscopy (cryoEM) structure of the IRES_{HCV}-40S (rabbit) complex at 20Å resolution (Spahn et al., 2001). An atomic model of the IRES structure (described thereafter) and the atomic model of the human ribosome obtained by cryoEM at 4.8Å resolution (Anger et al., 2013) were fitted inside its electron density. The obtained complete IRES-40S model provided the basis for the analysis of the IRES_{HCV} interaction with the 40S ribosomal subunit, more specifically with the platform of the 40S, where RACK1 is located. Indeed, while for other regions of the ribosome a great variability is observed between different species (Ben-Shem et al., 2011), the platform is highly conserved and the main source of variability resides in the length of h26 of the 18S rRNA (Marzi et al., 2007). After having placed the 40S structure from human in the corresponding density of the rabbit 40S, an improved fitting was obtained using the UCSF Chimera package (Pettersen et al., 2004). As expected, the 40S platform showed a very good fitting.

Only fragments of the IRES_{HCV} structure have been reported so far. We therefore built a model of the IRES using the cryo-EM structure as a guide, as described (Berry et al., 2011). We used the structure of the individual domains from the IRES_{HCV}, solved by NMR and X-ray crystallography (Berry et al., 2011; Collier et al., 2002; Kieft et al., 2002; Lukavsky et al., 2003; 2000; Rijnbrand et al., 2004) and the cryo-EM difference density map of the IRES_{HCV} (Spahn et al., 2001) to produce a model of the IRES_{HCV} including all major domains bound to the 40S ribosomal subunit. To correctly place the different domains in the IRES density, domains II (1P5P), III_d (1F84), III_{abc} (1KH6), III_b (1KP7) and the central pseudoknot (3T4B) were manually modeled into the cryo-EM difference density as follows. Domain II has been placed at the top of the IRES (as visualized in Figure 6), extending toward the ribosomal E-site followed by the central pseudoknot and the branching-out domain III_d. Domains III_{abc} and III_b are located at the bottom of the IRES density. Figure 6 has been generated by PyMol (Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

Supplementary references

Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 497, 80–85.

Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 1524–1529.

Benga, W.J., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., et al. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51, 43–53.

Berry, K.E., Waghray, S., Mortimer, S.A., Bai, Y., and Doudna, J.A. (2011). Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning.

Structure 19, 1456–1466.

Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S.A., Paro, R., and Perrimon, N. (2004). Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303, 832–835.

Collier, A.J., Gallego, J., Klinck, R., Cole, P.T., Harris, S.J., Harrison, G.P., Aboul-Ela, F., Varani, G., and Walker, S. (2002). A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nature Structural Biology* 9, 375–380.

Coyle, S.M., Gilbert, W.V., and Doudna, J.A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 29, 1626–1634.

Dimarcq, J.L., Imler, J.L., Lanot, R., Ezekowitz, R., Hoffmann, J.A., Janeway, C.A., and Lagueux, M. (1997). Treatment of I(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 877–886.

Dimitrova, M., Affolter, C., Meyer, F., Nguyen, I., Richard, D.G., Schuster, C., Bartenschlager, R., Voegel, J.C., Ogier, J., and Baumert, T.F. (2008). Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16320–16325.

Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature Immunology* 6, 946–953.

Fukuyama, H., Ndiaye, S., Hoffmann, J., Rossier, J., Liuu, S., Vinh, J., and Verdier, Y. (2012). On-bead tryptic proteolysis: An attractive procedure for LC-MS/MS analysis of the *Drosophila* caspase 8 protein complex during immune response against bacteria. *J Proteomics* 75, 4610–4619.

Kadmas, J.L., Smith, M.A., Pronovost, S.M., and Beckerle, M.C. (2007). Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. *Dev Dyn* 236, 2207–2215.

Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J., and Bartenschlager, R. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathogens* 5, e1000546.

Kieft, J.S., Zhou, K., Grech, A., Jubin, R., and Doudna, J.A. (2002). Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature Structural Biology* 9, 370–374.

Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *Journal of Virology* 81, 588–598.

- Krishna, N.K., Marshall, D., and Schneemann, A. (2003). Analysis of RNA packaging in wild-type and mosaic protein capsids of flock house virus using recombinant baculovirus vectors. *Virology* 305, 10–24.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* 11, 956–961.
- Landry, D.M., Hertz, M.I., and Thompson, S.R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes & Development* 23, 2753–2764.
- Lukavsky, P.J., Kim, I., Otto, G.A., and Puglisi, J.D. (2003). Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nature Structural Biology* 10, 1033–1038.
- Lukavsky, P.J., Otto, G.A., Lancaster, A.M., Sarnow, P., and Puglisi, J.D. (2000). Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nature Structural Biology* 7, 1105–1110.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature Medicine* 17, 589–595.
- Marzi, S., Myasnikov, A.G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M., and Klaholz, B.P. (2007). Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell* 130, 1019–1031.
- Ni, J.Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L. P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., et al. (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nature Methods* 8, 405–407.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605–1612.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., et al. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7408–7413.
- Rijnbrand, R., Thiviyanathan, V., Kaluarachchi, K., Lemon, S.M., and Gorenstein, D.G. (2004). Mutational and structural analysis of stem-loop IIC of the hepatitis C virus and GB virus B internal ribosome entry sites. *Journal of Molecular Biology* 343, 805–817.
- Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291, 1959–1962.
- Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2008). The major form of

hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Research* 36, 3054–3064.

Annexe II

TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus

Daniela Ploen¹, Mohamed Lamine Hafirassou^{2,3}, Kiyoshi Himmelsbach¹, Daniel Sauter⁴, Martin L. Biniossek⁵, Thomas S. Weiss⁶, Thomas F. Baumert^{2,3,7}, Catherine Schuster^{2,3}, Eberhard Hildt^{1,*}

¹Paul-Ehrlich-Institut, Dept. of Virology, Langen, Germany; ²Inserm, U748, Strasbourg, France; ³Université de Strasbourg, France; ⁴University of Freiburg, Dept. of Internal Medicine II, Freiburg, Germany; ⁵University of Freiburg, Inst. for Molecular Medicine and Cell Research, Freiburg, Germany; ⁶University of Regensburg Hospital, Department of Pediatrics, Center for Liver Cell Research, Regensburg, Germany; ⁷Pôle hépato-digestif des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

Background & Aims: Hepatitis C virus (HCV) replication/morphogenesis takes place at the membranous web. Viral genome replication occurs in replicon complexes on the cytoplasmic face of the ER whereas HCV assembly is located on the surface of lipid droplets (LDs). This raises the question about targeting of *de novo* synthesized viral genomes from the replicon complex to LDs and cellular proteins involved in this process such as the LD-associated protein TIP47, also known as cytoplasmic sorting factor.

Methods: Viral replication was studied in HuH7.5 cells using the infectious HCV JHF1 culture system. Proteome analysis was performed by 2D gel electrophoresis and mass spectrometry. Expression of target genes was modulated by siRNA or lentiviral transduction. Confocal microscopy was performed for analysis of subcellular compartments. Protein/protein interactions were studied by co-immunoprecipitations, affinity chromatography, and yeast two-hybrid screens.

Results: Proteome based analysis revealed that HCV replicating cells contain less TIP47 compared to control cells. However, expression analyses demonstrated an increased TIP47 expression in HCV replicating cells. TIP47 binds to RNA-loaded NS5A. Mapping of the binding domain revealed that NS5A binds to the N-terminal PAT domain of TIP47. Overexpression of TIP47 increases the amount of released viruses, while silencing of *TIP47* decreases the amount of released infectious particles. Complete knockdown of TIP47 expression abolishes virus replication.

Conclusions: TIP47 plays an essential role in the HCV life cycle. © 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. At present, more than 170 million people are persistently infected with HCV worldwide. HCV is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus in the *Hepacivirus* genus of the *Flaviviridae* family [1].

The viral RNA encodes for a large polyprotein precursor of approximately 3100 amino acids that is co- and/or post-translationally cleaved by cellular and viral proteases into the mature structural (core, E1, E2) and p7 protein and non-structural (NS) proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) [1,2]. The structural proteins form the viral particle, whereas the NS proteins participate in viral replication and assembly processes [3–5].

Genome replication occurs in replication complexes (RCs) localized on the cytoplasmic face of specialized membranes of the endoplasmic reticulum (ER), the so called membranous web. The HCV NS-protein 5A (NS5A) is an essential and integral component of the replicon complex. Moreover, NS5A has an RNA-binding domain and is therefore supposed to play an essential role for the transfer of the viral genome from the RCs to the surface of the lipid droplets (LDs) that play a key function for the life cycle of HCV. NS5A is composed of three domains (DI, DII, DIII). DI and DII are essential for genome replication, whereas DIII is dispensable [6]. Virus morphogenesis, however, requires the functionality of DI and DIII. It is assumed that DI mediates the interaction of NS5A with LDs, while DIII enables the interaction between NS5A and core on the LD surface.

An interesting aspect of HCV is the relation between HCV life cycle and hepatocyte lipid metabolism. HCV replication takes place at specialized intracellular ER membranes called membranous web [7,5], enriched in proteins involved in Very Low Density Lipoproteins (VLDL) assembly, i.e., apolipoprotein (apo)B, apoE, and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) [8]. Recently, it was observed that NS5A directly interacts with apoE [9].

Moreover, the LD – an organelle for the storage of neutral lipids – acts as an assembly platform for HCV and thus plays an important role for the morphogenesis of HCV [7,10,11]. The viral core protein is addressed to LDs via diacylglyceroltransferase 1 [12] and recruits NS proteins to LD-associated membranes, a crucial step for virus morphogenesis. Several studies have shown the

Keywords: Hepatitis C virus; NS5A; TIP47.

Received 15 August 2012; received in revised form 1 January 2013; accepted 17 January 2013; available online 24 January 2013

* Corresponding author. Address: Paul-Ehrlich-Institute, Dept. of Virology, Paul-Ehrlich-Str. 51–59, D-63225 Langen, Germany. Tel.: +49 6103772140/1; fax: +49 6103771273.

E-mail address: eberhard.hildt@pei.de (E. Hildt).

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; LD, lipid droplet; TIP47, tail interacting protein of 47 kD; NS5A, non-structural protein 5A; RC, replicon complex; ER, endoplasmic reticulum; MPR, mannose-6-phosphate receptor; PEI, polyethyleneimine; HPLC, high performance liquid chromatography; MS, mass spectrometry.



ELSEVIER

Research Article

important role of apoE and the VLDL pathway in viral assembly and release. It was described that apoE is crucial for virus assembly and release of infectious viral particles [9,13,14].

The tail interacting protein of 47 kDa (TIP47, also named perilipin 3 (PLIN3) or mannose 6 phosphate receptor binding protein 1 (M6PRBP1)), is described to be recruited to the LDs [15]. This could be mediated by an apoE-like domain that is found in the sequence of TIP47 [16,15]. This TIP47-derived apoE-like domain is structurally well characterized [17]. Silencing of *TIP47* blocks LD maturation and results in decreased incorporation of triacylglycerol into LDs [15].

TIP47 has also been described as cytoplasmic sorting factor. GTP-loaded Rab9 binds to cytosolic TIP47 and promotes its interaction with a proline rich motive in the cytoplasmic tail of cation-independent mannose-6-phosphate receptors (MPRs). In case of the cation-dependent MPR, the binding of TIP47 depends on a diaromatic YW motive. MPRs play a crucial role for the transport of lysosomal enzymes from the trans-Golgi-network (TGN) to endosomes. After delivery of its cargo to the endosomal compartment, MPRs cycle back to the TGN (retrograde transport) [18,15]. The interaction of TIP47 with the cytoplasmic tail of MPRs initiates the retrograde transport of these receptors [18,19].

Here we describe that TIP47 is an essential cellular factor for HCV morphogenesis by its interaction with the viral protein NS5A.

Materials and methods

Antibodies

The antibodies used for Western blotting, immunofluorescence, immunoPCR, and IP are described in detail in the Supplementary Materials and methods.

Cell culture

The HuH7-derived cell clone HuH7.5 [20], that is highly permissive for HCV RNA replication, was used for transfection and infection assays, as described [21]. The use of human hepatocytes for research purposes was approved by the local ethics committees of Regensburg, and written informed consent was obtained from all patients. Hepatocytes were isolated [22], cultivation and infection of primary human hepatocytes were performed as described [21].

Lentiviral silencing

For lentiviral transduction, Mission[®] TRC shRNA Clones (Sigma Aldrich) were used. For details see Supplementary Materials and methods.

Plasmids

Plasmids pJHF1/wt, pJHF1/J6, pJHF1/GND, pFK-lucJHF1/wt have been described [23,7,24,25]. The generation of expression vectors encoding *TIP47* or *TIP47* deletion mutants is described in Supplementary Materials and methods.

In vitro transcription and RNA transfection

In vitro transcription, electroporation of HCV RNAs, and luciferase assays were performed as described [21]. All luciferase assays were done at least in triplicate.

Virus titration

Virus titers were determined as described [26].

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

For details see Supplementary Materials and methods.

Transient transfection

Cells were transfected 24 h after electroporation using linear polyethyleneimine (PEI) (Polysciences, Inc.) as described in [27] and incubated for further 48 or 72 h. Gene expression was followed by qRT-PCR, immunofluorescence or Western blot.

RNA interference (RNAi)

For transient RNAi transfection, cells were transfected with 10 nM TIP47-specific small interfering RNA (siRNA) (Santa Cruz) using siPORT[™] NeoFX[™] Transfection Agent (Ambion, Inc.) according to the manufacturer's protocol. Cells were analyzed 72 h post-transfection. In addition, TIP47 transient downregulation was performed using shRNA (siTIP47, pSI). Therefore, cells were transfected 24 h after electroporation using PEI (Polysciences, Inc.) as described in [27], and incubated for further 72 h. A c-Raf-specific siRNA served as positive control [28].

SDS-PAGE and Western blot analysis

SDS-PAGE and Western blot analysis were performed as described [28]. Equal loading was controlled by detection of β -actin.

Indirect immunofluorescence analysis, electron microscopy

Immunofluorescence staining was analyzed using a confocal laser scanning microscope (CLSM 510 Carl Zeiss) and LSM image browser software. The used objectives were 63 \times and 100 \times n.a. 1.46.

2D gel electrophoresis

2D gel electrophoresis was performed as described [21]. After 2D gel electrophoresis, the gel was silver stained according to the modified Blum protocol [29]. Spots were normalized with reference to the β -actin-specific spot. Differential spots were cut out from the gel and subjected to a tryptic digestion.

Nanoflow-HPLC-MS/MS analysis

Samples were analyzed by nanoflow-HPLC (Ultimate3000) followed by ion trap cyclotron tandem mass spectrometry (LTQ-FT, Thermo Scientific, Dreieich). For details see Supplementary Materials and methods.

Yeast two-hybrid assays

Yeast two-hybrid assays were performed as described by Dimitrova *et al.* [30]. This and the generation of the yeast two-hybrid vectors are described in detail in Supplementary Materials and methods.

Results

Reduced amount of TIP47 in HCV replicating cells

In order to characterize the effect of HCV on the host cell proteome, cellular lysates derived from HCV replicating HuH7.5 cells and from the corresponding control cells were subjected to 2D-gel electrophoresis (Fig. 1A). Differentially stained spots in both gels were identified by mass spectrometry.

Based on this approach, we found that HCV replicating cells contained less TIP47 than cells electroporated with a replication-deficient HCV RNA (JHF1/GND) (Fig. 1A). This was confirmed by Western blot quantification of the cellular lysates derived

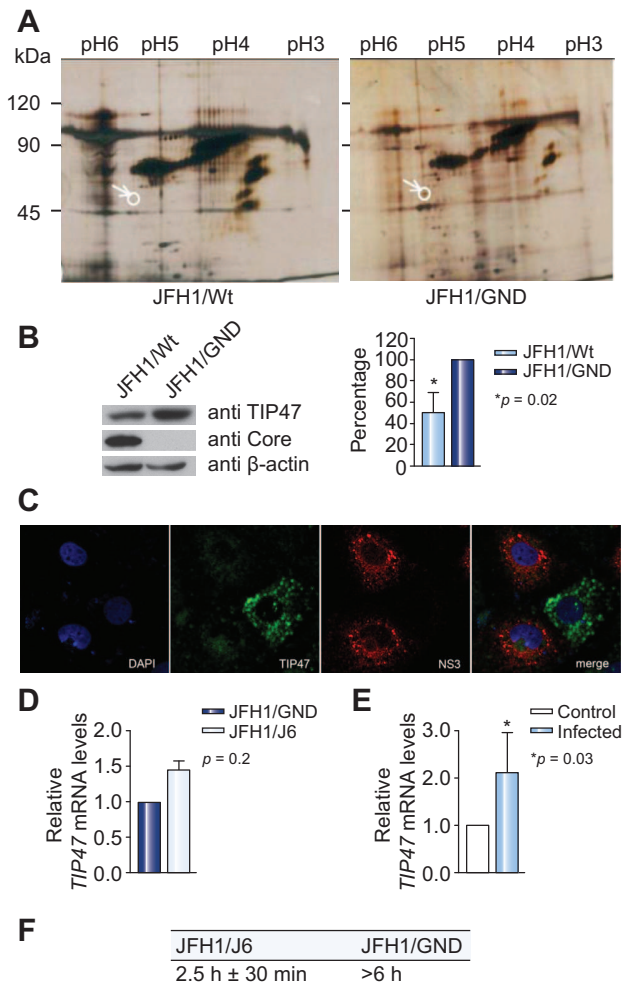


Fig. 1. Reduced amount of TIP47 in HCV replicating cells. (A) HCV replicating and control cells were generated by electroporation of HuH7.5 cells with JFH1/Wt or replication-deficient JFH1/GND HCV RNA as control. 48 h after electroporation, cells were lysed and subjected to 2D gel separation. The silver stained gel reveals a variety of different protein spots when HCV replicating cells were compared to control cells. The spot labeled by a white circle was identified by mass spectrometry as TIP47. (B) Western blot analysis of cellular lysates derived from cells electroporated with the replicon JFH1/Wt (+) or the replication-deficient JFH1/GND construct as control (-). 72 h after electroporation, cells were harvested and lysed. For detection, TIP47-, and core-specific antisera were used; a β -actin-specific serum served as loading control. The blot was quantified. The graph shows the relative amount of TIP47 referred to β -actin. (C) Confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification) of HuH7.5 cells electroporated with the JFH1 construct. The cells were fixed 72 h after electroporation and stained using an NS3-specific antiserum (red) and a TIP47-specific polyclonal antibody (green). Nuclei were visualized with DAPI (blue). (D) Quantification of TIP47-specific mRNA by RT-PCR. Total RNA was isolated from HCV replicating HuH7.5 cells (JFH1/J6) 24 h after electroporation. JFH1/GND replication-deficient HCV RNA served as control. The level of TIP47-specific transcripts is normalized to GAPDH mRNA. The graph represents the mean value from three independent experiments. (E) Quantification of TIP47-specific mRNA by RT-PCR in infected primary human hepatocytes. Total RNA was isolated from HCV-infected primary human hepatocytes 120 h after infection. Uninfected cells served as control. The level of TIP47-specific transcripts is normalized to GAPDH. The graph represents the mean value from three independent experiments. The bars represent the standard deviation. (F) Half-life of TIP47. HCV replicating (JFH1/J6) and control (JFH1/GND) cells were treated with 70 μ M cycloheximide (CHX) for 6 h. Cells were harvested every 0.5 h and lysates were analysed by Western blot using TIP47- and β -actin-specific antisera.

from HCV replicating cells (Fig. 1B) and by confocal immunofluorescence microscopy of HuH7.5 cells electroporated with the JFH1 genome using TIP47- and NS3-specific antisera (Fig. 1C).

To study the effect of HCV replication on TIP47 gene expression, total RNA was isolated from HCV replicating and non-replicating corresponding control cells. After reverse transcription to cDNA, the amount of TIP47-specific transcripts was quantified by RT-PCR. The RT-PCR shows that in HCV replicating cells a higher expression of TIP47 is found (Fig. 1D). Comparable results were obtained for HCV-infected primary human hepatocytes (Fig. 1E). Based on these data, it was analyzed whether the decreased amount of TIP47 protein in HCV replicating cells is due to a decreased stability. For HCV replicating cells, it was found that the half-life of TIP47 is shortened to about 2.5 h, while in HCV-negative cells the half-life is higher than 6 h (Fig. 1F).

Taken together, these data indicate that in HCV replicating cells, compared to HCV-negative control cells, the intracellular amount of TIP47 is decreased while the level of TIP47 mRNA is increased.

Overexpression of TIP47 increases HCV replication while silencing of TIP47 decreases release of infectious viral particles

To further study the relevance of TIP47 for the viral life cycle, the amount of TIP47 was modulated by overexpression or silencing. The effect on replication was analyzed by JFH1/Luc reporter gene assay or by infection analyses, for determination of the amount of released viral particles. These assays revealed that overexpression of TIP47 moderately favours viral replication (Fig. 2A and B). *Vice versa*, silencing of TIP47 expression by siRNA resulted in a decreased level of intracellular HCV RNA (Fig. 2C) as compared to the control (pSI), and the infectivity analysis of supernatants derived from cells with decreased TIP47 levels showed that the amount of released viral particles was significantly decreased (Fig. 2D). A c-Raf-specific siRNA was used as positive control (Fig. 2G). Complete silencing of TIP47 by a lentiviral vector system abolishes HCV replication. A productive replication could be established neither by electroporation of these cells with the JFH1/J6 construct (Fig. 2E and F) nor by infection with HCVcc (data not shown). However, if the expression of TIP47 was silenced in subgenomic replicon cells (HuH7 I377/NS3-3'/wt/9-13) [3], by transfection with a TIP47 specific siRNA and the corresponding control (scrRNA), no effect on replication was observed (Fig. 2G). This was confirmed by electroporation of TIP47 knockdown cells and corresponding control cells (HuH7.5) with the subgenomic replicon I389/NS3-3'/LucUbiNeo-ET [3] (Fig. 2G). Rescue of TIP47 expression by transfection of the knockdown cells with a TIP47 expression vector pcHA-TIP47 rescued HCV replication (Fig. 2H). In the control experiment, cells were rescued with a TIP47 mutant that lacks the NS5A binding domain (pTIP47-C6). In these cells, no HCV replication was detectable. These data indicate that TIP47 is crucial for the HCV life cycle.

TIP47 binds to NS5A

TIP47 harbors an apoE-homologous domain [17]. In a recent publication, apoE was described to bind to NS5A [9]. Based on this, we analyzed whether TIP47 directly interacts with the NS5A protein. Confocal double immunofluorescence microscopy of HCV replicating cells shows a colocalization of NS5A with endogenous TIP47 and lipid droplets (Fig. 3A). This could be confirmed in cells

Research Article

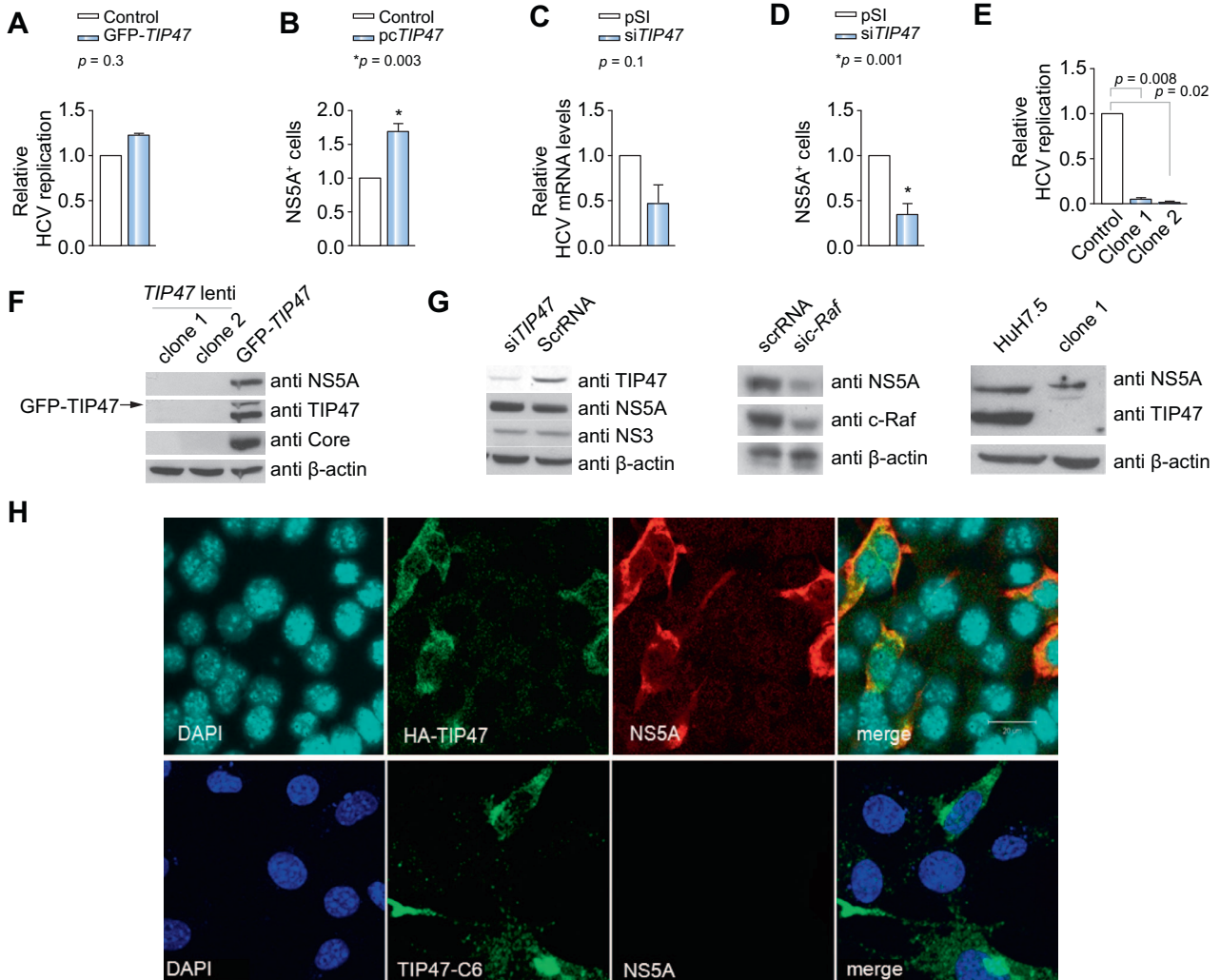


Fig. 2. Silencing of TIP47 expression impairs viral replication. (A) HuH7.5 cells were electroporated with JHF1/Luc HCV RNA. 24 h after electroporation, cells were transfected with a TIP47 expression vector (pGFP-TIP47) or the control vector (control = pGFP) for direct visualization of the transfection efficiency. Luciferase activity was determined 72 h after electroporation. The graph represents the mean value from three independent experiments. (B) Overexpression of TIP47 induces an increase in HCV infectious particle production. HCV replicating HuH7.5 cells were generated by electroporation with JHF1/J6 HCV RNA. 24 h after electroporation, cells were transfected with a TIP47 expression vector (pcTIP47) or the control construct (control = pcTIP47rev). 72 h after electroporation, supernatants were collected and used for reinfection of naïve HuH7.5 cells. For infectivity analysis, infected HCV cells were visualized by immunostaining, using NS5A-specific serum. The graph shows relative values referred to the control and represents the mean value from three independent experiments. The bars represent the standard deviation. (C and D) HCV replicating HuH7.5 cells were generated by electroporation with the replicon JHF1/J6. 24 h after electroporation, cells were transfected with a TIP47-specific shRNA (siTIP47) or the control shRNA (pSI). (C) 72 h after electroporation, total RNA was isolated and the HCV-specific RNA was quantified by RT-PCR. As a reference, the amount of GAPDH-specific transcripts was determined. The graph shows relative values referred to the control (pSI) and represents the mean value from three independent experiments. The bars represent the standard deviation. (D) 72 h after transfection, the supernatant was collected and used for reinfection of naïve HuH7.5 cells. For infectivity analysis, infected cells were visualized by NS5A immunostaining using NS5A-specific serum. The graph shows relative values referred to the control and represents the mean value of three independent experiments. The bars represent the standard deviation. (E) Analysis of viral replication by luciferase reporter gene assay. Two independent TIP47-deficient cell lines (TIP47-lenti clone1/clone2) and the corresponding control cells (HuH7.5) were electroporated with the HCV JFH-1-luc-replicon. 72 h after electroporation, cells were harvested and luciferase activity was determined. The graph shows relative values referred to the control and represents the mean value of three independent experiments. The bars represent the standard deviation. (F) The expression of TIP47 was silenced by a lentiviral vector. Two independent TIP47-deficient cell lines (TIP47-lenti clone1/clone2) and the corresponding control cells were electroporated with the JHF1/J6 replicon. 72 h after electroporation, cells were harvested and lysates were analyzed by Western blot using TIP47-, NS5A-, core- and β -actin-specific antisera. (G) Left and middle panel: the expression of TIP47 in HuH7 1377/NS3-3'/wt/9-13 was silenced by transfection with a TIP47-specific siRNA and the corresponding control (scrRNA) [28]. A c-Raf-specific siRNA served as positive control [28]. 72 h after transfection, cells were harvested and lysates were analyzed by Western blot using TIP47-, NS5A-, NS3 and β -actin-specific antisera. Right panel: the expression of TIP47 was silenced by a lentiviral vector. TIP47-lenti clone 1 and the corresponding control cells (HuH7.5) were electroporated with the subgenomic replicon I389/NS3-3'/LucUbiNeo-ET. 72 h after electroporation, cells were harvested and lysates were analyzed by Western blot using TIP47-, NS5A- and β -actin-specific antisera. (H) Confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification) of TIP47 knockdown cells established by a lentiviral vector. The knockdown cells were transfected 24 h before electroporation with a JHF1/J6 replicon with a TIP47 expression vector (pHA-TIP47) or with the TIP47 deletion mutant (pcTIP47-C6) lacking the NS5A interaction domain. Detection of TIP47 expression was performed using a TIP47 specific antiserum (green); HCV replication was detected using an NS5A-specific antiserum (red). Nuclei were visualized by DAPI (blue). The immune fluorescence microscopy shows that in the TIP47 knockdown cells, HCV replication can be rescued if TIP47 production is restored.

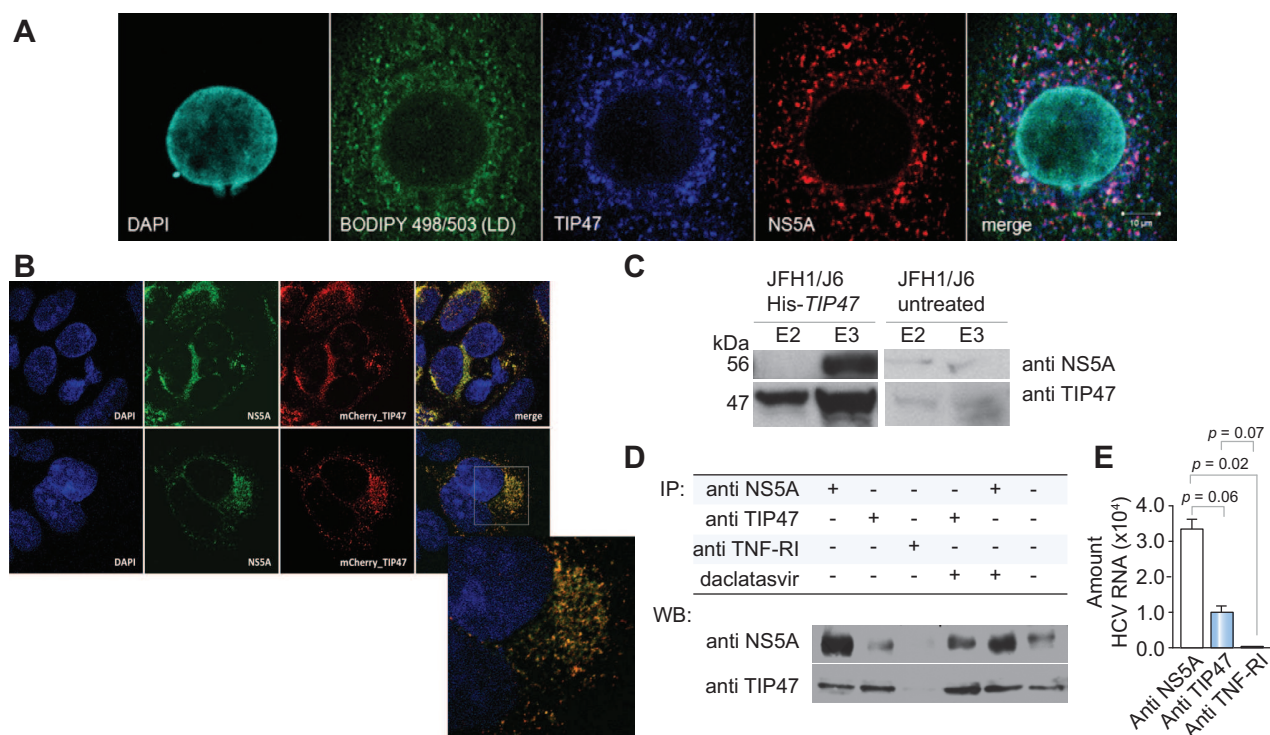


Fig. 3. NS5A binds to TIP47. (A) NS5A partially colocalizes with TIP47 in HCV replicating cells. Confocal immunofluorescence microscopy (630 \times magnification) of HCV replicating HuH7.5 cells using an NS5A-specific antiserum (red) and a TIP47-specific polyclonal antibody (blue). Lipid droplets were visualized by BODIPY (green), nuclei by DAPI (turquoise). (B) Confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification) of HCV replicating cells transfected with an mCherry-TIP47 (red) construct. NS5A was detected by NS5A-specific serum (green). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (C) HCV replicating cells were transfected with an expression vector encoding a His-TIP47 fusion protein or the control vector (pcDNA 3.1(-)). 72 h after transfection, cells were harvested and the lysate was loaded under native conditions on a Ni-loaded HiTrap chelating column to enrich His-TIP47. The bound His-TIP47 was eluted by imidazole and the eluate fractions 2 and 3 (E2 and E3) were analyzed by Western blot using NS5A and TIP47-specific antisera. The blot shows that when cells overexpress His-TIP47, NS5A co-elutes with His-TIP47 from the column. NS5A is absent in the corresponding fractions of the control column (untreated cells). (D) NS5A co-immunoprecipitates with TIP47 in HCV replicating cell lysates. Co-immunoprecipitation of cellular lysates derived from HCV replicating cells. For precipitation, a TIP47-, and NS5A-specific serum or an unrelated control serum (TNF-RI) was used. All antisera were derived from rabbits. To study the effect of an NS5A inhibitor on the interaction with TIP47, IPs were performed in the presence of 100 nm daclatasvir in the lysate (lanes 4 and 5). Total lysate (lane 6) served as positive control. The precipitates were analyzed by Western blot using an NS5A-specific serum (rabbit) or a TIP47-specific serum (goat). To avoid any cross-reactivity with the denatured antibody fragments on the membrane, the clean blot system (Thermo Scientific) was used. (E) Immuno-PCR: for precipitation, a TIP47- and NS5A-specific serum or an unrelated control serum (TNF-RI) was used. All antisera were derived from rabbits. After reverse transcription, immunoprecipitates were analyzed by real-time PCR. Quantitative RT-PCR was performed using the following primers: R6-260-19 (HCV_fw) (5'-ATGACCA-CAAGGCTTTCG-3'), R6-130-146 (HCV_rev) (5'-CGGGAGAGCCATAGTGG-3'). To prove the specificity of the IP, GAPDH-specific primers were used. Here the signal was below the detection limit (data not shown).

overexpressing HA-tagged (data not shown) or mCherry-tagged TIP47 (Fig. 3B). In all cases, it was found that a fraction of NS5A colocalizes with TIP47.

To study whether these data indeed reflect a direct interaction, further experiments were performed. Cellular lysates derived from His-tagged-TIP47 overproducing HCV replicating cells were loaded on a metal chelating column. After washing of the column, bound proteins were eluted by imidazole. Western blot analyses of the eluate fractions demonstrated that NS5A co-eluted with His-TIP47, while NS5A was absent from the eluates obtained from the control column loaded with lysates from HCV replicating cells that do not overproduce His-TIP47 (Fig. 3C). This suggests a direct interaction of TIP47 and NS5A that could be unequivocally confirmed by co-immunoprecipitation experiments (Fig. 3D) and by yeast two-hybrid analysis (Fig. 4).

To investigate whether the co-precipitated NS5A is complexed with viral RNA, immune-PCRs (iPCRs) were performed. The iPCRs demonstrate that viral RNA can be precipitated by a TIP47-specific antibody from the lysate of HCV replicating cells (Fig. 3E).

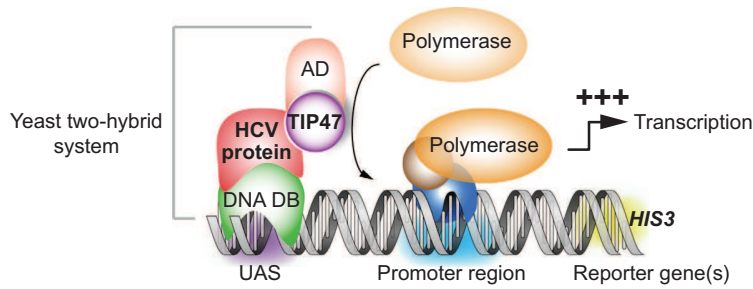
This suggests that at least a fraction of NS5A that co-precipitates with TIP47 is complexed with viral RNA.

NS5A binds to the N-terminal part of TIP47

TIP47 is described as an intracellular sorting factor that binds to Rab9 [18,19]. Analysis of various mutants in the two-hybrid system revealed that the C-terminal part of TIP47, harboring the Rab9-interacting domain, is dispensable for the interaction with NS5A, while the N-terminal PAT domain of TIP47 harbors the interaction site (Fig. 4B and D) and is essential. This indicates that the Rab9 binding site is not required for the binding of NS5A. All the other HCV NS proteins failed to interact with TIP47 in the yeast two-hybrid analysis (Fig. 4B and D). Moreover, the yeast two-hybrid analysis revealed that the observed interaction of NS5A with TIP47 is not restricted to genotype 2a. The interaction could be observed for NS5A also derived from genotype 1a (data not shown).

Research Article

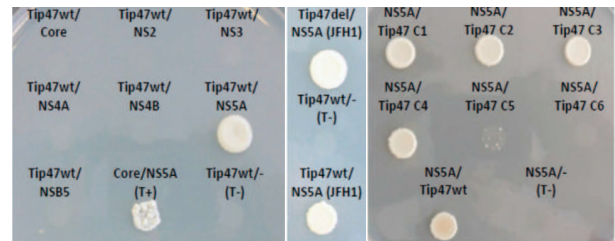
A



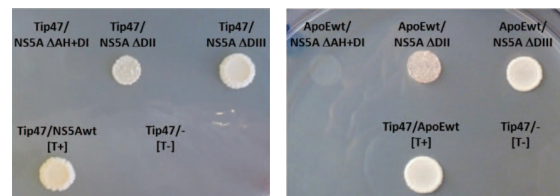
B

	PAT domain 116	α 11-mer repeat 206	4 helix bundle 287-320	434	Deletion	TIP47/NS5A interaction
TIP47 Wt	[Schematic]				-	+++
TIP47 del	[Schematic]				D ₁₅₂ -V ₁₆₉	+++
TIP47-C1	[Schematic]				117-434	+++
TIP47-C2	[Schematic]				207-434	+++
TIP47-C3	[Schematic]				288-434	+++
TIP47-C4	[Schematic]				321-434	+++
TIP47-C5	[Schematic]				1-205	-
TIP47-C6	[Schematic]				1-115	-

C



D



E

	AH domain 1977	Domain I (DI) 2003	Domain II (DII) 2189	Domain III (DIII) 2226-2314, 2328	2442	Interaction TIP47/NS5A	ApoE/NS5A
NS5A Wt	[Schematic]					+++	+++
NS5A ΔAH + DI	[Schematic]					-	-
NS5A ΔDII	[Schematic]					+	+
NS5A ΔDIII	[Schematic]					+++	+++

F

	PAT domain 116	α 11-mer repeat	4 helix bundle	434	Deletion	NS5A/TIP47 interaction
TIP47 Wt	[Schematic]				-	
TIP47-Const1	[Schematic]				117-434	+
TIP47-Const6	[Schematic]				1-115	-
TIP47-Const7	[Schematic]				Δ24-48	-

G

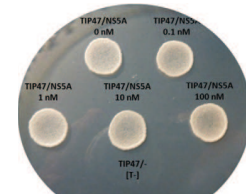


Fig. 4. The N-terminal PAT domain of TIP47 binds to NS5A. (A) Principle of the yeast two-hybrid screening: in this system, interaction between two proteins is indicated by the activation of the reporter genes *HIS3/ADE*, which allows growth on histidine and adenine depleted (*HIS*⁻, *ADE*⁻) plates. (B) (Left panel) Schematic representation of TIP47 constructs tested. (Right panel) Results of TIP47/NS5A interactions. (C) AH109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding a fusion of the TIP47wt coding region and the activation domain of Gal4 and plasmids encoding the fusion of the DNA-binding domain of Gal4 and HCV H77 or JFH1 strain proteins (core, NS2, NS3, NS4B, NS5A, and NS5B) or the Gal4 DNA activation domain only (-). After one week at 30 °C on selective *HIS*⁻ media, yeast growth was analyzed. (D) AH109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding a fusion of the TIP47/constr1 to constr6 coding region and the activation domain of Gal4 and plasmids encoding the fusion of the DNA-binding domain of Gal4 and HCV JFH1 NS5A protein. (E) (Left panel) Schematic representation of the NS5A constructs tested and results of ApoE/NS5A and TIP47/NS5A interactions. (Right panel) Growth results of yeasts co-transformed with plasmids encoding Gal4 AD-Tip47 or Gal4 AD-ApoE fusion proteins and plasmids encoding Gal4 DBD-NS5A protein constructs (ΔAH + DI, ΔDII, and ΔDIII). (F) (Left panel) Schematic representation of the TIP47 constructs tested. (Right panel) Yeast growth results. The experiment was performed as described in 4D. (G) Results of Tip47/NS5A interaction in the presence of the NS5A inhibitor (daclatasvir) at different concentrations (0.1–100 nM).

To identify the domains that are essential for the interaction of NS5A with TIP47, further deletion mutants were tested by yeast two-hybrid analyses. The domain I of NS5A is essential for the interaction with TIP47. Further analyses revealed that deletion of domain II significantly weakens the interaction of NS5A with TIP47. Domain III, however, is dispensable for the interaction with TIP47 (Fig. 4E). Testing various deletion mutants of TIP47 revealed that aa 1–116 are sufficient for the interaction with NS5A. Further deletions revealed that the PAT domain (aa

24–48) is essential for the interaction of TIP47 with NS5A (Fig. 4F).

To investigate whether the interaction of TIP47 with NS5A can be affected by the presence of NS5A inhibitors, a yeast two-hybrid assay was performed in the presence of increasing concentrations of daclatasvir. The assay showed that this NS5A inhibitor does not affect TIP47/NS5A interaction (Fig. 4G). Comparable results were obtained by co-immunoprecipitation experiments performed in the presence of 100 nM daclatasvir (Fig. 3D).

Taken together, our results demonstrate that NS5A interacts with TIP47 via its PAT domain.

Discussion

The replication of the HCV genome occurs in replicon complexes in the membranous web, an ER derived subcellular structure [7,31–34]. Here, the replicon complexes are localized on the cytoplasmic face of the ER. During the viral replication process, *de novo* synthesized RNA has to be transported from the replicon complex to LDs, which are the assembly platforms of the virus. It was proposed that NS5A, that possesses an RNA-binding activity, mediates this transfer. Although in replicating HCV, the replicon complex and LDs are in close vicinity, efficient replication might require a targeted transfer from the replicon complex to the LDs. Indeed, there is evidence that the core protein that is found on the surface of lipid droplets recruits NS5A to the LDs [7]. Further analysis revealed that domain III of the NS5A protein interferes with the core protein [6]. This raises the question about the targeting of NS5A from the replicon complex to core, on the surface of LDs.

In light of this observation, it is interesting that TIP47 displays a high affinity to lipid droplets [35]. Therefore, TIP47 could target the RNA-loaded NS5A from the replicon complex to the surface of the lipid droplet and enables thereby the encounter of the RNA-complexed NS5A with core. Indeed, the iPCR reveals that viral genomes can be co-precipitated by a TIP47-specific antibody. In line with this, during the HIV life cycle, TIP47 is required to allow the interaction of Gag and Env. Here TIP47 binds to the EnvY802W803 diatomic motif and to the W15E16 residues of Gag [36,37]. Taking this observation into account, it is interesting that in subgenomic replicons, where no morphogenesis occurs, the lack of TIP47 fails to affect genome replication.

The silencing experiments demonstrate the essential role of TIP47 in the HCV life cycle. The experiments further demonstrate that the function of TIP47 in the HCV life cycle cannot be compensated by ApoE. In light of the crucial role of TIP47 in the HCV life cycle, it is astonishing that HCV replicating cells contain less TIP47 as compared to the control cells, although the expression is increased. This could reflect the fact that HCV destabilizes TIP47 or withdraws TIP47 from the cell. The increased expression of TIP47 could reflect a compensatory mechanism.

The yeast two-hybrid data demonstrate that the integrity of the Rab9 binding domain is dispensable for the interaction with NS5A. Further deletion analyses revealed that the N-terminal PAT domain of TIP47 mediates the interaction with NS5A. In light of the hypothesis that TIP47 targets the NS5A complexed RNA-genome from the replicon complex to the surface of the lipid droplet, one can speculate that the PAT domain binds to the RNA-complexed NS5A. Due to the high affinity of the PAT domain for LDs, the complex is transferred to the LD surface, where RNA binds to core and NS5A is released.

Based on the crucial role of TIP47 in the HCV life cycle, it is tempting to speculate whether TIP47 could be a target for antiviral strategies. A specific approach should target the NS5A-TIP47 interaction, i.e., based on small molecules that mimic the NS5A-specific sequence that binds to TIP47. This might result in a competition of the TIP47/NS5A interaction and thereby could confer to an inhibition of HCV replication.

Financial support

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), University of Strasbourg and the French Agency for AIDS and Viral Hepatitis Research (ANRS), Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF).

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Andrea Henkes for the excellent technical assistance and Dagmar Fecht-Schwarz for critical reading of the manuscript. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), University of Strasbourg and the French Agency for AIDS and Viral Hepatitis Research (ANRS) and the Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF). Furthermore we are indebted to the Charitable Foundation Human Tissue and Cell Research (HTCR), Regensburg, for making human tissue available for research.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.01.022>.

References

- [1] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009;29:74–81.
- [2] Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011;19:95–103.
- [3] Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001;52:1–17.
- [4] Moradpour D, Gosert R, Egger D, Penin F, Blum HE, Bienz K. Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* 2003;60:103–109.
- [5] Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453–463.
- [6] Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000035.
- [7] Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9:1089–1097.
- [8] Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale Jr M, et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5848–5853.
- [9] Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 2010;51:43–53.
- [10] Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1200–1205.
- [11] McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 2002;21:3980–3988.

Research Article

- [12] Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 2007;282:37158–37169.
- [13] Jiang J. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. In: Luo G, editor. 86 ed. *J Virol*; 2008. p. 12680–12691.
- [14] Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, et al. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* 2010;84:10999–11009.
- [15] Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, et al. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* 2009;185:641–655.
- [16] Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem* 2001;276:5101–5108.
- [17] Hickenbottom SJ, Kimmel AR, Londo C, Hurley JH. Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure* 2004;12:1199–1207.
- [18] Diaz E, Pfeffer SR. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 1998;93:433–443.
- [19] Aivazian D, Serrano RL, Pfeffer S. TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J Cell Biol* 2006;173:917–926.
- [20] Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002;76:13001–13014.
- [21] Himmelsbach K, Sauter D, Baumert TF, Ludwig L, Blum HE, Hildt E. New aspects of an anti-tumour drug: sorafenib efficiently inhibits HCV replication. *Gut* 2009;58:1644–1653.
- [22] Weiss TS, Pahernik S, Scheruebl I, Jauch KW, Thasler WE. Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J Hepatol* 2003;38:476–482.
- [23] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791–796.
- [24] Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006;80:5308–5320.
- [25] Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7408–7413.
- [26] Steinmann E, Brohm C, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T. Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol* 2008;82:7034–7046.
- [27] Ehrhardt C, Schmolke M, Matzke A, Knoblauch A, Will C, Wixler V, et al. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduct* 2006;6:179–184.
- [28] Burckstummer T, Kriegs M, Lupberger J, Pauli EK, Schmitt S, Hildt E. Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett* 2006;580:575–580.
- [29] Winkler C, Denker K, Wortelkamp S, Sickmann A. Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis* 2007;28:2095–2099.
- [30] Dimitrova M, Affolter C, Meyer F, Nguyen I, Richard DG, Schuster C, et al. Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16320–16325.
- [31] Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Goralenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 2004;279:48576–48587.
- [32] Moradpour D, Evans MJ, Gosert R, Yuan Z, Blum HE, Goff SP, et al. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 2004;78:7400–7409.
- [33] Appel N, Schaller T, Penin F, Bartenschlager R. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* 2006;281:9833–9836.
- [34] Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000032.
- [35] Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:419–440.
- [36] Lopez-Verges S, Camus G, Blot G, Beauvoir R, Benarous R, Berlioz-Torrent C. Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:14947–14952.
- [37] Bauby H, Lopez-Verges S, Hoeffel G, Delcroix-Genete D, Janvier K, Mammano F, et al. TIP47 is required for the production of infectious HIV-1 particles from primary macrophages. *Traffic* 2010;11:455–467.

Annexe III



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejcb

TIP47 is associated with the Hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles



Daniela Ploen^a, Mohamed Lamine Hafirassou^{b,c}, Kiyoshi Himmelsbach^a, Stefan A. Schille^a, Martin L. Biniossek^e, Thomas F. Baumert^{b,c,d}, Catherine Schuster^{b,c}, Eberhard Hildt^{a,f,*}

^a Paul-Ehrlich-Institut, Dept. of Virology, Langen, Germany

^b Inserm, U1110, Strasbourg, France

^c Université de Strasbourg, France

^d Pôle hépato-digestif des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

^e University of Freiburg, Inst. for Molecular Medicine and Cell Research, Freiburg, Germany

^f Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2013

Received in revised form

11 December 2013

Accepted 13 December 2013

Keywords:

HCV

TIP47

Replication

apoE

Morphogenesis

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) morphogenesis and release are closely linked to lipid metabolism. It has been described recently by our group that TIP47 plays an essential role for the targeting of the NS5A-complexed RNA genome from the replicon complex to the lipid droplet. Moreover, apolipoprotein (apo) E was found to be associated with the viral particle. In light of the fact, that TIP47 harbors an apoE like domain and has a high affinity to lipoproteins, the interaction of TIP47 with the viral particle and the potential relevance for the release of the viral particle were investigated. Coimmunoprecipitations and electron microscopy analysis using immunogold labeling revealed that TIP47 binds to the viral particle and stays associated with the released HCV particle. Silencing of the TIP47 binding partner Rab9 by lentiviral transduction abolishes the viral replication. However, destruction of TIP47-Rab9 interactions by deletion/mutation of the Rab9 binding does not abolish the genome replication domain but prevents the release of HCV particles. The binding of these TIP47 mutants to the viral particle is not affected by destruction of the Rab9 binding domain. Moreover, we found that these TIP47 mutants lacking the binding site for Rab9 misdirect the *de novo* synthesized viral particles to the autophagosomal/lysosomal compartment where the particles are degraded. From this we conclude that the Rab9-complexed TIP47 plays an essential role for the proper release of hepatitis C viral particles.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. At present, more than 170 million people are persistently infected with HCV worldwide. HCV is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus in the *Hepacivirus* genus of the *Flaviviridae* family. The HCV genome is a single-stranded positive-sense RNA molecule of approximately 9600 bases length (Lavanchy, 2009).

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; LD, lipid droplet; ER, endoplasmic reticulum; TIP47, tail interacting protein of 47 kDa; NS5A, non-structural protein 5A; TNF-RI, Tumor necrosis factor receptor I.

* Corresponding author at: Dept. of Virology, Paul-Ehrlich-Str. 51-59, D-63225 Langen, Germany. Tel.: +49 6103772140/1; fax: +49 6103771273.

E-mail address: eberhard.hildt@pei.de (E. Hildt).

0171-9335/\$ – see front matter © 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.12.003>

The viral RNA encodes for a large polyprotein of approximately 3100 amino acids which is co- and/or posttranslationally processed by cellular and viral proteases. The N-terminus encompasses the structural proteins core, E1, and E2; the C-terminus the p7 protein and the nonstructural (NS) proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B (Lavanchy, 2009; Bartenschlager et al., 2011).

An interesting aspect of HCV is the relation between the HCV life cycle and hepatocyte lipid metabolism. HCV replication takes place at specialized rearranged intracellular ER membranes, the so called *membranous web* (Miyanari et al., 2007; Moradpour et al., 2007), that are enriched in proteins involved in very low density lipoproteins (VLDL) assembly, *i.e.* apoB, apoE and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) (Huang et al., 2007). Recently it was observed that NS5A directly interacts with apoE (Benga et al., 2010).

Moreover, the lipid droplet (LD) – an intracellular lipid storing organelle – acts as an assembly platform for HCV and thus plays an important role for the morphogenesis of HCV (Miyanari

et al., 2007; Barba et al., 1997; McLaughlan et al., 2002). The viral core protein is addressed to the LDs via the diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1) (Camus et al., 2013) and recruits NS proteins to LD-associated membranes, a crucial step for virus morphogenesis. Several studies have shown the important role of apoE and the VLDL pathway in viral assembly and release. Indeed, it has been described recently, that apoE interacts directly with the viral protein NS5A and showed that apoE is crucial for virus assembly and release of infectious viral particles (Benga et al., 2010; Jiang, 2009; Gastaminza et al., 2010).

The tail interacting protein of 47 kDa (TIP47, also named as perilipin 3 (PLIN3) or as mannose 6 phosphate receptor binding protein 1 (M6PRBP1)), is associated to LDs and has been described to be important for the LDs maturation (Bulankina et al., 2009). This could be mediated by part of an apoE like domain that is found in the sequence of TIP47 (Wolins et al., 2001; Bulankina et al., 2009). The TIP47-derived apoE-like domain is structurally well characterized (Hickenbottom et al., 2004).

TIP47 has also been described to act as a cytoplasmic sorting factor. It is involved in the recycling of the cation-independent Mannose-6-phosphate receptors (CI-MPRs). MPRs play a crucial role for the transport of lysosomal enzymes from the trans-Golgi-network (TGN) to endosomes. After delivery of their cargo to the endosomal compartment MPRs cycle back to the TGN (retrograde transport) (Diaz and Pfeffer, 1998; Bulankina et al., 2009). The binding of the GTP-loaded Rab9 to the cytosolic TIP47 promotes its interaction with a proline-rich motive in the cytoplasmic tail of MPRs and initiates the retrograde transport of these receptors (Diaz and Pfeffer, 1998; Aivazian et al., 2006).

Recently, we and other described that TIP47 binds to the HCV protein NS5A. The NS5A/TIP47 complex targets the *de novo* synthesized viral RNA that is bound to NS5A from the replicon complex to the LDs (Ploen et al., 2013; Vogt et al., 2013).

Here we describe that TIP47 is an essential cellular factor for the release of infectious viral particles. The interaction of TIP47 with Rab9 is required for the targeting of TIP47 to the surface. TIP47 stays associated with the released viral particle. However, TIP47 mutants that lack the binding site for Rab9, misdirect the *de novo* synthesized viral particles to the autophagosomal compartment.

Materials and methods

Cell culture. The Huh7-derived cell clone Huh7.5 (Blight et al., 2002), that is highly permissive for HCV RNA replication, was used for transfection and infection assays. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% fetal calf serum (complete DMEM). Huh7.5 cells stably expressing TIP47 or TIP47-mutants were selected in complete DMEM containing 750 µg/ml G418.

Antibodies. For detection of TIP47 (N-15, C-20) commercial goat/rabbit-derived polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotech) and a rabbit-derived polyclonal anti-M6PRBP1 (Sigma) were used. Anti-NS3 (8G-2) was purchased from Abcam, anti-Core from ABR Affinity BioReagents, monoclonal anti-HCV-E2 (HCM-091a-5) from Austral Biologicals, monoclonal anti-HA (12CA5) from Roche and monoclonal anti-β-actin from Sigma–Aldrich. For detection of Rab9, commercial rabbit-derived polyclonal antibody (Sigma) was used. The polyclonal rabbit-derived NS5A-specific serum was described by Burckstummer et al. (2006). Rabbit-derived polyclonal TNF-RI (C-20) and HXK-I (H-95) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotech. For detection of p62, LC3 and LAMP-2 (CD107b) that were used as autophagosomal markers, antibodies were purchased from Progene Biotechnik, MBL and BD Pharmingen™. Alexa 488-conjugated secondary antibody was obtained from Invitrogen. All

other fluorochrome-conjugated antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. and secondary antibodies for Western blotting were obtained from Dianova and Santa Cruz Biotech. Lipid droplets were stained using BODIPY 498/503 from Invitrogen.

SDS-PAGE and Western blot analysis. SDS-PAGE and Western blot analysis were performed as described (Burckstummer et al., 2006). Equal loading was controlled by detection of β-actin. Detection of bound secondary antibodies was performed by ECL using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate SuperSignal (Millipore) or West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Freiburg, Germany). Immunoprecipitations were analyzed using the clean blot system (Thermo Scientific) to avoid any crossreactivity with the denatured antibody fragments on the membrane.

Immunoprecipitations. HCV-replicating cells were transfected with HA-TIP47-V5/His (8 µg/1 × 10⁷ cells) and harvested after 72 h. Cells were washed with ice cold PBS and lysed in 0.1% n-octylglucopyranoside in PBS supplemented with protease-inhibitors and incubated 20 min on ice. After preincubation with Protein A/G Plus-agarose (Santa Cruz Biotech) the lysates were incubated with 3 µg antibody for 2 h at 4 °C with gentle mixing. A slurry of Protein A/G Plus-agarose (Santa Cruz Biotech) was added to the mixture and incubated for 1 h at 4 °C. The mixture was centrifuged and the resin was washed twice with lysis-buffer. 60 µl denaturing SDS sample buffer were added to the resin pellet and boiled for 5 min. The samples were analyzed by Western blot using the clean blot system to avoid any cross reactivity of the antibodies used for detection with the blotted antibodies used for precipitation (Ploen et al., 2013).

Plasmids. The plasmids pJFH1/wt, pJFH1/J6, pJFH1/GND, pFK-lucJFH1/wt have been described (Wakita et al., 2005; Miyanari et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2006; Pietschmann et al., 2006). To generate pcTIP47 and pEGFP-TIP47, human TIP47 cDNA was amplified by PCR and subsequently cloned into pcDNA 3.1.(–) (Invitrogen) or pEGFP-N1 (Clontech). An N-terminal HA-tagged TIP47 including a C-terminal V5/His-tag was generated using the TOPO TA Cloning® KIT (Invitrogen). TIP47-mutants (TIP47del, lacking amino acids 151–169 and TIP47mut harboring an amino acid exchange SVV-AAA (167–169)) described in (Hanna et al., 2002), that fail to bind Rab9 were engineered using site directed mutagenesis and cloned into pcDNA 3.1.(–) (Invitrogen) or pEGFP-N1 (Clontech). As an additional negative control pcTIP47rev was used that contains the TIP47 gene in inverse orientation. RFP-Rab9 and GFP-Rab9 were kindly provided by Prof. Höning (Universität Köln, Germany).

Real time polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA isolation was performed using peqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH) according to the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, 4 µg of total RNA was treated with DNase I (PEQLAB Biotechnologie GmbH). First-strand synthesis was carried out using Random Hexamer Primer (Fermentas) and RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) and semi-quantitative RT-PCR was performed according to the Fermentas protocol. RT-PCR was performed using the following primers: R6-260-R19 (HCV_fw) (5'-atgaccacaaggccttcg-3'), R6-130-146 (HCV_rev) (5'-cgggagagccatagtg-3'), TIP47_XhoI_fw (5'-aaactcgagcgccaccatgtctgccgacggg-3'), TIP47_Del_rev (5'-aaagaattcgccctccgacaa-ttgggt-3'), GAPDH_fw (5'-gaccttcattgacctcaac-3'), GAPDH_rev (5'-tggactgtgtcatgagtc-3').

In vitro transcription and RNA transfection. *In vitro* transcription, electroporation of HCV RNAs, and luciferase assays were performed as described (Himmelsbach et al., 2009). All luciferase assays were done at least in triplicate.

Virus titration. Virus titers were analyzed by determination of the TCID50 as described (Steinmann et al., 2008). For

detection of HCV-positive cells an NS5A-specific serum described in Burckstummer et al. (2006) was used.

Transient transfection. The cells were transfected 24 h after electroporation using linear polyethyleneimine (PEI) (Polysciences, Inc.) as described in (Ehrhardt et al., 2006) and incubated for further 48 h or 72 h. Gene expression was followed by qRT-PCR, immunofluorescence or Western Blot.

Lentiviral silencing. Expression of TIP47 and of Rab9 was silenced by lentiviral transduction as described by (Ploen et al., 2013). Lentiviral transduction Mission[®] TRC shRNA Clones (Sigma–Aldrich) were used. Huh7.5 cells (1.6×10^4 cells/ml) were seeded in 24 well plates one day prior transduction to allow cells to grow to 50–70% confluence upon transduction. The following day, cells were transduced (MOI=2), medium was changed after 18–20 h and cells were grown in complete DMEM (without puromycin) for 1–2 days. For selection, cells were trypsinized and transferred to a 10 cm petridish and grown in complete DMEM containing puromycin (5 µg/ml). Fresh medium was replaced every 3–4 days until resistant colonies could be isolated. Successful knockdown was detected by Western blot analysis. Transduced cells were grown in complete DMEM supplemented with 5 µg/ml puromycin.

Heparin-affinity chromatography. 50 ml supernatant derived from HCV-replicating Huh7.5 cells or from control cells (electroporated with JFH1/J6 or JFH1/GND – HCV RNA) were loaded on Hitrap heparin columns equilibrated with 0.02 M Tris–HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl using a Äkta chromatography system (GE healthcare). The columns were washed with 10 volumes of equilibration buffer. Bound proteins were eluted with 0.02 M Tris/HCl (pH 7.4), 2 M NaCl. Fractions of 1 ml were collected and analyzed by Western blot (Zahn and Allain, 2005).

Indirect immunofluorescence analysis. The cells were fixed using 4% formaldehyde (10 min at 25 °C) or ethanol:acetone (1:1) (10 min on ice). Cells were stained with specific antibodies for 1 h at room temperature in a humid chamber and finally mounted with Mowiol. Immunofluorescence staining was analyzed using a confocal laser scanning microscope (CLSM 510 Carl Zeiss) and LSM image browser software. The used objectives were 63× and 100×, n.a. 1.46.

Immunolabeling of HCV particles for electron microscopy. Huh7.5 cells were electroporated with HCV RNA (JFH1/J6) as described above and seeded in six well plates. 24 h after electroporation cells were transfected with 1 µg pcTIP47 as described above. 24 h after transfection the medium was changed to serum-free OptiMEM medium and supernatants (SN) were collected 48 h after transfection. The SN was concentrated 50 fold in Centricon centrifugal devices with a 100 kDa cut-off and loaded on a sucrose step gradient (20–60%). After ultracentrifugation for 2 h at $150,000 \times g$ four fractions were collected from the top of the gradient. Fraction 3 that contains most infectious particles and HCV-RNA, was further concentrated 10 fold using Amicon Ultra-0.5 ml centrifugal filters.

For immunogold-labeling the concentrated supernatant (40 µl) was incubated for 30 min at RT with mouse monoclonal E2-antibody and rabbit polyclonal TIP47-antibody diluted 1:100 in PBS. Afterwards the samples were incubated with the corresponding secondary antibody conjugated to 5- (mouse) or 10 nm (rabbit) gold-particles (BioCell, UK) for 30 min at RT diluted 1:100 in PBS. The gold-particles were precipitated by centrifugation for 1 h at $17,000 \times g$ at 4 °C and the pellet was finally diluted in 40 µl PBS. 20 µl were subjected to Ni300-grids and incubated for 10 min at RT. The grids were washed two times in PBS and finally five times with H₂O. Negative staining was performed by application of 2% uranyl acetate for 10 s at RT. The grids were examined using transmission electron microscope (Zeiss EM109; Jena, Germany) operating 80 kV and electron micrographs were taken with a SSCCD camera

(TRS, Moorenweis, Germany) using iTEM 5.0 Software (Olympus, Muenster, Germany).

Results

TIP47 is part of the released viral particle

HCV particles are heavily associated with lipids and lipoproteins. In accordance with this, it was shown recently that apoE is associated with the viral particle (Jiang, 2009; Owen et al., 2009; Catanese et al., 2013; Merz et al., 2011). Since TIP47 harbors an apoE homologue domain and is recruited to the LDs *via* its N-terminal PAT domain, we analyzed whether TIP47 is associated with the viral particle. Therefore, we purified the supernatant of HCV replicating and HCV negative cells (control) by affinity chromatography on a heparin column. Analysis of the eluate fractions by Western blot revealed that TIP47 is co-purified with the viral particle but cannot be detected in the corresponding fractions from HCV negative cells (Fig. 1a). The co-purification of TIP47 with the viral particle suggests that TIP47 is part of the viral particle. The association of TIP47 with viral particles was further confirmed by immunoprecipitations of supernatants from HCV replicating cells (Fig. 1b) demonstrating that HCV particles could be co-precipitated by a TIP47-specific antiserum and *vice versa*. In accordance to this, immunogold electron microscopy of viral particles enriched from the supernatant of HCV producing cells using E2- and TIP47-specific antisera (Fig. 1d) demonstrated that TIP47 is associated with HCV particles. Moreover, it was observed that pre-incubation of HCV containing supernatants with TIP47-specific antisera significantly decreases their infectivity (Fig. 1e).

Taken together, several lines of evidence show that TIP47 is associated with the viral particle.

Confocal double immunofluorescence microscopy staining of liver sections derived from HCV infected patients using E2- and TIP47-specific antisera further indicated that TIP47 is associated to the viral particle (Fig. 1c).

Rab9 is associated with TIP47 at the intracellular HCV particles

Based on our observation that TIP47 is associated with extracellular viral particles we analyzed whether TIP47 already associates with intracellular viral particles. Confocal double immunofluorescence microscopy of HCV replicating cells shows that a fraction of TIP47 partially colocalizes with the HCV core (Fig. 1f). Coimmunoprecipitation experiments of cellular lysates derived from HCV replicating cells confirmed an interaction of TIP47 with intracellular particles (Fig. 1g) as HCV could be efficiently precipitated by TIP47-specific antiserum. In the *vice versa* reaction using an E2-specific antiserum TIP47 was precipitated as well (Fig. 1g). This confirms that TIP47 is associated with the intracellular particle.

TIP47 has been described as an intracellular sorting factor (Diaz and Pfeffer, 1998). This functionality of TIP47 depends on the interaction of TIP47 with Rab9. Rab proteins and their effectors facilitate vesicular transport by tethering donor vesicles to their respective target membrane (Zerial and McBride, 2001). To study whether Rab9 interacts with TIP47 in Huh7.5 cells we investigated whether TIP47 colocalizes with Rab9 in these cells. Confocal double immunofluorescence of Huh7.5 cells shows a partial colocalization of TIP47 with Rab9 (Fig. 2a). To study whether the interaction of TIP47 with Rab9 can be observed in HCV replicating cells, confocal immunofluorescence microscopy of HCV-positive, RFP-Rab9- and GFP-TIP47- overproducing cells was performed. Here a partial colocalization of Rab9 with TIP47 and NS5A could be observed (Fig. 2b and c). The interaction of TIP47 with Rab9 could be

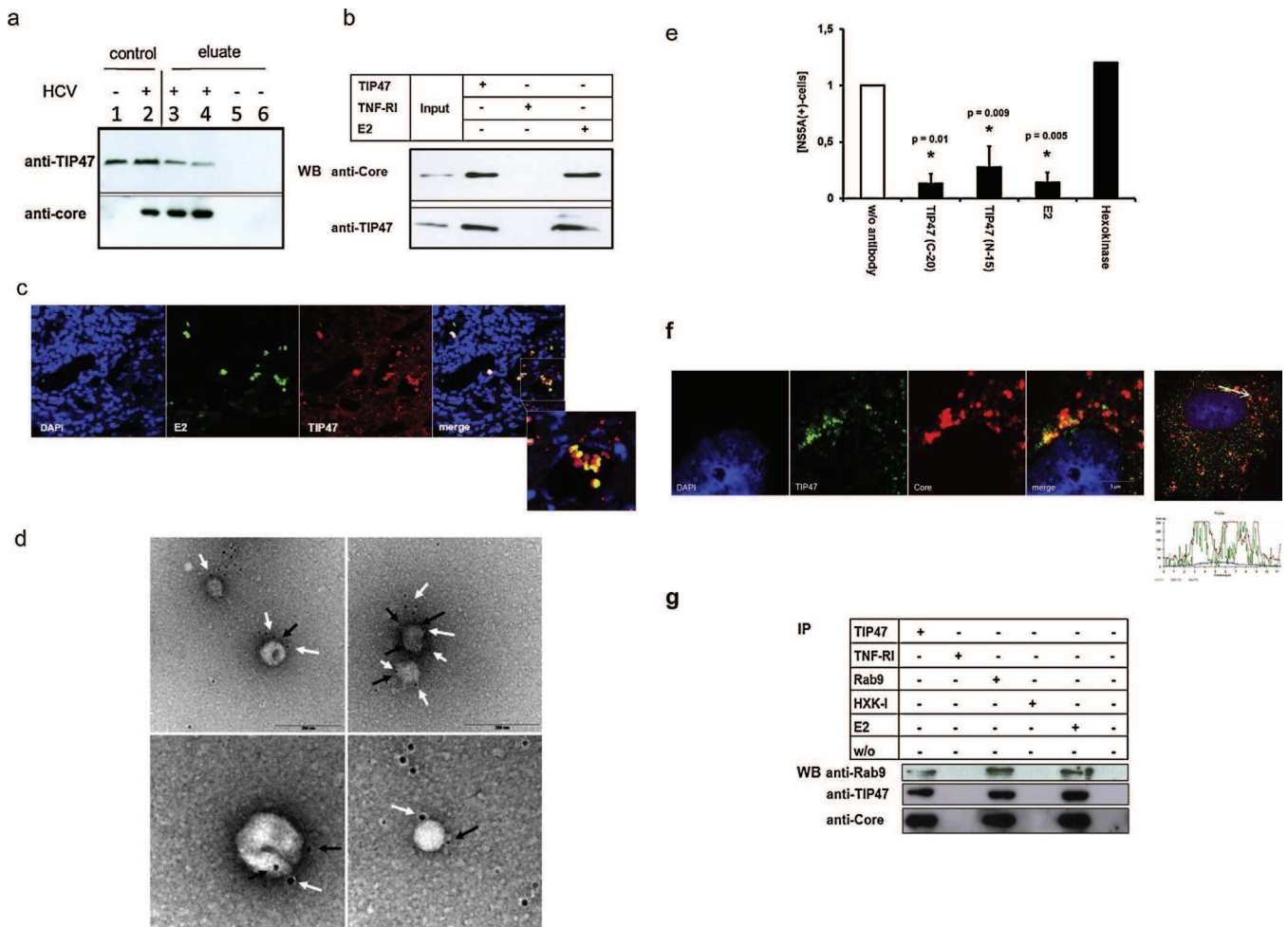


Fig. 1. TIP47 is associated with the viral particle. (a) Huh7.5 cells were electroporated with the JFH1/J6 or JFH1/GND (control). 72 h after electroporation, the supernatants were collected and loaded on a heparin column. Bound viral particles were eluted by step elution at an increased NaCl concentration (2M NaCl) (lanes 3–6). The eluate fractions were analyzed by Western blot using core- and TIP47-specific antisera. Lysates of Huh7.5 cells (lane 1) and HCV-replicating Huh7.5 cells (lane 2) served as positive controls. The eluate fraction from the column loaded with JFH1/J6 supernatant is shown in lanes 3 and 4, the corresponding fractions of the control column loaded with JFH1/GND-derived supernatant in lanes 5 and 6. (b) Supernatants obtained from HCV-replicating Huh7.5 cells were concentrated 20-fold using a Millipore centrifugation concentration unit. The concentrated supernatants were immunoprecipitated using TIP47-, E2- (positive control) or a TNF-RI (Tumor Necrosis Factor Receptor-Type 1) – (negative control) specific antiserum. The precipitates were analyzed by Western blot using a core- or TIP47-specific antiserum. Concentrated supernatant served as positive control. (c) Confocal immunofluorescence microscopy (400 \times magnification) of liver sections derived from a patient suffering from chronic HCV infection using TIP47 (red) – and E2-specific serum (green). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (d) Electron micrograph of HCV particles that were enriched from the supernatant of HCV replicating cells. The viral particles were labeled using TIP47- and E2-specific antibodies that were visualized by sec. antibodies conjugated to 5 or 10 nm sized gold particles. E2-specific labeling is visualized by the black arrows, the TIP47 specific staining by the white arrows. (e) Huh7.5 cells were infected with supernatants from HCV-replicating cells. The supernatants were preincubated for 1 h at room temperature with 50 μ g/ml of two different TIP47-specific sera (TIP47 (C-20), TIP47 (N-15)) and added to the cells for 16 h. Preincubation with an E2-specific antiserum and preincubation without serum served as controls. The infectivity was analyzed by quantification of the NS5A positive cells. The graph shows relative values referred to the control and represents the mean value of three independent experiments. A hexokinase-specific antiserum served as additional negative control. The bars represent the standard deviation. (f) Confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification) of HCV-replicating Huh7.5 cells using TIP47-(green) and core-(red) specific antisera. Nuclei were visualized by DAPI (blue). The lower panel shows the intensity profile corresponding to the region spanned by the white arrow in the upper panel (TIP47 in green and core in red). (g) Cellular lysates derived from HCV-replicating Huh7.5 cells were subjected to immunoprecipitations using TIP47-, Rab9-, E2- (positive control) or a TNF-RI (Tumor Necrosis Factor Receptor-Type 1)- and HXK-I (Hexokinase 1) (negative control) specific antiserum. To avoid overloading different amount of precipitates were loaded. The precipitates were analyzed by Western blotting using a Rab9-, core- or TIP47-specific antiserum.

confirmed by coimmunoprecipitation experiments of cellular lysates derived from HCV-replicating cells. However, in case of cells that overproduce a deletion mutant of TIP47, that lacks the Rab9 binding domain, no coprecipitation of TIP47 with Rab9 was observed (Fig. 2d). This indicates that Rab9 can specifically bind to TIP47 in HCV replicating cells.

Silencing of Rab9 expression impairs HCV replication

We have recently described that silencing of TIP47 does not affect the replication of the viral genome but prevents the release of viral particles. To study the relevance of Rab9 and the formation of the TIP47/Rab9 complex for the HCV

genome replication and release of viral particles, the expression of Rab9 was silenced by lentiviral transduction. The knock-down of the Rab9 expression was demonstrated by Western blotting (Fig. 3a). The Western blot analyses further showed a decrease of the HCV core amount in Rab9 deficient cells compared to the control cells (Fig. 3a). Electroporation of Rab9 knockdown cells with the genome of an HCV luciferase reporter virus (JFH1-luc) revealed that Rab9 silencing impairs HCV replication (Fig. 3b). Since the Western blot (Fig. 3a) shows that still a small amount of core is produced a quantification of the particle release by determination of the TCID50 of supernatants derived from JFH-1 transfected Huh7.5 wt compared to Huh7.5 Rab9 knockdown cells was performed (Fig. 3c). This experiment showed that silencing of

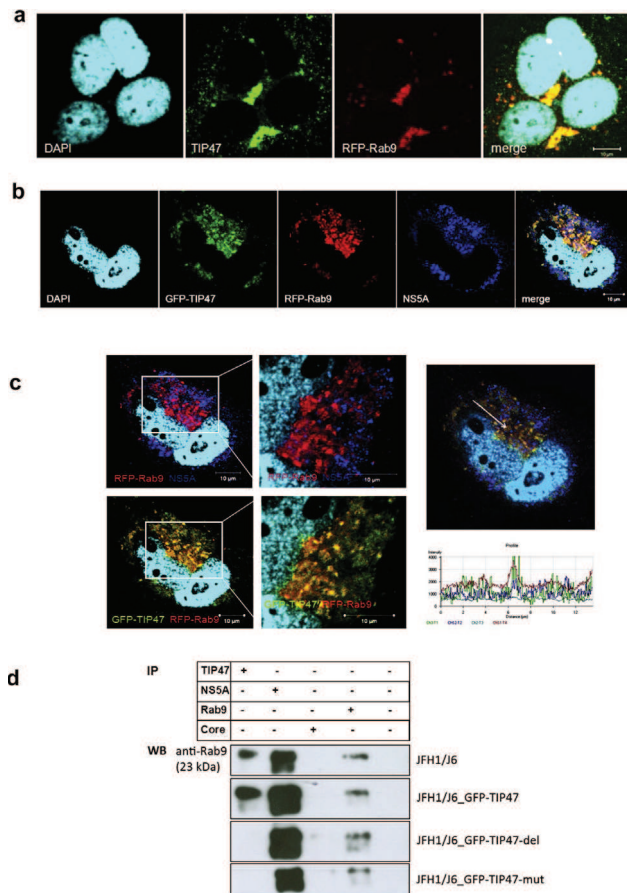


Fig. 2. Rab9 is associated with TIP47 in HCV replicating cells. (a) Confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification) of Huh7.5 cells that were transfected with an expression vector encoding RFP-Rab9 (red). Endogenous TIP47 was detected by a TIP47-specific antibody (green). Nuclei were visualized by DAPI (blue). The cells were analyzed by confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification). (b) Confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification) of Huh7.5 cells stably overproducing GFP-TIP47 (green) were electroporated with JFH1/J6 HCV RNA and cotransfected with an expression vector encoding RFP-Rab9 (red). NS5A was detected by a polyclonal serum (blue). The cells were analyzed by confocal immunofluorescence microscopy (1000 \times magnification). (c) Higher magnification of the indicated field shown in b. The lower panel shows the intensity profile corresponding to the region spanned by the white arrow in the upper panel (blue: NS5A, red: RFP-Rab9, green: GFP-TIP47). (d) Coimmunoprecipitation of cellular lysates derived from HCV-replicating cells (JFH1/J6) that stably overproduce GFP-TIP47wt, GFP-TIP47del or GFP-TIP47mut using TIP47-, Rab9, NS5A- or a Core-specific serum (control) were used. The precipitates were analyzed by Western blot using a Rab9-specific serum.

Rab9 expression prevents the release of viral particles. These data demonstrate that loss of Rab9 impairs HCV replication.

The importance of Rab9 for late-endosome-to-plasma-membrane vesicular transport during the life cycle of diverse virus (e.g. HIV-1, Ebola, Marburg and measles viruses) has been described recently by Murray et al. (2005). In this context, also TIP47 has been described to be important for the life cycle of other viruses. In HIV infected cells, TIP47 is required for the encounter between Gag (group specific antigen) and Env (envelope) and plays an important role for the incorporation of Env into mature virions (Blot et al., 2003; Lopez-Verges et al., 2006; Bauby et al., 2010). Silencing of TIP47 as well as Rab9 leads to impaired HIV replication and decreased infectivity (Murray et al., 2005; Lopez-Verges et al., 2006; Bauby et al., 2010).

Destruction of the Rab9 binding site in TIP47 inhibits the release of viral particles

Since the data obtained from the Rab9-deficient cells show an impaired HCV-replication the relevance of the Rab9/TIP47-interaction for the release of HCV particles remained unclear. The binding domain of TIP47 for Rab9 was characterized by Hanna et al. (2002). TIP47 mutants deficient for Rab9 binding could be generated by deletion (TIP47del) or mutation (TIP47mut) of the Rab9 binding domain. Immunofluorescence analyses of HCV-replicating cells that were transfected with a TIP47del encoding plasmid revealed that these mutants are still found on the surface of LDs together with the core protein (Fig. 3d and e). To study the relevance of the Rab9/TIP47 interaction for the viral life cycle, HCV-replicating cells were transfected with expression constructs encoding TIP47wt or TIP47del, a mutant that lacks the Rab9-binding domain. Western blot analyses of cellular lysates derived from HCV replicating cells overproducing TIP47del revealed that significant less intracellular core protein is found in these cells compared to control cells overproducing TIP47wt (Fig. 3f). In the case of the non-structural protein NS3 only a weak reduction was observed (Fig. 3f). Analysis of the viral replication using a luciferase reporter gene virus revealed that destruction of the Rab9 binding domain of TIP47 decreases, but does not abolish the HCV replication (Fig. 3g). Although there is still significant replication of the HCV genome, quantification of the amount of released infectious particles by determination of the TCID50 showed that coexpression of TIP47del inhibits the release of viral particles (Fig. 3h). These data indicate that the integrity of the Rab9 binding domain in TIP47 is a crucial prerequisite for the proper release of HCV although this mutation does not affect NS5A-TIP47 interaction (Ploen et al., 2013).

Destruction of the Rab9 binding site of TIP47 targets HCV to the autophagosome

The data described above show that destruction of the Rab9 binding domain of TIP47 abolishes the release of viral particles. In light of this, the question about the fate of the structural proteins arises. Confocal analyses show that the subcellular distribution in HCV replicating cells of TIP47del differs significantly from TIP47. In contrast to TIP47wt, the deletion mutant is mainly localized in open circular structures (Fig. 4a). The morphology of these structures and their staining by p62- (Fig. 4b and c) and LAMP2 specific (Fig. 4d) antibodies characterized these structures as autophagosomes. Comparable results were obtained for the TIP47mut construct, a mutant that harbors a mutated Rab9-binding site and of TIP47 in Rab9 knock down cells (data not shown). Since TIP47del still binds to NS5A (Ploen et al., 2013) and core colocalizes with TIP47del around these open circular structures (Fig. 3d and c) we speculated that destruction of the Rab9-binding domain in TIP47 might misdirect the *de novo* formed viral particle toward the autophagosomal/lysosomal compartment leading to a decreased intracellular level of HCV core in these cells (Fig. 3f). To verify this hypothesis, we inhibited the lysosomal activity by ammonium chloride in HCV-replicating cells that overproduce TIP47del. Subsequent Western blot analyses of cellular lysates showed that inhibition of the lysosomal function by ammonium chloride in HCV replicating cells overproducing TIP47del results in an increased amount of intracellular core (Fig. 4e, left panel). Similar results were obtained using bafilomycin (data not shown). In contrast to this, inhibition of autophagy in untransfected HCV-replicating cells resulted in a slightly decreased core-level (Fig. 4e, right panel).

Moreover, in confocal immunofluorescence staining of HCV-replicating cells two core populations can be detected. One core-fraction can be found on surface of the LDs in the perinuclear region whereas the other core-fraction is localized in the periphery

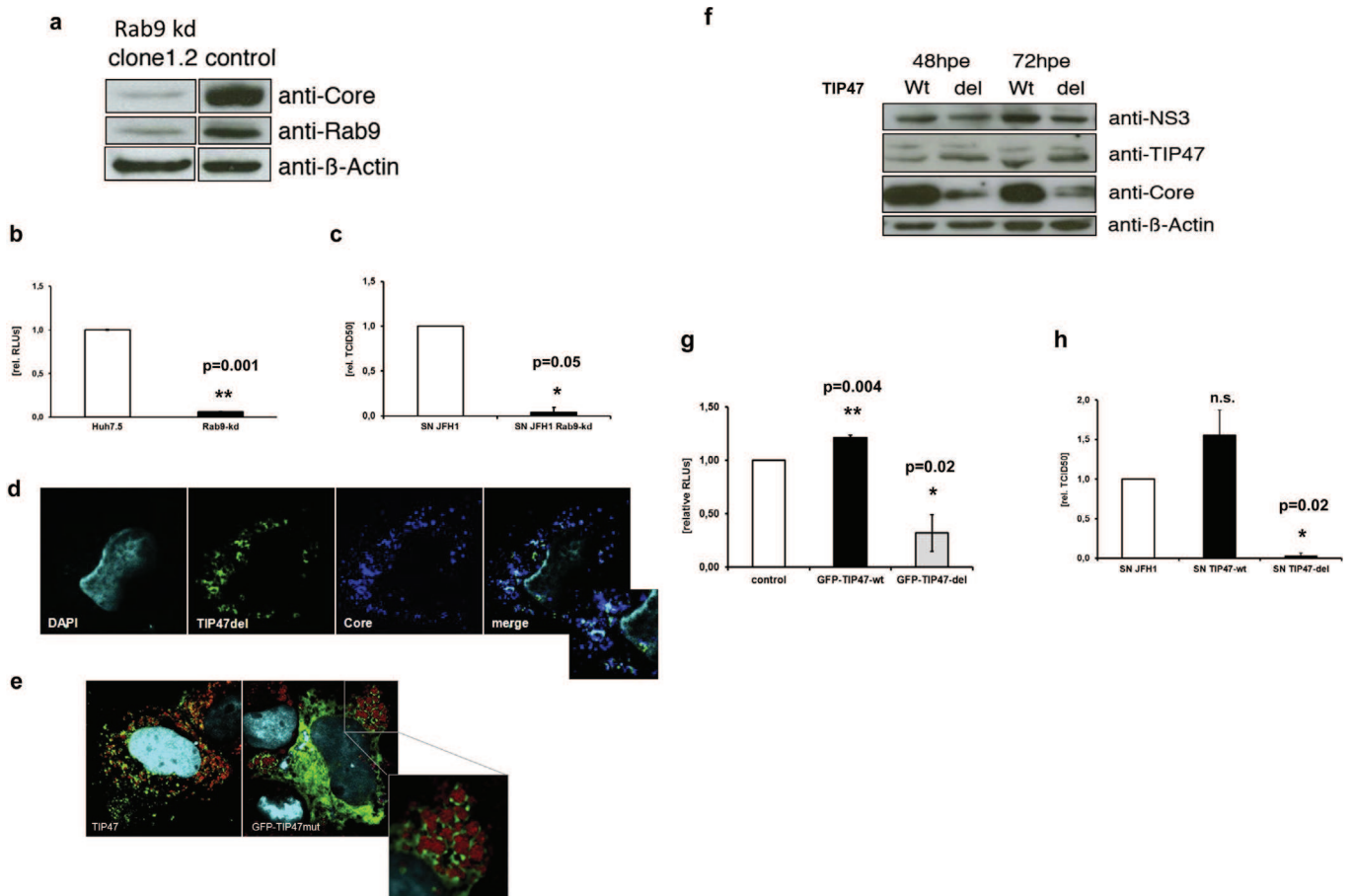


Fig. 3. Silencing of Rab9 expression prevents release of HCV particles and the integrity of the Rab9 binding site of TIP47 is required for the release of HCV particles. (a) The expression of Rab9 was silenced by a lentiviral vector. Rab9-deficient stable cell lines (Rab9-kd clone1.2) and the corresponding control cells were electroporated with the JFH1/J6 replicon. 72 h after electroporation, the cells were harvested and the lysates were analyzed by Western blot using Rab9-, core- and actin-specific antisera. (b) Rab9-deficient cells and the corresponding control cells were electroporated with the genome luciferase HCV reporter virus JFH1-luc. 72 h after electroporation, the cells were harvested and the luciferase activity was determined. (c) Rab9-deficient cells and the corresponding control cells were electroporated with the JFH-1 construct. 72 h after electroporation the amount of released viral particles was analyzed by determination of the TCID50. The data are the mean value from three independent experiments. The error bars represent the standard deviation. (d) Confocal immunofluorescence microscopy (1000× magnification) of Huh7.5 that were electroporated with the JFH-1 construct. 24 h post electroporation the cells were transfected with pcDNA TIP47del and analyzed 72 h post electroporation using a TIP47 (green) and a Core-specific serum (blue). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (e) Confocal immunofluorescence microscopy (1000× magnification) of Huh7.5 cells that were untransfected (left panel) or transfected with pGFP-TIP47mut that lacks the Rab9-binding site. In untransfected cells the endogenous TIP47 was detected by a TIP47-specific antibody (green) in the GFP-TIPmut overproducing cells the GFP-fluorescence was detected. LDs were stained with Nile Red (red). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (f) Huh7.5 cells that stably overproduce TIP47wt or TIP47del were electroporated with the JFH1/J6 HCV RNA. 48 h and 72 h after electroporation, the cells were harvested and the lysates were analyzed by Western blot using NS3-, TIP47-, core- and actin-specific antisera. (g) Huh7.5 cells that stably overproduce GFP-TIP47wt or GFP-TIP47del were electroporated with the luciferase reporter virus JFH1-luc. 72 h after electroporation, the cells were harvested and the luciferase activity was determined. (h) TIP47del expressing cells were electroporated with the JFH-1 construct. 72 h after electroporation the amount of released viral particles was analyzed by determination of the TCID50. The data are the mean value from three independent experiments. The error bars represent the standard deviation.

of the cell on LC3 positive structures representing autophagosomes. Interestingly, in the LC3 positive structures no LDs are detectable (Fig. 4f).

Taken together, these data indicate that the integrity of the TIP47/Rab9-binding domain is required for export of the viral particle. Destruction of the TIP47/Rab9 interaction misdirects the viral particle to the autophagosomal/lysosomal compartment (Fig. 4g).

Discussion

During the viral replication cycle the *de novo* synthesized viral genome is bound to NS5A (Huang et al., 2005; Wolk et al., 2008; Miyanari et al., 2007). We observed recently that TIP47 binds to the NS5A-RNA-complex and thereby is involved in the targeting of the *de novo* synthesized viral RNA from the replicon complex to the lipid droplets (Ploen et al., 2013; Vogt et al., 2013). In this study we provide evidence that TIP47 is involved in further steps

of the viral life cycle. As described recently for apoE we observed that TIP47 apart from its interaction with NS5A is associated with the viral particle. This is in accordance to the presence of an apoE-like domain within TIP47 and might reflect the affinity of TIP47 to lipoproteins. We show that the interaction of TIP47 with the forming viral particle is required for the release of the viral particle and that silencing of TIP47 abolishes the release of HCV. In this context it is interesting to note that TIP47 harbors an apoE-like domain although it is obvious that the function of TIP47 cannot be replaced by apoE and *vice versa*. Indeed, silencing of apoE expression prevents the release of HCV as well (Benga et al., 2010; Chang et al., 2007) but cannot be rescued by TIP47 (data not shown). This indicates that both proteins are associated with the viral particle but fulfill different functions. TIP47 is described to act as an intracellular sorting factor (Diaz and Pfeffer, 1998). Our data demonstrate that TIP47 is required to direct the HCV particle toward release. This function depends on the capacity to bind Rab9. While silencing of

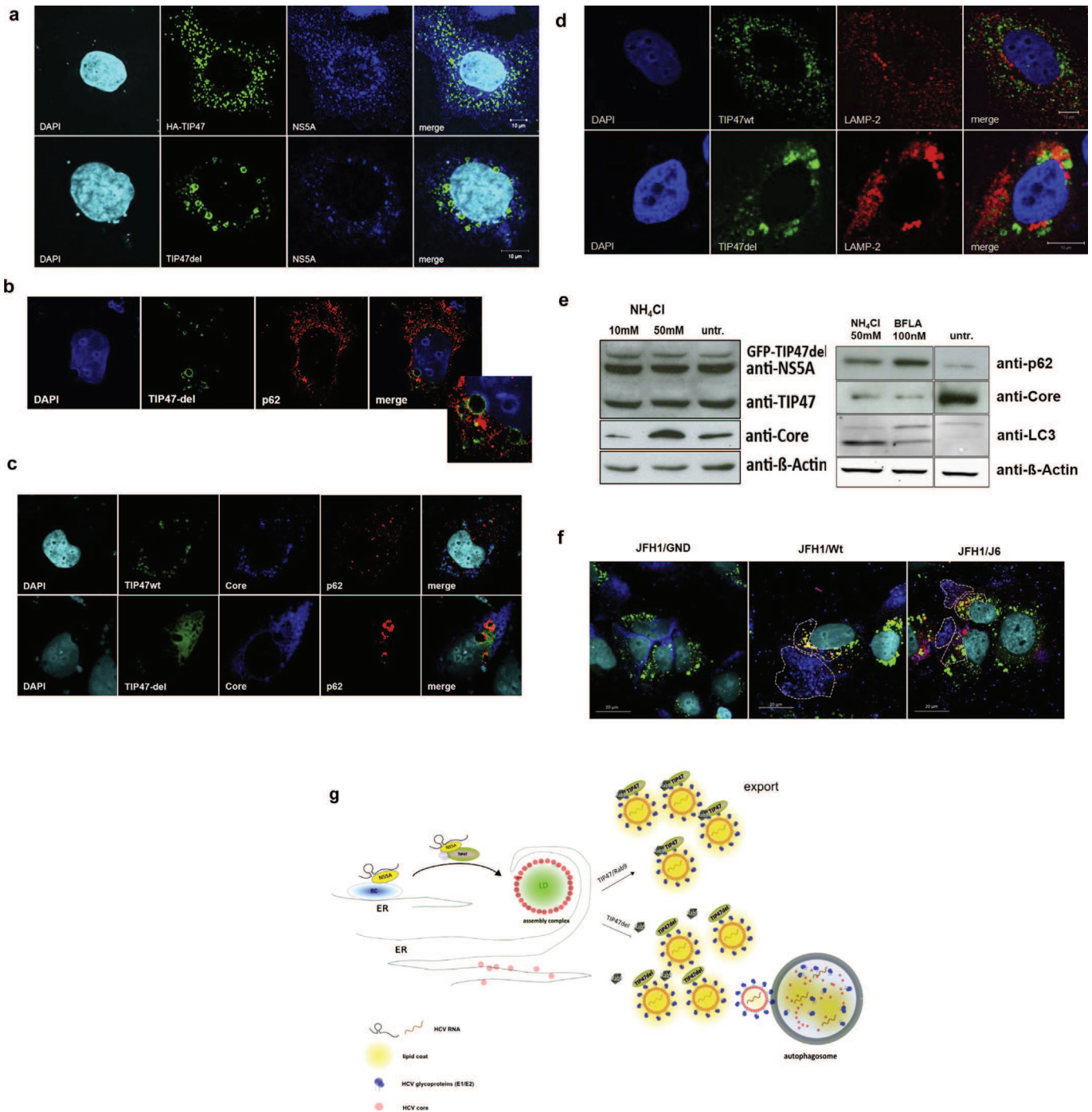


Fig. 4. Destruction of the Rab9 binding site of TIP47 misdirects HCV particles to the autophagosomal compartment. (a) Confocal immunofluorescence microscopy (1000× magnification) of Huh7.5 cells transfected with pcDNA-HA-TIP47wt or pcDNA-TIP47del using a TIP47 (green) – and NS5A (blue)-specific antiserum. Nuclei were visualized by DAPI (blue). (b) Confocal immunofluorescence microscopy (1000× magnification) of Huh7.5 cells transfected with pcDNA-TIP47del using a TIP47 (green) and a p62-specific serum (red). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (c) Confocal immunofluorescence microscopy (1000× magnification) of Huh7.5 that were electroporated with the JFH-1 construct. 24 h post electroporation the cells were transfected with pcDNA-TIP47 wt or pcDNA-TIP47del and analyzed 72 h post electroporation using a TIP47 (green) and a p62-specific serum (red). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (d) Confocal immunofluorescence microscopy (1000× magnification) of Huh7.5 cells transfected with pcDNA-TIP47wt or pcDNA-TIP47del using a TIP47 (green) and a LAMP-2-specific serum (red). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (e) Left panel: Huh7.5 cells stably overproducing TIP47del were electroporated with the JFH1/J6 HCV RNA. After 48 h, cells were grown for 24 h in the presence of the indicated concentration of ammonium chloride. The cells were then harvested and the lysates were analyzed by Western blotting using NS5A, TIP47-, core- and actin-specific antisera. Right panel: Huh7.5 were electroporated with the JFH1/Wt HCV RNA. After 48 h, cells were grown for 24 h in the presence of the indicated concentration of ammonium chloride and Bafilomycin. The cells were then harvested and the lysates were analyzed by Western blotting using p62-, core-, LC3- and actin-specific antisera. (f) Confocal immunofluorescence microscopy (1000× magnification) of Huh7.5 that were electroporated with the JFH-1/Wt, JFH1/J6 and JFH1/GND construct. 72 h post electroporation the cells were analyzed using core (red) and LC3-specific serum (blue). LDs were visualized using BodiPy488/503 (green). Nuclei were visualized by DAPI (blue). (g) Model describing the relevance of TIP47 for the HCV life-cycle.

Rab9 expression leads to an impaired replication, destruction of the Rab9 binding motif of TIP47 still allows replication but release of viral particles is abolished. Our data, based on the experiments with TIP47 mutants that fail to bind Rab9, indicate that the release of HCV particles depends on the capacity of TIP47 to interact with Rab9. Interestingly the binding of TIP47 to the viral particle or to NS5A (Ploen et al., 2013; Vogt et al., 2013) does not depend on the integrity of the Rab9 binding domain. However mutants of TIP47 that do not bind to Rab9 are strongly enriched in open circular structures that according to their morphology, and their staining with LAMP-2 and p62-specific antisera were identified as autophagosomes. It could be observed that inhibition of the lysosomal activity in cells expressing TIP47mut increases the intracellular amount of HCV-specific structure proteins. This indicates that destruction of the Rab9-binding domain misdirects the TIP47/HCV complex toward the autophagosomal/lysosomal compartment (Fig. 4f). In this context, it is interesting to speculate whether the autophagosomal/lysosomal pathway that is here targeted by overexpression of TIP47mut could be involved in the viral life cycle. Only a small fraction of the *de novo* synthesized structural proteins/viral particles are indeed released as infectious viral particles raising the question about the fate of the particles that are not released, and about the mechanisms that discriminate between particles to be released and particles to be intracellularly retained and degraded (Quinkert et al., 2005; Post et al., 2009). In light of this, it is tempting to speculate that a fraction of the *de novo* synthesized viral proteins always ends in the autophagosomal/lysosomal compartment. This process could be regulated by the level of Rab9-complexed TIP47.

TIP47 expression is increased in steatotic hepatocytes/livers. In light of the relevance of TIP47 for the HCV life cycle it is tempting to speculate that steatosis-dependent upregulation affects HCV life cycle.

Taken together, TIP47 fulfills several tasks in HCV morphogenesis and secretion. The NS5A/TIP47 interaction targets the RNA-complexed NS5A to the surface of the lipid droplets the place of virus morphogenesis where TIP47 becomes part of the viral particle. Here the interaction with Rab9 plays a crucial role for the targeting of the viral particle out of the cell. Disturbance of the TIP47/Rab9 interaction misdirects the *de novo* synthesized viral particle to the autophagosome. In light of this targeting the HCV/TIP47 interaction could represent a novel target for antiviral strategies.

Acknowledgements

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), University of Strasbourg, the French Agency for AIDS and Viral Hepatitis Research (ANRS) (ANRS 2010-307/2011-415 to C.S.) and the German center for infection research (DZIF) to E

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.12.003>.

References

- Aivazian, D., Serrano, R.L., Pfeffer, S., 2006. TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J. Cell Biol.* 173, 917–926.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T., Brechot, C., 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1200–1205.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., Andre, P., 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* 19, 95–103.
- Bauby, H., Lopez-Verges, S., Hoeffel, G., Delcroix-Genete, D., Janvier, K., Mammano, F., Hosmalin, A., Berlioz-Torrent, C., 2010. TIP47 is required for the production of infectious HIV-1 particles from primary macrophages. *Traffic* 11, 455–467.
- Benga, W.J., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., Schuster, C., 2010. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51, 43–53.
- 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.
- Blot, G., Janvier, K., Le, P.S., Benarous, R., Berlioz-Torrent, C., 2003. Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. *J. Virol.* 77, 6931–6945.
- Bulankina, A.V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J.G., Rudolph, M.G., Burger, K.N., Honing, S., 2009. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J. Cell Biol.* 185, 641–655.
- Burckstummer, T., Krieger, M., Lupberger, J., Pauli, E.K., Schmittl, S., Hildt, E., 2006. Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett.* 580, 575–580.
- Camus, G., Herker, E., Modi, A.A., Haas, J.T., Ramage, H.R., Farese Jr., R.V., Ott, M., 2013. Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J. Biol. Chem.* 288, 9915–9923.
- Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., Rice, C.M., 2013. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9505–9510.
- 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.
- Diaz, E., Pfeffer, S.R., 1998. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 93, 433–443.
- Ehrhardt, C., Schmolke, M., Matzke, A., Knoblauch, A., Will, C., Wixler, V., Ludwig, S., 2006. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction* 6 (3), 179–184.
- Gastaminza, P., Dryden, K.A., Boyd, B., Wood, M.R., Law, M., Yeager, M., Chisari, F.V., 2010. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J. Virol.* 84, 10999–11009.
- Hanna, J., Carroll, K., Pfeffer, S.R., 2002. Identification of residues in TIP47 essential for Rab9 binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7450–7454.
- Hickenbottom, S.J., Kimmel, A.R., Londres, C., Hurley, J.H., 2004. Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure* 12, 1199–1207.
- Himmelsbach, K., Sauter, D., Baumert, T.F., Ludwig, L., Blum, H.E., Hildt, E., 2009. New aspects of an anti-tumour drug: sorafenib efficiently inhibits HCV replication. *Gut* 58, 1644–1653.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale Jr., M., Ye, J., 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5848–5853.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., Cameron, C.E., 2005. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 280, 36417–36428.
- Jiang, J., Luo, G., 2009. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J. Virol.* 83 (24), 12680–12691.
- 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.
- Lavanchy, D., 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 29 (Suppl. 1), 74–81.
- Lopez-Verges, S., Camus, G., Blot, G., Beauvoir, R., Benarous, R., Berlioz-Torrent, C., 2006. Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14947–14952.
- 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.
- Merz, A., Long, G., Hiet, M.S., Brugger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2011. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J. Biol. Chem.* 286, 3018–3032.
- Miyazawa, 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.
- Moradpour, D., Penin, F., Rice, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 453–463.
- Murray, J.L., Mavrakakis, M., McDonald, N.J., Yilla, M., Sheng, J., Bellini, W.J., Zhao, L., Le Doux, J.M., Shaw, M.W., Luo, C.C., Lippincott-Schwartz, J., Sanchez, A., Rubin, D.H., Hodge, T.W., 2005. Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus. *J. Virol.* 79, 11742–11751.
- Owen, D.M., Huang, H., Ye, J., Gale Jr., M., 2009. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394, 99–108.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., Bartenschlager, R., 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7408–7413.
- Ploen, D., Hafirassou, M.L., Himmelsbach, K., Sauter, D., Biniossek, M.L., Weiss, T.S., Baumert, T.F., Schuster, C., Hildt, E., 2013. TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 58 (6), 1081–1088.

- Post, J., Ratnarajah, S., Lloyd, A.R., 2009. Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 733–756.
- Quinkert, D., Bartenschlager, R., Lohmann, V., 2005. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J. Virol.* 79, 13594–13605.
- Steinmann, E., Brohm, C., Kallis, S., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2008. Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J. Virol.* 82, 7034–7046.
- Vogt, D.A., Camus, G., Herker, E., Webster, B.R., Tsou, C.L., Greene, W.C., Yen, T.S., Ott, M., 2013. Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog.* 9, e1003302.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T.J., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791–796.
- Wolins, N.E., Rubin, B., Brasaemle, D.L., 2001. TIP47 associates with lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 276, 5101–5108.
- Wolk, B., Buchele, B., Moradpour, D., Rice, C.M., 2008. A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* 82, 10519–10531.
- Zahn, A., Allain, J.P., 2005. Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. *J. Gen. Virol.* 86, 677–685.
- Zerial, M., McBride, H., 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117.

Mohamed Lamine HAFIRASSOU
**Etude du rôle des protéines cellulaires
RACK1 et TIP47 dans l'infection par le
virus de l'hépatite C.**

RESUME.

Le virus de l'hépatite C (VHC) dépend de facteurs cellulaires pour accomplir son cycle viral et persister dans l'hôte. L'une des stratégies de notre laboratoire consiste à étudier de manière approfondie le réseau d'interactions virus-hôte, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques cellulaires et de développer des antiviraux plus efficaces pour vaincre la résistance virale.

Durant ma thèse j'ai étudié deux facteurs cellulaires qui sont impliqués dans le cycle de développement du VHC. Le premier facteur est la protéine ribosomale RACK1. Nous avons montré que cette protéine est spécifiquement requise pour la traduction IRES-dépendante du VHC, et non pour la traduction coiffe-dépendante utilisée par la plupart des ARNm cellulaires. Le deuxième facteur est une protéine de surface des gouttelettes lipidiques appelée TIP47. Nous avons montré que cette protéine intervient dans le cycle viral, d'une part, en interagissant avec la protéine virale NS5A pour permettre l'assemblage des virions ; d'autre part, en participant à l'export des particules virales grâce à son interaction avec la GTPase Rab9. L'ensemble de ces travaux montre que de nouvelles cibles thérapeutiques pourraient être envisagées pour lutter contre le VHC.

Mots clés : VHC, RACK1, Traduction, IRES, TIP47, assemblage, gouttelettes lipidiques, Rab9, Export.

ABSTRACT.

The hepatitis C virus (HCV) relies on cellular factors to complete its life cycle and persist in its host. One of the strategies employed by our laboratory is the in-depth study of the network of virus-host interactions to identify new therapeutic cellular targets and develop more effective antivirals to overcome viral resistance.

During my PhD, I studied two cellular factors involved in the HCV life cycle. The first factor is the ribosomal protein RACK1. We have shown that this protein is specifically required for the HCV IRES-mediated translation but not for the cap-mediated translation that is used by the large majority of cellular mRNAs. The second factor is the lipid droplets binding protein TIP47. We have shown that this protein is involved in the HCV life cycle, firstly, by interacting with the viral protein NS5A to allow virion assembly; secondly, by participating in the export of viral particles through its interaction with the GTPase Rab9. This work shows that new therapeutic targets could be considered in the fight against HCV.

Key words: HCV, RACK1, Translation, IRES, TIP47, viral assembly, lipid droplets, Rab9, viral egress.