

## Extrémités 3' de l'ARN du Virus de l'Hépatite C: structures et Rôles dans la réplication du génome Chloe Jaubert

### ▶ To cite this version:

Chloe Jaubert. Extrémités 3' de l'ARN du Virus de l'Hépatite C : structures et Rôles dans la réplication du génome. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0219 . tel-01531195

## HAL Id: tel-01531195 https://theses.hal.science/tel-01531195

Submitted on 1 Jun2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

## **DOCTEUR DE**

## L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Science de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Microbiologie - Immunologie

Par Chloé JAUBERT

# EXTREMITES 3' DE L'ARN DU VIRUS DE L'HEPATITE C : **STRUCTURES ET ROLES DANS LA REPLICATION DU GENOME**

Sous la direction de : Michel VENTURA

Soutenue le 18 novembre 2016

Membres du jury :

Mme le Professeur Marie-Edith Lafon Université de Bordeaux Mme le Docteur Catherine Schuster Mr le Docteur Xavier Hanoulle Mr le Docteur Carmelo Di Primo Mr le Docteur Michel Ventura

Université de Strasbourg Université de Lille Université de Bordeaux Université de Bordeaux

Présidente Rapporteur Rapporteur Invité Directeur de thèse **Titre :** Extrémités 3' de l'ARN du Virus de l'Hépatite C : Structures et Rôles dans la réplication du génome

**Résumé :** Le génome du virus de l'Hépatite C est constitué d'un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive (+). Les interactions ARN-ARN prennent une place essentielle dans la régulation du cycle viral.

La synthèse de l'ARN est réalisée par l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) codée par le virus. Elle serait initiée à l'extrémité 3' des molécules à répliquer. Un ARN génomique complémentaire de polarité négative (-) est d'abord synthétisé. Il sert ensuite de matrice pour la production des brins génomiques. Les mécanismes qui président au recrutement de la polymérase et à l'initiation de la synthèse d'ARN restent, aujourd'hui, mal connus.

Les structures ARN présentes aux extrémités 3' et leurs rôles ont donc étés étudiés au cours des travaux de cette thèse. Au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN (+), la dimérisation a été montrée indispensable à la réplication du virus *in cellulo*. Ces travaux ont par la suite permis de caractériser par gel retard et cryo-microscopie la dimérisation des ARN génomiques en solution. Au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN (-), la dimérisation de deux molécules a également pu être caractérisée par des approches biochimiques et biophysiques. Par ailleurs la présence d'un G-quadruplex introduit un remaniement conformationnel qui se révèle indispensable à une synthèse performante de l'ARN. De manière similaire au brin génomique, la dynamique structurale résultante de ces interactions semble donc nécessaire à une réplication efficace de l'ARN par la RdRp.

Les résultats obtenus soulignent l'importance de la dimérisation et des variations conformationnelles prisent aux extrémités 3' pour la réplication de l'ARN. Ces données ouvrent alors la voie vers de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes qui président au fonctionnement de la polymérase du VHC.

Mots clés : HCV, Structures ARN, Réplication, Extrémités 3'.

**Title**: Hepatitis C Virus RNA 3' ends : Structures and Roles in Genome Replication

**Abstract :** The hepatitis C virus genome consists of a linear positive sens (+) single-stranded RNA. RNA-RNA interactions play an essential role in the regulation of the viral cycle.

RNA synthesis is performed by the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) encoded by the virus. It would be initiated at the 3 'end of the molecule to be replicated. A complementary genomic RNA of negative polarity (-) is first synthesized. It then serves as a matrix for the production of genomic strands. The mechanisms that govern the recruitment of the polymerase and the initiation of RNA synthesis remain poorly understood today.

The RNA structures found at the 3 'ends and their roles have therefore been studied during the work of this thesis. At the 3 'end of the (+) RNA, dimerization was shown to be essential for replication of the virus in cellulo. This work made it possible to characterize by gel shift assay and cryo-microscopy the dimerization of the genomic RNAs in solution. At the 3 'end of (-) RNA, the dimerization of two molecules could also be characterized by biochemical and biophysical approaches. Moreover, the presence of a G-quadruplex introduces a conformational reshuffle which proves to be indispensable for an efficient RNA synthesis. Similarly to the genomic strand, the resulting structural dynamics of these interactions appear to be necessary for efficient RNA replication by the RdRp.

The results obtained here underline the importance of dimerization and conformational variations at the 3 'ends for RNA replication. These data then open the way to new perspectives on understanding the mechanisms that govern the functioning of HCV polymerase.

Key Words : HCV, RNA structure, genome replication, 3' ends

#### Unité de recherche

CNRS MFP UMR5234 Equipe Variabilité, réplication et mobilité des génomes viraux et bactériens Université de Bordeaux Bat 3A, 3ème étage, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cedex

# SOMMAIRE

# Sommaire

SOMMAIRE	
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	
I- L'Hepatite C	
I-1- Découverte du virus	
I-2- Epidémiologie	
I-2-1- Prévalence	
I-2-2- Transmission	
I-3- Tropisme du VHC	
I-4- Diagnostic	
I-5- Pathologie	
I-6- Réponse immunitaire contre le VHC	
I-6-1- La réponse innée	
I-6-2- Réponse adaptative	
I-6-3- Traitements antiviraux non spécifiques	
II- LE VIRUS DE L'HEPATITE C	
II-1- Classification	
II-2- Diversité génétique	
II-2-1- Génotypes	
II-2-2- Recombinants	
II-3- La particule virale	
II-4- Le génome	
II-5- Les protéines	
II-5-1- La protéine Core	
II-5-2- Les protéines ARFP/F/Core+1	
II-5-3- Les protéines E1 et E2	
II-5-4- La protéine P7	
II-5-5- La protéine NS2	
II-5-6- La protéine NS3	

II-5-7- La protéine NS4A	
II-5-8- La protéine NS4B	
II-5-9- La protéine NS5A	
II-5-10- La protéine NS5B	35
II-6- Inhibiteurs des protéines du VHC	
II-6-1- Inhibiteurs de la NS3-4A	40
II-6-2- Inhibiteurs de la NS5A	
II-6-3-Inhibiteurs de la NS5B	41
III- CYCLE DE VIE DU VHC	41
III-1- Entrée du virus	41
III-2- Traduction de la polyprotéine virale	
III-3- Réplication de l'ARN viral	44
III-4- Assemblage et sortie des particules virales	46
IV- Modeles d'etude du Virus de l'Hepatite C	48
IV-1- Systèmes d'étude de l'entrée	
IV-1-2- Les virus-like particules (VLP)	
IV-1-3- Les pseudo-particules du VHC (VHCpp)	
IV-2- Systèmes d'étude de la réplication	49
IV-2-1- Le réplicon	
IV-2-2- Le minigénome	50
IV-3- Systèmes d'étude du cycle complet	50
IV-3-1- Les particules virales produites en culture cellulaire (VHCcc)	50
IV-3-2- Les modèles animaux	51
V- LES INTERACTIONS ARN-ARN	
V-1- Structures de type Watson-Crick	53
V-1-1- Le brin positif	53
V-1-2- Le brin négatif	58
V-2- Structures de type Hoogsteen	61
V-2-1- Structure des G-quadruplexes	61
V-2-2- Rôle des G-quadruplexes	61
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	67
MATERIELS ET METHODES	70

I- MATERIELS	70
I-1- Oligonucléotides / Synthèse de gène	
I-2- Oligonucléotides couplés aux billes d'or	
I-3- Plasmides	
I-3-1- LMTV	
I-3-2- Minigénome	
I-4- Polymérases virales	71
I-5- Bactéries	71
I-6- Cellules humaines	71
I-6-1- Huh7	71
I-6-2- Huh7/Rep5.1	71
II- METHODES	72
II-1- Culture bactérienne	
II-1-1- Préparation bactéries chimio-compétentes	72
II-1-2- Transformation des bactéries chimio-compétentes	72
II-2- Préparation des acides nucléiques	
II-2-1- Purification des préparations d'ADN	72
II-2-2- Clonage	73
II-2-3- Mutagénèse dirigée	73
II-2-4- Préparation des ADN pour la transcription in vitro	74
II-2-5- Préparation des ARN in vitro	75
II-3- Analyses in cellulo	77
II-3-1- Culture cellulaire	77
II-3-2- Transfection des cellules	77
II-3-3- Infection des cellules	77
II-3-4- Tests de cytotoxicité	
II-3-5- Cytométrie en flux	
II-3-6- Quantification de la Gaussia Luciférase	
II-3-7- Extraction des ARN	79
II-3-8- RT-qPCR	79
II-4- Analyses in vitro	80
II-4-1- Tests de synthèse avec la RdRp virale	80
II-4-1- Reverse transcription des ARN par la SuperScript III	

II-4-2- Amplification des ADNc recombinants	81
II-4-3- Electrophorèses	81
II-4-4- Microscopie électronique à transmission	82
RESULTATS - DISCUSSION	85
I- STRUCTURE ET ROLE DE L'EXTREMITE 3' DE L'ARN GENOMIQUE	85
I-1- La dimérisation du génome est nécessaire pour la réplication virale	86
I-1-1- Design et analyse des mutants de dimérisation	86
I-1-2- La dimérisation de l'ARN génomique est requise pour la réplication virale	87
I-1-3- Effet de la dimérisation génomique au niveau de la traduction	89
I-1-4- Effet de la dimérisation génomique au niveau de la réplication de l'ARN	90
I-1-5- La dimérisation est nécessaire pour une synthèse efficace par la RdRp	92
I-1-6- Conclusion - discussion	93
I-2- Analyse de la dimérisation du génome du VHC in vitro	95
I-2-1- Etude de la dimérisation par gel natif	95
I-2-2- Etude de la dimérisation par microscopie électronique	96
I-2-3- Conclusion – discussion	102
I-3- Dimérisation du génome et recombinaison	104
I-3-1- Analyse de la recombinaison in vitro	104
I-3-2- Conclusion-discussion	105
II- STRUCTURE ET ROLE DE L'EXTREMITE 3' DU BRIN NEGATIF	107
II-1- Identification de la région de l'extrémité 3' de l'ARN (-) impliquée dans la syr	nthèse
de l'ARN	108
II-1-1- Le niveau de la réplication virale est modulé par la nature de l'IRES	108
II-1-2- Le niveau de synthèse par la RdRp est modulé par la nature des IRES nég	atifs
II-1-3- Les 157 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin (-) sont responsabl	108 es des
variations de synthèse.	109
II-1-4- Conclusion – discussion	110
II-2-A la recherche de la dimérisation du brin négatif	111
II-3- Caractérisation d'un G-auadrunlex à l'extrémité 3' du brin négatif	112
II-3-1- Analyse in silico	112
II-3-2- Effet des ligands de G-quadruplexes sur la synthèse de l'ARN	112
II-3-3- Identification d'un G-quadruplex dans le domaine SL-C1	113

II-3-4- Effet des ligands de G-quadruplexes sur la réplication du VHC	117
II-3-5- Conclusion – discussion	
II-4- Dimérisation de l'extrémité 3' du brin négatif	121
II-4-1- Implication de la SL-B1 dans la dimérisation	
II-4-2- Importance de la dynamique structurale dans la synthèse de l'ARN	122
II-4-3- Conclusion – discussion	123
CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES	
RÉFÉRENCES	
ANNEXES	163

# **ABREVIATIONS**

# Abréviations

AAD : Antivirus Action directe ALAT : Alanine AminoTransferase **ARFP** : Alternative Reading Frame Protein CKII : Caséine Kinase II CLR : C-type Lectin Receptor CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité DC : Celluled Dendritique DGAT1 : Diacylglycerol acyltransferase-1 **DMV** : Double Membrane Vesicule EBNA1 : Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1 eIF : Facteur d'initiation ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay EMCV : Encéphalomyocardite virus FRET : Förster Resonance Energy Transfert GAG : Glycosaminoglycane GL : Gouttelette Lipidique HDL : Lipoprotéine de Haute Densité hRNP : Ribonucléoproteines hétérogènes HVR : Région Hypervariable HygroR : Hygromycine phosphotransférase IFITM : IFN Induced Transmembrane Protein **IRES** : Internal Ribosome Entry Site IRF : Interferon Regulatory Factor **ISG** : IFN-Stimulated genes JFH-1 : Japanese Fulminant Hepatitis 1 KSHV : Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus LCS : Low Complexicity Sequences LDL : Low Density Lipoprotein LDLR : Low-Density Lipoprotein Receptor

MAVS : Mitochondrial antiviral signaling protein

- MW : Membranous Web
- nAB : Anticorp neutralisant
- NBM : Nucleotide-Binding Motif
- NLR : Nod-like Receptor
- NOD : Nucleotide Oligomerization Domain
- OAS: 2',5'-Oligoadenylatesynthetase
- OCLN : Occludine
- ORF : Phase ouverte de lecture
- PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
- PBMC : Cellule mononuclée du sang périphérique
- pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
- PI4P : Phosphatidyl-Inositol-4-Protein
- PKR : Protéine kinase R
- PRR : Pattern Recognition Receptor
- RIG-I : Retinoic acid-Inductible Gene 1
- RLR : RIG-I (Retinoic acid-Inductible Gene 1)-Like Receptors
- RT-pPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
- RVS : Réponse Virologique Soutenue
- SRB1 : Scavenger Receptor B1
- Tag : Large T-antigène
- TCR : T cell receptor
- TLR : Toll\_like Receptor
- TNF: Tumor Necrosis Factor
- UTR : Untranslated Region
- VAMP : Vesicle-Associated Membrane Protein
- VLDL : Very Low Density Lipoprtotein

# INTRODUCTION

# Introduction

## I-L'Hépatite C

## I-1- Découverte du virus

Au milieu des années 1970, un certain nombre d'hépatites post transfusionnelles n'étaient pas reconnues comme étant dues au virus de l'hépatite A ou de l'hépatite B (NANB) (Feinstone et al. 1975). Des équipes ont alors décidé d'inoculer des chimpanzés avec le sérum de patients atteints de l'hépatite NANB. La nature virale de l'agent infectieux a pu alors être prouvée par la transmission et l'analyse des signes cliniques (Alter et al. 1978).

Il a néanmoins fallu attendre 1989 pour que des techniques de biologie moléculaire permettent d'isoler et d'identifier le virus de l'hépatite C (Choo et al. 1989). Du plasma de chimpanzé infecté a été soumis à une ultracentrifugation afin de concentrer les virus dans le culot. Les acides nucléiques (ADN et ARN) ont alors été extraits puis une banque d'ADNc a été construite dans le bactériophage lambda gt11. Cette dernière fut criblée avec des anticorps de patients atteints d'une hépatite NANB et un clone sur près d'un million fut retrouvé positif (Figure 1). Celui-ci servi de sonde et en s'hybridant sur un extrait d'ARN total de foie de chimpanzé infecté, il permit de caractériser le génome du virus de l'hépatite C : une molécule d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 10 kb.

## I-2- Epidémiologie

### I-2-1- Prévalence

A l'échelle mondiale, 130 à 150 millions d'individus sont porteurs chroniques du VHC. L'OMS estime que 3 à 4 millions de personnes sont contaminées chaque année (Source : OMS http://who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr/). Ces chiffres doivent néanmoins être pris avec précaution car le virus peut être asymptomatique et tout le monde n'a pas accès aux soins ou ne se fait pas diagnostiquer. Environ 700 000 personnes meurent chaque année de pathologies liées à l'hépatite C (Lozano et al. 2012). La prévalence du virus est variable en fonction des pays ou zones géographiques (Figure 2). L'Asie Centrale et de l'Est ainsi que l'Afrique du Nord et de l'Est ont une prévalence élevée (> 3.5%). L'Asie du Sud et du Sud-est, l'Afrique sub-



Figure 1 : Schéma de l'isolation et identification du virus de l'hépatite C (Houghton et al. 2009).



Figure 2 : Prévalence de l'infection au VHC à travers le monde.

saharienne, l'Amérique latine, les Caraïbes, l'Océanie et l'Europe centrale, orientale et occidentale ont une prévalence modérée (1,5% -3,5%). Enfin, l'Asie-Pacifique, l'Amérique latine tropicale et l'Amérique du Nord ont une faible prévalence (< 1,5%). Dans les années 1960 à 1980, une campagne de lutte contre la schistosomiase en Egypte aurait entrainé une prévalence de 22% (Frank et al. 2000). En Inde à la fin des années 1990, seuls 6 % des donneurs de sang ont été testés pour l'hépatite C (Kapoor et al. 2000).

#### I-2-2- Transmission

Le virus de l'hépatite C se transmet principalement par voie parentérale. Dans le monde occidental, avant la mise au point de tests de dépistage du virus dans les années 1990, les dons de sang, les transfusions sanguines et les transplantations furent les principales sources d'infection. Le risque passe ainsi de 0.45% de 1985 à 1991 (Donahue et al. 1992) à 0.000014% entre 2008 et 2010 (Pillonel et al. 2012). Cependant, dans les pays en développement, une mauvaise pratique médicale serait la principale cause de contamination. Des transmissions nosocomiales ont aussi été décrites par exemple lors d'utilisation de matériels chirurgicaux ou dentaires mal stérilisés.

Actuellement, une des causes majeures de transmission reste la toxicomanie par voie intraveineuse avec l'échange de seringues contaminées. Dans une moindre mesure, les piercings, tatouages et rapports sexuels participent aussi à la propagation du virus (Blackard et al. 2008). Enfin, une transmission verticale entre la mère et l'enfant est estimée à 5% des cas avec un pourcentage supérieur lors d'une co-infection VHC/VIH (Shepard, Finelli, and Alter 2005).

### I-3- Tropisme du VHC

Le VHC infecte principalement les hépatocytes mais ne s'y limite pas. Des séquences d'ARN du virus ont été détectées par PCR et hybridation *in situ* dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Zignego et al. 2007). La mise en évidence de brins d'ARN négatifs indique que le VHC est aussi capable d'infecter : des lymphocytes B, des cellules dendritiques et des cellules du système nerveux central (Blackard, Kemmer, and Sherman 2006). Ces cellules pourraient alors servir de réservoir et être à l'origine de certains mécanismes liés à la persistance virale et à la réinfection des foies greffés après transplantation.



#### Figure 3 : Dépistage du VHC.

D'après « Du dépistage au traitement », document édité et diffusé par l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (Inpes) 2007.

### **I-4- Diagnostic**

Le dépistage du VHC est souvent réalisé par des tests indirects puis par des tests directs si le diagnostic des premières analyses est positif (Figure 3).

A l'issu d'une prise de sang, un test ELISA (« *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ») est réalisé afin de détecter la présence éventuelle d'anticorps anti-VHC. Les tests de troisième génération sont spécifiques à 99%. Néanmoins, les résultats peuvent être négatifs en cas d'immunodépression. Dans ce cas, c'est le virus qui sera recherché. De plus, le dosage des enzymes d'inflammation du foie ( ALanine AminoTransferase : ALAT) peut aussi être effectué mais, comme dans le cas d'un test ELISA positif, les résultats ne permettent pas de savoir si le virus est toujours présent chez le patient. D'autres diagnostics indirects puis directs seront alors utilisés.

La présence du virus chez un patient sera détectée par des techniques de biologie moléculaire informant sur la présence de l'ARN viral. Ainsi, des RT-pPCR (« *Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction* ») souvent automatisées sont effectuées. Si le virus est présent chez un patient, la détermination du génotype est nécessaire pour adapter le traitement et sa durée. Pour ce faire, un typage génotypique mettant en évidence des polymorphismes sur le génome viral complet ou sur une région du génome sera réalisé. Le fragment correspondant à la séquence de la NS5B permet de former des arbres phylogénétiques similaires à ceux basés sur le génome complet (Hraber et al. 2006). L'analyse de cette région est donc une approche couramment utilisée.

## **I-5-** Pathologie

Lorsqu'une infection aiguë est déclenchée par le VHC, seulement 20 à 30% des patients présentent des signes cliniques ; ils sont peu spécifiques tels que de la fièvre, jaunisse, fatigue, nausée, etc. Néanmoins, dès la deuxième semaine, l'enzyme Alanine aminotransferase (ALAT) révélant des dommages hépatiques peut atteindre un taux dix fois supérieur à la normale. L'ARN viral peut être détecté dans le sang une ou deux semaines après contamination (Blackard et al. 2008). Près de 25% des patients élimineront spontanément le virus dans les trois mois post-infection. La guérison est confirmée par l'absence de détection du virus dans le sang audelà de 6 mois après l'infection aiguë et par la présence d'anticorps anti-VHC.



Figure 4 : Histoire naturelle suivant l'infection par le VHC (adapté de Gupta et al. 2014).

Dans 70 à 80% des cas, la présence d'ARN viral dans le sang durant plus de six mois transforme l'hépatite aiguë en hépatite chronique. Cette dernière peut passer inaperçue pendant 20 à 40 ans. Seul le dépistage du virus permet d'établir le diagnostic, même si dans la plupart des cas, le niveau d'ALAT reste élevé. Des lésions hépatiques dues à l'infection sont observables par biopsie. A la suite des potentielles stéatoses et fibroses, 20% des cas développeront chaque année une cirrhose et 2% un hepatocarcinome (Figure 4).

Plusieurs facteurs pourraient influencer l'évolution de l'hépatite chronique. Par exemple les patients ayant une faible réponse immune des lymphocytes T CD4+ ont deux fois plus de risques de développer une cirrhose (Sánchez-Quijano et al. 1995). La consommation d'alcool, le tabac, le génotype du virus, les co-infections virales VHB et/ou VIH ou encore l'âge du patient vont aussi influencer l'évolution de l'hépatite chronique (Moradpour and Müllhaupt 2015).

### I-6- Réponse immunitaire contre le VHC

#### I-6-1- La réponse innée

La réponse immune innée représente la première ligne de défense contre les infections virales. Les interférons (IFN) sont les cytokines centrales responsables de l'induction, l'activation et la régulation d'un état antiviral des cellules et de composants de l'immunité innée comme les cellules Natural Killer (NK).

Le VHC est capable d'induire ces réponses dans les hépatocytes (principales cellules de réplication du virus) mais aussi dans les cellules dendritiques (DC) et les macrophages. Les interférons de type I et III vont pouvoir activer des gènes antiviraux stimulés par les IFN (ISG : *« IFN-Stimulated* genes ») via la voie de signalisation JAK/STAT. Plus de 300 ISG sont alors régulés. La plupart ont pu être identifiés par différentes approches de screening comme, par exemple, l'utilisation de surexpressions (Schoggins et al. 2011) ou bien d'ARN interférence (Zhao et al. 2012). Suite à l'infection par le VHC, les IFN de type II sont induits par les cellules NK et par des cellules de la réponse adaptative.

#### I-6-1-1- Le déclanchement de l'immunité innée

Dans les cellules hôtes, la réponse immune contre les pathogènes s'induit principalement par les PRR (« Pattern Recognition Receptor ») qui reconnaissent des PAMP (« Pathogen-

associated molecular pattern »). Les PRR incluent les récepteurs de type TLR (« Toll\_like Receptor »), RLR (« RIG-I (Retinoic acid-Inductible Gene 1)-Like Receptor »), NLR (« Nod-like Receptor ») ainsi que les CLR (« C-type lectin receptor »).

#### Les TLR

Les TLR3, TLR7 et TLR9 reconnaissent les acides nucléiques viraux alors que les TLR2 et TLR4 reconnaissent les protéines virales. Les TLR3 et TLR7 sont capables de se lier à l'ARN viral au niveau des endosomes. L'activation de la signalisation du TLR3 est dépendante de l'acidification de cette vésicule (Funami et al. 2004). La transduction du signal se fait par la protéine TRIF (« *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-* $\beta$  ») qui active l'IRF3 (« *Interferon Regulatory Factor* ») et NF-kB, induisant la production d'IFN de type I, de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines. Le VHC activerait la voie des TLR3 tardivement dans l'infection (3-4 jours), indiquant que les génomes entrants ou les premiers produits de réplication ne présentent pas de ligands au TLR3 (Kui Li et al. 2012). Ainsi, ces ligands seraient issus des intermédiaires de réplication double brins accumulés ou retrouvés dans le milieu extracellulaire (cellule mourante) et présentés par les récepteurs éboueurs (scavenger) sur les cellules non infectées (Dansako et al. 2013).

Les TLR7 sont principalement exprimés sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et reconnaissent les PAMP du VHC lors de contact avec une cellule infectée et délivrance de l'ARN simple brin viral par les exosomes (Dreux et al. 2012). Les cellules pDC ainsi activées induisent une production d'IFN de type-I 100 fois plus importante que dans les autres types cellulaires sanguins (Liu 2005).

Les TLR2 sont exprimés à la surface des cellules et sont impliqués dans l'induction de TNF alpha par les cellules hépatocytaires.

#### Les RLR

RIG-I et MDA5 partagent les mêmes adaptateurs de signalement MAVS (*« Mitochondrial antiviral signaling protein »*) mais diffèrent dans la reconnaissance des PAMP. MDA5 détecte de longs ARN double brins comme les intermédiaires de réplication alors que RIG-I reconnait les groupes triphosphates en 5' (5'ppp), les structures en épingle des ARN simple brin (Kell and Gale 2015) et la région génomique poly-U/UC.

RIG-I fut le premier PRR découvert dans les hépatocytes comme reconnaissant le VHC. Néanmoins, il était difficile de confirmer son implication dans la production des IFN puisque la sérine-protéase NS3-4A codée par le VHC coupe les MAVS et donc la voie d'activation. Ainsi des cellules exprimant un mutant de MAVS résistant au clivage permirent de montrer que MDA5 aurait un rôle prédominant dans la réponse interféron comparé à RIG-I (Xu and Zhong 2016).

#### Autres senseurs de la reconnaissance du virus

La protéine kinase R (PKR) est une protéine antivirale sérine / thréonine kinase qui régule la synthèse protéique, l'apoptose et la transduction du signal. C'est aussi un PRR qui détecte le VHC et active l'immunité innée en phosphorylant le facteur d'initiation eucaryotique 2 (eIF2). Ce dernier bloque alors la traduction des ARNm cellulaires. La PKR liée à l'ARN du VHC induit aussi la production d'ISG et de l'IFN-B via les MAVS, du TNF3, des IRF et NF-kB.

Les NLR incluent les NOD1 et 2 (« *Nucleotide oligomerization domain* ») et la protéine NLRP3. Ces récepteurs sont activés par les PAMP de virus ARN puis permettent l'activation de l'inflammasome (Latz, Xiao, and Stutz 2013). NLRP3 permet la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1B dans les macrophages lors de l'infection au VHC (Negash et al. 2013).

#### I-6-1-2- La réponse innée médiée par l'interféron

Après l'implication des senseurs, des molécules adaptatrices vont être utilisées afin de permettre l'activation de kinases qui phosphoryleront des molécules de signalisation ; ces dernières vont ainsi promouvoir la transcription de gènes antiviraux.

Par exemple, la reconnaissance des ARN viraux par les RLR entraine l'activation d'une kinase médiée par les MAVS qui va phosphoryler les IRF 3 et 7 puis entrainer leur translocation dans le noyau. L'effet résultant de cette voie de signalisation est l'induction transcriptionnelle des interférons de type I et III ainsi qu'une série d'ISG.

Les IFN de type I sécrétés par une cellule infectée agissent sur les cellules voisines. Ils se lient à leurs récepteurs et entrainent l'activation de JAKs qui résulte en une phosphorylation du transducteur de signal et activateur de transcription 2 (STAT2) et STAT1. Ces derniers migrent dans le noyau en s'associant à l'IRF9 et induisent aussi une production d'ISG.

Parmi tous les ISG qui ont été identifiés, seuls quelques-uns sont relativement bien caractérisés. Par exemple, la voie de signalisation des IFN induit la transcription du gène OAS (« 2',5'oligoadenylatesynthetase ») ; cette protéine s'active par sa liaison à l'ARN double brin viral. Le complexe ainsi formé lie et active à son tour la RNaseL qui induit le clivage de l'ARN viral



**Figure 5 : Exemples d'évasion du système immunitaire innée par les protéines du VHC** (Yang and Zhu 2015).

La protéase NS3 / 4A du HCV clive les protéines adaptatrices MAVS et TRIF, contribuant au blocage de la signalisation en aval de PKR, RIG-I et TLR3, et la prévention de la production d'IFN. Les protéines E2 et NS5A du VHC suppriment la fonction de PKR par liaison directe à cette protéine Kinase. IFN- $\beta$  et IFN- $\lambda$  se lient à leurs récepteurs distincts et induisent la formation du facteur 3 génétique stimulé par IFN (ISGF3), comprenant STAT1 phosphorylé, STAT2 Et IRF9 via la voie JAK / STAT. Le noyau du VHC et d'autres protéines virales inhibent l'activation de la signalisation STAT et donc répriment la production des ISG. La fonction des protéines spécifique de l'ISG est également supprimée par les protéines du VHC. De plus, le génotype IFNL3 défavorable (T / T ou C / T) conduit à une moindre expression de IFN- $\lambda$ , qui atténue l'effet antiviral de l'IFN- $\lambda$  sur l'infection par le VHC. MT: Mitochondria; ER: Endoplasmic reticulum; ES: Endosome; PAMP: Pathogen-associated molecular pattern; IRES: Internal ribosomal entry site; TLR: Toll-like receptor; IFN: Interferon; MAVS: Mitochondrial antiviral signaling; ISGs: IFN-stimulated genes; TRIF: TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ .

et induit l'apoptose de la cellule infectée (Silverman 2007). La Vipérine interagit avec les protéines Core et NS5A du VHC. Elle cause une altération de la composition lipidique du membranous web qui entraine l'inhibition de la réplication du VHC (Helbig et al. 2011). Aussi, certains membres de la famille IFITM (« IFN induced transmembrane proteins ») peuvent intervenir dans les premières étapes de l'infection. Ces molécules ont été identifiées comme des effecteurs de la réponse à l'IFN I. IFITM est retrouvé dans les jonctions serrées des hépatocytes infectés par le VHC. Il interagit avec les co-récepteurs CD81 et occludine, empêchant ainsi l'entrée du virus (Wilkins et al. 2013). Les IFITM2 et IFITM3 se retrouveraient au niveau des endosomes précoces et tardifs ainsi que dans les lysosomes. En interagissant entre eux, ils piégeraient le VHC entrant pour l'entrainer vers les lysosomes et le dégrader (Narayana et al. 2015). IFITM3 pourrait aussi altérer la réplication en inhibant la traduction de la polyprotéine virale ainsi que des protéines hôtes (Yao et al. 2011). Enfin, l'étape de sortie du virus peut aussi être affectée par la téthérine (Dafa-Berger et al. 2012).

#### I-6-1-3- Echappement du VHC à la réponse innée

Environ 80% des patients infectés développent une hépatite chronique puisqu'ils ne parviennent pas à supprimer le virus qui échappe à la réponse innée (Figure 5). Ainsi, une des principales stratégies de persistance du virus consiste dans le clivage de MAVS par la protéase NS3/4A. MAVS étant une protéine adaptatrice essentielle dans la signalisation des RLR (RIG-I), majeur voie d'activation de l'IFN dans les hépatocytes, elle est indispensable à la réponse innée (Xu and Zhong 2016).

La protéine TRIF, adaptateur de la voie de signalisation de TLR3, est aussi clivée par la protéase virale NS3/4A (Li et al. 2005). Comme pour le cas de RIG-I, ce clivage inhibe la transduction du signal et donc le déclenchement de réponses immunes innées.

En plus de la protéase virale, les protéines E1/E2 auraient aussi la capacité de diminuer l'expression de RIG-I et TLR3 in vitro (Eksioglu et al. 2011).

La liaison de l'ARN double brin viral à la PKR peut induire la production de certains ISG et IFN- $\beta$  via les MAVS. Cette activation entraine un blocage de la traduction des ARN cellulaires dépendant du facteur eIF2a. Cependant, les effets de cette action n'affectent pas directement la traduction des protéines virales puisqu'elle est dépendante de l'IRES. De plus, inhiber la traduction des IFN et ISG est favorable à la réplication du virus. En revanche, la production de facteurs cellulaires impliqués dans le cycle du virus et dans la croissance de la cellule hôte sera

aussi diminuée ; le virus tend alors à limiter cette action en inhibant la PKR via les protéines NS5A et E2 (Taylor et al. 1999; Noguchi et al. 2001).

Enfin, la protéine Core du virus pourrait aussi être impliquée comme régulateur négatif de la réponse interféron en bloquant la voie de signalisation JAK/STAT (Horner and Gale 2009).

#### I-6-2- Réponse adaptative

Contrairement à la réponse innée qui est induite dans les heures ou jours suivant l'infection, la réponse adaptative n'est pas détectable avant 6 à 8 semaines (Heim and Thimme 2014). Cette dernière se caractérise par : *i*) une réponse humorale qui implique les lymhocytes B et la production d'anticorps neutralisants (nAB) ou non neutralisants ; *ii*) une réponse immune cellulaire impliquant les lymphocytes T et plus particulièrement les CD4+ et CD8+.

#### I-6-2-1- La réponse humorale

Les nAB ont un rôle connu pour contrôler la virémie initiale et protéger contre une réinfection du virus. Néanmoins le rôle de la réponse humorale dans la clairance du VHC reste flou et controversé. Les nAB ciblent des épitopes linéaires et conformationnels principalement localisés dans les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et plus particulièrement aux alentours de la région hyper-variable 1 de E2. Ces régions ont des fonctions importantes pour la liaison et l'entrée du virus, notamment en se liant aux récepteurs cellulaires CD81 et SRB1 (Sabo et al. 2011). Des premières études ont montré que les anticorps ciblant ces régions sont neutralisants *in vitro* et *in vivo* (Shimizu et al. 1996; Farci et al. 1996). Pourtant, d'autres études sur les chimpanzés démontrent que la réponse humorale n'était pas nécessairement associée à la clairance virale (Major et al. 1999). Paradoxalement, des résultats obtenus sur un groupe homogène de jeunes femmes infectées par un même inoculum suggèrent le développement de nAB dans les phases précoces de l'infection pour la majorité des patientes ayant éliminé le virus (Pestka et al. 2007). Néanmoins, il est aussi important de noter que l'élimination du virus peut se faire en absence d'anticorps neutralisants puisque des individus atteints d'hypoglobulinémie peuvent éradiquer le VHC.

#### I-6-2-2- Les lymphocytes T

Contrairement à la réponse humorale, il y a un consensus général quant à l'implication des réponses cellulaires CD4+ et CD8+. Ces dernières ciblent de nombreux épitopes des protéines

structurales et restent détectables après la résolution de l'infection. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (TCD8) détruisent les cellules infectées ainsi que des cellules cibles qui présenteraient à leur surface des antigènes spécifiques via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Les lymphocytes T auxiliaires CD4+ (TCD4) reconnaissent via les TCR (« *T cell receptor* ») des peptides présentés par les CMH de classe II. Ils sont aussi nommés Lymphocytes T helpers et sont des intermédiaires de la réponse immunitaire. Ils prolifèrent pour activer d'autres types cellulaires qui agiront de manière plus directe sur la réponse immune. Ils ont aussi la fonction d'activer les autres lymphocytes en sécrétant des cytokines.

Les TCD4 qui reconnaissent des antigènes du VHC présentés par le CMH II ont un rôle important dans le contrôle viral. *i*) Plusieurs études montrent que la clairance virale est liée à une forte réponse dirigée et soutenue par les TCD4 (Neumann-Haefelin and Thimme 2013). *ii*) Certains allèles du HLA de classe II (au moins cinq) sont identifiés et associés à l'éradication virale. *iii*) Des expériences menées sur des chimpanzés déplétés en TCD4 montrent l'implication de ces cellules sur le contrôle de la virémie. En effet, ces chimpanzés contrôlaient initialement l'infection via leurs CD8+ mais dès que des mutations se présentent sur les épitopes viraux, ils ne sont plus reconnus par les CD8. Cela entraine une augmentation de la charge virale et suggère une implication des TCD4 en tant que lymphocytes « helper » pour empêcher l'évasion virale de la réponse CD8+ (Grakoui et al. 2003).

Les TCD8 sont les effecteurs majeurs de la réponse adaptative contre le VHC. Six à huit semaines après l'infection, ces lymphocytes émergent alors que le titre viral diminue. De plus, des chimpanzés déplétés en TCD8 gardent un haut titre viral sur une période prolongée jusqu'à ce que les TCD8 soient restaurés dans l'animal (Shoukry et al. 2003). Certains allèles du CMH de classe I comme B27 ou B57 ont aussi été montrés comme impliqués dans la résolution spontanée d'une infection aiguë (Schmidt, Thimme, and Neumann-Haefelin 2011).

Les TCD8 médient leurs effets antiviraux par différents mécanismes. Ils peuvent agir de manière cytotoxique en tuant la cellule cible présentant l'antigène viral par le CMH I ou bien par des mécanismes non cytotoxiques comme la sécrétion de cytokines antivirales (Interferon gamma et TNF $\alpha$  (« Tumor Necrosis Factor-alpha »)).

#### I-6-2-3- Echappement du VHC à la réponse immunitaire adaptative

Plusieurs mécanismes d'échappement du VHC aux anticorps neutralisants et à la réponse des cellules T ont étés proposés. La mutation constante du génome dûe à l'absence de système de relecture de la polymérase virale génère de nouveaux virus chez le patient infecté (quasiespèce). Cela crée donc de nouveaux épitopes pouvant échapper à la reconnaissance du système immunitaire. L'interaction des glycoprotéines du VHC avec les lipoprotéines de hautes densités (HDL) et le Scavenger receptor B1 ainsi que la glycosylation de E2 protègent les particules des anticorps neutralisants (Falkowska et al. 2007). Il a aussi été suggéré que le VHC s'évade des nAB par un transfert direct de cellule à cellule (Brimacombe et al. 2011). L'échec de la réponse T peut être dû à un disfonctionnement des lymphocytes T spécifiques du VHC qui perdent alors leurs fonctions. Cette caractéristique est dûe à la forte expression du récepteur programmé de mort cellulaire 1 (PD-1 : « receptor programmed cell death 1 ») (Kasprowicz et al. 2008) ; la production de cytokines et la prolifération cellulaire des TCD8 sont alors diminuées. De plus, la protéine Core inhiberait aussi une des voies activatrices des lymphocytes T (Yao et al. 2004). Enfin, la présence des lymphocytes T régulateurs (Treg) pourrait aussi intervenir dans la chronicité de l'infection (Alatrakchi and Koziel 2009). En effet, ces derniers également induits via des peptides du VHC (Shuo Li et al. 2009), préviennent l'activation des lymphocytes autoimmuns en réprimant l'activité des cellules immunitaires.

#### I-6-3- Traitements antiviraux non spécifiques

Il n'existe actuellement aucun vaccin contre le VHC. Le traitement encore standard contre le virus est une combinaison d'interféron alpha pégylé et de ribavirine. Le but étant l'éradication du virus, appelé Réponse Virologique Soutenue (RVS), 24 semaines après le traitement. En fonction du génotype viral, la RVS peut être atteinte dans 80% des cas. Ces taux sont vérifiés pour les génotypes 2 et 3 tandis que les succès ne dépassent pas 40 à 50% des cas pour le génotype 1 (Fried et al. 2002).

#### I-6-3-1- L'interféron

Les interférons (IFN) sont naturellement produits par le corps pour stimuler le système immunitaire. Lors d'une infection virale, les IFN sont secrétés par la cellule infectée et les cellules voisines. Par une cascade de signalisation cellulaire, les IFN induisent la production de plusieurs protéines qui vont lutter contre le virus en : diminuant la traduction des protéines (eIF2

phosphorylé), en détruisant l'ARN viral dans les cellules (RNase L), en favorisant l'apoptose (p53) ou encore en activant le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et en augmentant la présentation de peptides étrangers aux Lymphocytes T.

Dans le cadre du traitement à l'hépatite C, de l'interféron alpha pégylé est injecté sous la peau. Ce dernier est, la plupart du temps utilisé en association avec de la ribavirine.

#### I-6-3-2- La ribavirine

La ribavirine (RBV) est un analogue nucléosidique de la guanosine à large spectre antiviral mais principalement utilisé pour traiter l'hépatite C. Bien que plusieurs hypothèses soient proposées, son mécanisme d'action reste encore mal connu.

La RBV convertie en triphosphate pourrait inhiber la polymérase virale en entrant en compétition avec la guanosine triphosphate (GTP) nécessaire à la réplication virale (Cannon et al. 2009). Elle diminuerait la quantité de GTP disponible dans la cellule. Cette molécule pourrait aussi augmenter la fréquence de mutation létale par son incorporation dans les génomes viraux répliqués. Enfin, il a été prouvé qu'elle réduit, *in vitro*, la prolifération lymphocytaire induite par les mitogènes. Son effet immunomodulateur provient du fait qu'elle régule la réponse immune en diminuant la réponse Th2 au profit de la réponse Th1, ceci augmentant la production d'INF $\gamma$ .

Ces traitements ont des effets secondaires très lourds comme des nausées, myalgies, symptômes grippaux, maux de tête, anorexie et surtout dépression. De plus, cette bithérapie a une efficacité différente en fonction des génotypes à traiter (O'Brien n.d.; Wyles and Gutierrez 2014; Fung et al. 2008). Il y aurait :

- 74% d'efficacité pour le génotype 2,
- 69% d'efficacité pour le génotype 3,
- 60% d'efficacité pour le génotype 4,
- 50 à 80% d'efficacité pour les génotypes 5 et 6,
- 45% d'efficacité pour le génotype 1.

Récemment, de nouveaux antiviraux à action directe (AAD) ont été mis sur le marché avec une efficacité supérieure à 90% après 12 semaines de traitement. Ces molécules seront détaillées ultérieurement dans la partie « inhibiteur des protéines virales ».



Figure 6 : Distribution géographique mondiale des différents génotypes (Messina et al. 2015).

## II- Le Virus de l'Hépatite C

## **II-1-** Classification

Ce virus enveloppé d'environ 60 nm de diamètre comporte une capside icosaédrique. Il a été classé dans la famille des Flaviviridae qui se compose de trois genres :

- les flavivirus avec, par exemple, les virus de la Dengue, Fièvre Jaune, Nil Occidental, Zika

- les pestivirus comprenant, entre autre, les virus de la Diarrhée Virale Bovine et de la Peste Porcine

les hepacivirus, genre spécialement créé pour le virus de l'Hépatite C mais comprenant aussi
le GB virus B ainsi que des hepacivirus canins et équins.

## II-2- Diversité génétique

#### II-2-1- Génotypes

Des approches phylogénétiques ont permis d'évaluer l'émergence et la diversification des génomes viraux au cours du temps. Par définition, deux souches appartiennent à un même génotype lorsqu'elles présentent plus de 70% de similarité sur leurs génomes complets. Sept génotypes ont ainsi pu être identifiés et au moins 67 sous-types sont retrouvés. S'il y a plus de 85% d'homologie, les souches sont d'un même sous-type et quand le pourcentage atteint 90%, on parle de quasi-espèce. C'est le cas chez tous les patients infectés. La création d'un nouveau génotype ou sous type requiert plusieurs caractéristiques : au moins trois isolats épidémiologiquement indépendants doivent être identifiés, plusieurs séquences de la région codante doivent être disponibles et phylogénétiquement distinctes des séquences connues ainsi qu'exclues d'une recombinaison inter-génotypique ou inter-sous-typique (Smith et al. 2014). Les premiers génotypes auraient émergé il y a 500 à 3000 ans et les sous-types auraient divergé il y a 300 ans (Smith et al. 1997).

Les génotypes du VHC diffèrent dans leur répartition géographique par rapport à l'endémicité et à la voie de transmission de la maladie (Figure 6). Les génotypes 1, 2 et 3 sont présents dans le monde entier bien que leur prévalence varie d'une région à l'autre. En Europe, en Amérique du Nord et au Japon, les génotypes 1a, 1b, 2a et 2b sont les plus courants. Le génotype 4 se trouve principalement en Egypte et au Moyen-Orient et les génotypes 5 et 6 en Afrique du Sud et Asie du Sud-est. Le 7<sup>ème</sup> génotype est retrouvé principalement au Vietnam et en Chine (Zein



#### Figure 7 : Représentation des recombinants du VHC caractérisés (Galli and Bukh 2014).

Les structures génomiques de tous les recombinants du virus de l'hépatite C (VHC) caractérisés jusqu'à présent in vivo sont représentés schématiquement. Les points de recombinaison sont illustrés en référence à l'ADN génomique du VHC. La structure du génome représentée en haut. Les lieux de rupture et les génotypes impliqués dans chaque forme recombinante ont été obtenus à partir de leur publication respective. La localisation des points de recombinaison est approximative et n'est donnée qu'à titre illustratif. Le codage des génotypes et sous-types est montré en bas. La séquence complète du recombinant 4d / 4a n'a pas été rapportée.

2000) et a aussi pu être isolé au Canada chez un patient immigrant du Congo (Messina et al. 2015).

#### II-2-2- Recombinants

La recombinaison génétique est un mécanisme important pour l'évolution des virus ARN. Elle crée de la variation génétique, de nouvelles souches virales et peut entrainer de nouvelles propriétés pour le virus (Worobey and Holmes 1999). Les recombinants sont bien connus chez les virus segmentés comme l'influenza virus mais sont aussi retrouvés chez des virus ARN positifs non segmentés comme les picornavirus ou les alphavirus. De manière intéressante, des recombinants ont été rapportés chez d'autres membres de la famille des Flaviviridae comme le virus de la dengue (Tolou et al. 2001) ou de la diarrhée bovine (Ridpath and Neill 2000). Pour ce qui est du VHC, ce n'est qu'en 2002 qu'un virus recombinant a été formellement identifié dans un sérum de patient infecté (Kalinina et al. 2002). Par la suite, des recombinaisons naturelles inter-génotypiques, intra-génotypiques et intra-sous-typiques ont été identifiées (pour revue : Galli and Bukh 2014; Echeverría et al. 2015). Des exemples sont illustrés dans la Figure 7. Des recombinaisons ont aussi été rapportées chez un chimpanzé simultanément infecté par des virus du génotype 1a, 1b, 2a et 3a (Gao et al. 2007).

Ces évènements se doivent d'être considérés puisqu'ils peuvent avoir une influence notable sur le traitement du patient (Morel et al. 2011) ; pourtant, n'étant pas analysés en routine chez les patients, ils sont probablement sous-estimés.

D'un point de vue moléculaire, deux mécanismes pourraient être à l'origine des recombinants (Figure 8). Le premier, de type réplicatif, est le plus proposé dans le cas du VHC. Dans ce modèle, la polymérase change de matrice lors de la synthèse du brin naissant, produisant un génome chimérique contenant des fragments des deux matrices parentales. Le deuxième, de type non réplicatif, implique des fragments génétiques de différentes origines pouvant être ligués pour générer des génomes hybrides.

#### II-2-2-1- Mécanisme réplicatif

Ce modèle expliquerait la recombinaison de plusieurs virus ARN (rétrovirus, tombusvirus, bromovirus, BVDV et poliovirus). Des séquences homologues et des structures secondaires flanquant les points de recombinaison pour chacun de ces virus ont été identifiées permettant ainsi de proposer plusieurs caractéristiques impliquées dans ces évènements. Ainsi, la molécule naissante doit être libre de la matrice donneuse afin de pouvoir interagir avec la matrice





Un modèle basé sur des données expérimentales obtenues à partir du VHC et d'autres virus à ARN est exemplifié dans le cas d'une double infection par deux souches de VHC. Après relargage de l'ARN, les deux génomes sont localisés dans le cytoplasme. Dans la recombinaison non-réplicatif (A-D), différents mécanismes tels que les endoribonucléases cellulaires, ribozymes, ou les dommages mécaniques peuvent produire une population d'ARN génomiques coupés de façon aléatoire (A), portant des terminaison 3'-P et 5'-OH (B ). Différents fragments peuvent être assemblés au hasard par auto-ligature ou à l'aide de ligases cellulaires (C), résultant en un ARN génomique recombinant (D). Les génomes recombinants parentaux et fonctionnels sont ensuite traduits et ciblées vers le complexe de réplication pour la réplication. Dans la recombinaison réplicative (E-G), lors de la synthèse de l'ARN, la souche naissante peut être issue d'un changement de brin entre les génomes donneurs (E). Les facteurs qui déstabilisent l'appariement entre l'ARN et la polymérase ou réduisent la procéssivité de l'enzyme favoriseront la commutation des brins. En fonction de la similitude de séquence entre le donneur et l'accepteur et du lieu de recombinaison, cette dernière peut être homologue ou non homologue (F). Une fois que la polymérase a basculé vers le modèle d'accepteur, la synthèse d'ARN est reprise et un ARN génomique du recombinant est produit (G).

acceptrice. Certains facteurs favorisant la dissociation, comme des régions AU, promouvront le changement de brin par la polymérase. De plus, l'activité d'élongation de la polymérase devrait être réduite afin de lui permettre un détachement puis un changement de matrice. Certains facteurs comme des structures secondaires stables, une quantité limitante de NTP ou des pauses dans la synthèse pourraient alors être impliqués. Enfin, une interaction serait nécessaire entre les brins parents pour faciliter le saut de brin de la polymérase virale. Cette interaction intermoléculaire peut avoir lieu entre des structures secondaires de l'ARN à différents endroit des génomes, conduisant à une recombinaison non homologue ou bien par une séquence de dimérisation située au même niveau des deux génomes, induisant souvent une recombinaison homologue.

Le modèle de recombinaison réplicatif a été suggéré dans le cas du VHC lors de différentes études. Par exemple, la souche identifiée en 2002 comme recombinante sur des sérums de patients russes est inter-génotypique entre un sous type 2k et 1b (Kalinina et al. 2002). Le séquençage du génome complet a été réalisé et a permit de localiser le point de recombinaison au niveau du gène NS2. Des études supplémentaires de cette région ont permis l'identification d'une séquence conservée entre tous les génotypes ainsi que des structures ARN secondaires présentes uniquement sur les matrices parentales (Kalinina, Norder, and Magnius 2004); deux structures stables en épingles flanquaient le point de recombinaison. Ces données suggèrent un changement de matrice par la polymérase virale lors de la synthèse d'ARN. De même, une étude sur le recombinant entre les génotypes 2i et 6p identifié au Vietnam suggère que ce mécanisme réplicatif a été utilisé lors la création de cette souche (Noppornpanth et al. 2006). Effectivement, de fortes homologies de séquences ainsi qu'une structure en épingle stable sont retrouvées sur les brins matrices des souches parentales.

#### II-2-2-2- Mécanisme non réplicatif

Ce modèle impliquant des jonctions entre molécules clivées est principalement caractérisé dans le cas d'ADN. Peu d'études sont réalisées à ce sujet sur les virus ARN ; ce type de recombinaison n'a été démontré que chez le poliovirus (Gmyl et al. 1999) et le BVDV (Gallei et al. 2004). Pour le virus de l'hépatite C, une seule étude en culture cellulaire indique la possibilité de recombinaison homologue et non homologue sans mécanisme réplicatif (Scheel et al. 2013). Parmi cette étude, les auteurs co-transfectent dans des cellules Huh7 : *i*) l'ARN de la souche JFH1 délété du 5'UTR (JFH1 $\Delta$ 5'), ne pouvant, à priori, pas traduire ses protéines virales dont la polymérase ; *ii*) l'ARN de la souche J6CF ne répliquant pas *in vitro* ; ou bien *ii'*) l'ARN de J6 délété de l'extrémité 3' et de la séquence codante pour la NS5B (J6 $\Delta$ 3'). Après quatre jours de culture, l'infection émerge et se propage pendant les 10 à 30 jours suivant. Des recombinants sont effectivement retrouvés sur les génomes séquencés, principalement issus des co-transfections JFH1 $\Delta$ 5' / J6CF ; les auteurs concluent donc à un mécanisme non réplicatif. Néanmoins, il n'est pas exclu que la polymérase virale NS5B soit produite à partir de l'ARN J6CF, ce dernier étant infectieux chez le chimpanzé (Gottwein et al. 2010) et seules quelques mutations suffisent à le rendre infectieux *in cellulo* (Yi-Ping Li et al. 2012). De même, l'ARN construit à partir de JFH1 pourrait avoir un faible niveau d'expression des protéines virales impliquant la production de NS5B. Dans le système utilisé, il suffirait d'une recombinaison viable entre les deux souches pour produire par la suite des virus réplicatifs exprimant la RdRp sur les 10 à 30 jours de culture. Ainsi, le modèle de recombinaison non réplicatif du VHC mériterait quelques études supplémentaires.

### II-3- La particule virale

Malgré les progrès réalisés dans la production de particules virales en culture cellulaire, la structure du virion reste peu caractérisée contrairement aux particules des autres flavivirus. Des études de filtration et de microscopie électronique indiquent que les particules du VHC : mesurent entre 40 et 80 nm de diamètre, sont pléiomorphes, manquent de symétrie ou de caractéristiques de surfaces évidentes, contiennent des régions denses aux électrons (Lindenbach and Rice 2013).

La densité des particules VHC retrouvées dans les formes circulantes varie de 1.30 à <1.06 g/ml (Bartenschlager et al. 2011). Pendant les premières phases de l'infection, les particules sont majoritairement trouvées dans les fractions de faible densité. Cela devient plus varié lors d'infections chroniques. Plusieurs études suggèrent que les densités élevées pourraient être dues à une interaction entre les particules virales et les immunoglobulines. Pourtant, les variations de densités sont les mêmes chez des patients immunodéprimés (André et al. 2005).

L'analyse du profil des particules virales confirme que leur teneur en lipides et cholestérol est similaire à celle des lipoprotéines du sérum. Bien que la nature exacte des interactions entre les virions et les lipoprotéines reste indéterminée (Merz et al. 2011), le virus circule sous différentes formes dans le sérum des personnes infectées et serait lié à des lipoprotéines de faible densité (LDL : *Low Density Lipoprotein*) ou de très faible densité (VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*).



Figure 9 : Structure de la particule virale du VHC.



## Figure 10 : Structure secondaire et tertiaire du 5'UTR (Honda et al. 1999).

La région comprenant l'IRES s'étend du domaine II au domaine IV. Le codon initiateur AUG est mis en évidence en noir.

Figure 11 : Représentation des différentes régions de l'extrémité 3' de l'ARN génomique (Yanagi et al. 1999).
Les particules virales sont constituées de trois structures (Kaito et al. 1994) (Figure 9):

- Une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 organisées en complexes hétérodimériques non covalents.

- Une capside protéique formée par la polymérisation de la protéine Core.

- Une molécule d'ARN simple brin constituant le génome viral.

# II-4- Le génome

L'ARN génomique du VHC est une molécule simple brin de 9600 bases et de polarité positive. Deux régions UTR (« *Untranslated* Region ») flanquent la phase ouverte de lecture (ORF). Le 5'UTR constitue les 341 premiers nucléotides chez la majorité des isolats. Les structures

ARN secondaires et tertiaires sont très conservées entre les différents génotypes et forment l'IRES du virus (Honda et al. 1999) (Figure 10). Ce dernier débute à une vingtaine de nucléotides de l'extrémité 5' et s'étend jusqu'à une trentaine de nucléotides en aval du codon AUG. L'IRES permet la traduction des protéines virales de manière indépendante de la coiffe. Les IRES sont classés en différents groupes suivant la complexité des facteurs recrutés. Ainsi, l'IRES du VHC appartient au groupe II puisqu'il permet de recruter la sous unité ribosomique 40S mais nécessite la présence de plusieurs facteurs d'initiation (eIF) tels qu'eIF2 et eIF3 pour initier activement la traduction.

Le 3'UTR ne possède pas de queue polyA mais est divisé en trois régions (Yanagi et al. 1999): Une région d'environ 30 nucléotides variables, une région polyU/UC et une région 3' terminale très conservée de 98 nucléotides formant trois tiges-boucles (Figure 11). L'extrémité 3' serait particulièrement importante pour l'initiation de la réplication de l'ARN génomique puisque la polymérase virale utilise sa matrice de 3' en 5'.

L'ORF code pour une polyprotéine d'environ 3020 aa qui va être maturée en dix protéines par des protéases cellulaires et virales (Figure 12). Ainsi, au niveau du réticulum endoplasmique (RE), les signals peptidases (SP) et signal peptide peptidases (SPP) vont cliver les trois protéines structurales (Core, E1, E2) ainsi que la protéine P7. Les protéases virales NS2/3 et NS3/4A libèrent les protéines non-structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. Finalement, un décalage dans le cadre de lecture entraîne la traduction d'une onzième protéine nommée, entre autre, ARFP (*« Alternative Reading Frame Protein »*).

# **II-5-** Les protéines

### II-5-1- La protéine Core

La protéine Core constitue la nucléocapside virale. Cette protéine de 191 acides aminés est la première traduite et la plus conservée du virus. Elle possède trois domaines, D1, D2 et D3 (Figure 13). En N-terminal, le domaine hydrophile D1 (aa 1-120) contient des acides aminés basiques impliqués dans l'oligomérisation de la protéine et dans sa liaison avec l'ARN génomique (Moradpour, Penin, and Rice 2007), permettant ainsi l'assemblage de la nucléocapside. D1 serait aussi impliqué dans des interactions avec des facteurs cellulaires (de Chassey et al. 2008) et pourrait contribuer aux altérations de la cellule hôte lors de l'infection. Enfin, ce domaine se replierait lors d'interactions avec le domaine D2, ce qui permettrait l'association avec les gouttelettes lipidiques (GL) (Boulant et al. 2006). Le domaine D2 hydrophobe (aa 121-177) pourrait aussi interagir avec les membranes et les GL ainsi qu'avoir un rôle dans la réplication du génome viral. Enfin, le troisième domaine D3 (aa178-191) est très hydrophobe et agirait comme une séquence signal pour diriger la protéine E1 vers le réticulum endoplasmique (RE) (Santolini, Migliaccio, and La Monica 1994). La protéine Core subit deux clivages par des peptidases cellulaires. Le premier permet de la séparer de la polyprotéine et aboutit à une forme immature ancrée dans la membrane du RE par le D3. Le second clivage entre D2 et D3 permet le relarguage de la protéine mature (Ray and Ray 2001). La protéine mature se dirige et s'accumule au niveau des gouttelettes lipidiques (lieu de stockage des lipides intracellulaires) et du RE via les deux hélices alpha amphipatiques du domaine D2 (Boulant et al. 2006).

La protéine Core est multifonctionnelle, elle est impliquée dans la régulation de l'apoptose, le métabolisme des lipides, la transcription ou encore la réponse immunitaire (McLauchlan 2000). Dans ses fonctions virales et structurales, elle est le principal constituant de la nucléocapside virale et permet notamment d'encapsider le génome. Pour cela, une interaction entre les protéines Core et un ARN structuré semble être indispensable (Kunkel et al. 2001). Cette protéine a d'ailleurs été montrée comme liant les séquences du génome 5'UTR, core, E1 et E2 ainsi que l'ARNt et l'ARNr 60S (Shimoike et al. 1999). Une étude récente a permis l'identification de motifs constitués principalement de guanines et adénosines au niveau de boucles ARN permettant la liaison avec la protéine Core (Stewart et al. 2016). Le 5'UTR



Figure 12 : Organisation du génome du VHC et de la topologie membranaire des protéines virales clivées (Bartenschlager et al. 2013).

a | ORF codant pour la polyprotéine et structures secondaires prédites des régions flanquantes 5 'et 3' non traduites. Le clivage de la polyprotéine par les signal peptidases cellulaires est indiqué par des ciseaux à la position correspondante. Le clivage médié par les signal peptide peptidases cellulaire est indiqué par un astérisque. Les flèches se réfèrent à un clivage par des protéases virales.

b | Topologies membranaires et principales fonctions des protéines du VHC.



#### Figure 13 : Carte fonctionnelle de la protéine Core (Gawlik and Gallay 2014).

La protéine de core est libérée de la polyprotéine par une peptidase signal (SP). Ensuite, le précurseur de 191 acides aminés est traité par une peptide signal peptidase (SPP), donnant une protéine mature d'environ 177 acides aminés qui se compose de deux domaines, D1 et D2. Le domaine D1 peut être subdivisé en trois Clusters: BD1 (domaine de base 1), BD2 (domaine de base 2) et BD3 (Domaine de base 3). Le domaine D2 contient deux hélices amphipathiques : Hélice I (HI) et Hélice II (HII), séparées par une boucle hydrophobe (HL).

constitue un IRES (« *Internal Ribosome Entry Site* ») et l'interaction entre la protéine Core et cette région pourrait avoir un rôle de régulation sur l'activité traductionnelle (Boni et al. 2005). La protéine Core est aussi impliquée dans des interactions avec d'autres protéines virales. Une interaction entre la Core et E1 permettrait le recrutement de la capside au niveau du RE pour favoriser le bourgeonnement (Nakai et al. 2006). Elle interviendrait dans le recrutement des protéines NS3 et NS5B au niveau des gouttelettes lipidiques en interagissant avec NS5A (Miyanari et al. 2007). L'association de ces différents partenaires parait indispensable à la production de particules virales infectieuses (Masaki et al. 2008).

La protéine Core joue aussi un rôle important dans diverses fonctions cellulaires. Elle serait notamment impliquée dans l'apoptose (Jahan et al. 2012), le métabolisme des lipides (Syed, Amako, and Siddiqui 2010), la réponse immunitaire ou encore dans la transcription et régulation du cycle cellulaire.

### II-5-2- Les protéines ARFP/F/Core+1

La région codante de la protéine Core pourrait également coder pour une autre protéine portant plusieurs noms : ARFP (*« Alternative Reading Frame Protein »*), F (*« Frameshift »*) ou Core+1 (indiquant le changement de cadre de lecture). Plusieurs hypothèses expliquant l'existence de cette protéine ont été énumérées : un changement du cadre de lecture +1 ; l'utilisation d'un codon AUG initiateur interne ; une initiation de la traduction à un codon dit « non-AUG » (Vassilaki and Mavromara 2009).

Des anticorps spécifiques de cette protéine ont été retrouvés chez des patients infectés, ce qui prouve son expression. Néanmoins, des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'il était possible d'introduire des codons stop dans la séquence en gardant la production de virus infectieux (McMullan et al. 2007). Le rôle biologique de cette protéine reste donc à déterminer.

### II-5-3- Les protéines E1 et E2

E1 (192 aa) et E2 (363 aa) sont les glycoprotéines d'enveloppe. Ces protéines constituent la surface du virion. Elles sont enchâssées dans la bicouche lipidique et rendent leurs chaines polypeptidiques accessibles afin de permettre l'adhésion du virus sur les récepteurs cellulaires CD81 et SRB1. Leur rôle est essentiel dans l'entrée du virus puisqu'elles induisent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.



#### Figure 14 : Représentation de la structure de P7 (Atoom et al. 2014).

(A) Représentation de la structure hexamérique de p7 en utilisant des contraintes RMN identifiées par les auteurs. (A) et (B) montrent H1: hélice 1 (hélice N terminale aa5-16) (bleue), H2: segment hélicoïdal moyen, aa 20-41 (jaune) et H3: la troisième hélice C-terminale aa 48 -58 (rose).

Leur maturation implique leur N-glycosylation et un repliement adéquat, ce qui nécessite l'intervention de protéines chaperonnes du RE. Une fois matures, E1 et E2 s'ancrent au niveau des membranes via les domaines transmembranaires situés à leurs extrémités C-terminales (Op De Beeck, Cocquerel, and Dubuisson 2001). Ces domaines sont néanmoins multifonctionnels puisqu'en plus de maintenir E1 et E2 au niveau du RE, ils sont impliqués dans la formation d'hétérodimères non covalents entre les deux protéines (Voisset and Dubuisson 2004). Plus récemment, il a été montré que les complexes E1/E2 étaient covalemment stabilisés par des ponts disulfures via les cystéines des ectodomaines (Vieyres et al. 2010). Ainsi, la maturation et le bon repliement des protéines d'enveloppe semblent faire appel à un mécanisme complexe et impliquer l'activité chaperonne du RE, la formation de ponts disulfures et la glycosylation. Tout cela est nécessaire à la production et à l'infectiosité des particules virales.

La protéine E2 est la mieux caractérisée ; elle contient trois régions hypervariables allant jusqu'à 100% de variabilité : HVR1 de 27 aa, situé en N-terminal ; HVR2 de 9 aa et HVR3 de 35 aa (Troesch et al. 2006). HVR1 est particulièrement impliquée dans l'interaction avec les récepteurs de la cellule hôte (Penin et al. 2001). La cristallisation du core de l'ectodomaine E2 a récemment été déterminé (Kong et al. 2013; Khan et al. 2014). Contrairement à ce qu'il était suggéré (Krey et al. 2010), la protéine ne présenterait pas trois domaines au même titre que les protéines de fusion de classe II mais plutôt une structure globulaire sans régions secondaires régulières. Les données structurales concernant l'ectodomaine de la protéine E1 sont plus limitées puisque seule la région Nter révélant des homodimères a été publiée (El Omari et al. 2014).

Ces récentes informations structurales sur les protéines E1 et E2 permettent une meilleure compréhension de leur rôle dans la réplication virale et remettent parfois en question les suggestions émises quant à leur implication dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

### II-5-4- La protéine P7

P7 est traduite après les protéines structurales et avant les non-structurales. C'est une petite protéine hydrophobe de 63 aa et 7 KDa possédant deux domaines transmembranaires reliés par une boucle cytoplasmique. Les extrémités N-terminales et C-terminales sont orientées vers la lumière du RE (Carrère-Kremer et al. 2002). La protéine peut s'oligomériser et former un canal ionique capable de transporter des cations à travers les membranes (Figure 14). Elle est ainsi assimilée aux viroporines.



**Figure 15 : Représentation schématique des domaines de la protéine NS3** (Mordapour and Penin 2013). La serine protease NS3 et les domaines NTPase / ARN hélicase sont représentés respectivement en bleu et en gris. Les résidus His 57, Asp 81 et Ser 139 du site actif de la sérine protéase sont mis en évidence en violet et l'hélice amphipathique N-terminale en vert. Un atome de Zn2 + coordonné par trois résidus de cystéine et une histidine stabilise la sérine protéase. NS4A est indiqué en orange. La flèche blanche indique le clivage par la protease NS2 alors que les flèches noires illustrent les clivages en cis (site NS3 / NS4A) et trans (NS4A / NS4B) par la protease NS3-4A.

P7 est dispensable pour la réplication de l'ARN viral *in vitro* alors qu'elle parait essentielle à l'assemblage des particules et à leur sortie *in vivo* (Steinmann et al. 2007). Elle aurait au moins deux fonctions identifiées :

 - en s'associant avec les glycoprotéines d'enveloppe et NS2, P7 participerait à la coordination de l'enveloppement des particules virales,

- en formant un canal dépendant du pH, p7 serait nécessaire à la maturation et à la sécrétion des virions (Wozniak et al. 2010).

## II-5-5- La protéine NS2

NS2 est une protéine membranaire de 23 kDa. Elle comprend un domaine transmembranaire en N-terminal (aa 1 à 93) composé de trois segments transmembranaires (Jirasko et al. 2010) qui permettraient la coordination entre les protéines structurales et non structurales dans l'assemblage des virus (Stapleford and Lindenbach 2011). Le domaine C-terminal cytosolique (aa 94 à 217) dimérise pour former une cystéine protéase constituée de deux sites actifs (Lorenz et al. 2006). Le domaine protéase serait aussi capable de s'associer aux membranes cellulaires (Lange et al. 2014) ; cette interaction serait requise pour une liaison stable de la protéine avec les membranes, pour sa stabilité et un processing de la polyprotéine efficace. Le seul substrat connu de cette enzyme est le site de clivage entre NS2 et NS3. Alors que NS2 code pour les résidus catalytiques de la protéase, la forme active nécessite une interaction avec la région N-terminal de NS3 avant sa séparation de la polyprotéine (Schregel et al. 2009).

La protéine NS2 aurait une courte durée de vie. Sa dégradation par le protéasome serait dépendante de sa phosphorylation par la protéine kinase CK2 (Franck et al. 2005). NS2 interagirait aussi avec une protéine cellulaire spécifique du foie CIDE-B et inhiberait ainsi l'apoptose induite par cette dernière (Erdtmann et al. 2003).

### II-5-6- La protéine NS3

NS3 est une protéine de 70 kDa qui comporte deux domaines majeurs (Figure 15) ayant des activités distinctes :

### Le domaine protéase

Le domaine N-terminal (aa 1 à 180) a une activité sérine protéase qui appartient à la superfamille des trypsines/chymotrypsines. L'enzyme est constituée de deux feuillets Beta

flanqués par deux courtes hélices alpha. L'activité protéase requiert une triade catalytique (Ser-139, His-57, Asp-81) à l'interface des feuillets Beta. Le cofacteur NS4A permet le repliement adéquat de la protéine et contribue au bon positionnement du site actif et du substrat (Kim et al. 1996). La structure est stabilisée par la présence d'ions Zn<sup>2+</sup>. Elle ne possède pas de domaine transmembranaire mais se retrouve associée au RE via son interaction avec un feuillet beta de NS4A. Une fois active, la protéase clive en *cis* NS3/NS4A puis en *trans* les jonctions NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B.

#### Le domaine hélicase

Le domaine C-terminal (aa 181 à 631) possède une activité hélicase / NTPase et classe cette enzyme dans la superfamille 2 des hélicases ARN à motif DExH/D.

Cette région de NS3 est composée de trois sous-domaines. Elle se déplace de 3' en 5' le long de l'ARN ou de l'ADN simple brin. L'énergie résultant de l'hydrolyse des NTP permet le mouvement de l'enzyme pour séparer, par exemple, les duplex d'ARN issus de la réplication du génome ou les structures secondaires. Pour se faire, un dimère serait requis (Mackintosh et al. 2006) ainsi que la liaison avec le domaine protéase de la NS3 (Kohlway et al. 2014). Le rôle précis de l'hélicase NS3 reste à élucider mais il est nécessaire pour la réplication virale puisque des mutations empêchant sa capacité à hydrolyser l'ATP entrainent une abolition du cycle viral chez les chimpanzés (Kolykhalov et al. 2000). Une interaction entre NS3 et l'ARN-polymérase ARN-dépendante NS5B a été montrée comme modulant l'activité hélicase et suggère son implication dans la réplication du génome viral (Jennings et al. 2008). Enfin, NS3 serait également impliquée dans l'assemblage de particules infectieuses (Ma et al. 2008).

### II-5-7- La protéine NS4A

NS4A est la plus petite des protéines non-structurales avec 54 aa soit 6 kDa et possède de multiples fonctions dans le cycle viral. Elle code en N-terminal une hélice alpha hydrophobe qui permet d'ancrer la protéine NS3 aux membranes cellulaires (Wölk et al. 2000). Le domaine C-terminal de NS4A forme une hélice alpha à faible pH qui est essentielle pour la réplication de l'ARN viral. Son rôle de cofacteur est nécessaire pour les fonctions protéases et hélicase de NS3. De plus, l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A est dépendante de l'expression de NS4A. Des expériences de mutagénèse révèlent l'importance de cette protéine dans la réplication et l'assemblage des particules virales notamment via l'interaction entre NS3, NS4A et NS4B (Phan et al. 2011).



#### Figure 16 : Topologie membranaire de la protéine NS4B (Cannalire et al. 2016).

Sont représentés en N-ter deux hélices  $\alpha$  amphipathiques (AH1 et AH2), des segments transmembranaires (TM1-4) et deux hélices  $\alpha$  en C-ter (HI et H2). L'extrémité N-terminale de NS4B peut transloquer dans le RE, créant ainsi une cinquième ségment transmembranaire (TMX). Motif de liaison aux nucléotides (NBM) Walker A est situé dans la boucle cytoplasmique entre TM2 et TM3. Le motif de liaison d'ARN est situé entre TM3 et H1.

### II-5-8- La protéine NS4B

NS4B joue un rôle essentiel dans la réplication du VHC et dans le remodelage des membranes cellulaires. C'est une protéine hydrophobe de 27 kDa possédant une région N-terminale (aa 1 à 69), une région centrale (aa 70 à 190) et une région C-terminale (aa191 à 261) (Figure 16).

La région Nter est constituée de deux hélices alpha amphipatiques AH1 et AH2. AH1 serait impliquée dans la réplication de l'ARN en jouant un rôle notable dans la biogénèse des membranous web et serait importante pour la production de virus (Gouttenoire et al. 2014). AH1 serait transloquée dans la lumière du RE grâce à l'hélice AH2. AH2 est aussi montrée comme ayant un rôle clé dans l'oligomérisation de la NS4B qui promeut la courbure des membranes et l'agrégation de vésicules impliquées dans la formation du membranous web (Gouttenoire et al. 2014; Ashworth Briggs et al. 2015).

Le domaine central est constitué de quatre domaines transmembranaires ; il porte un motif de liaison aux nucléotides (NBM : « *nucleotide-binding motif* ») avec une fonction NTPase entre deux de ces domaines. Le motif NBM permettrait la liaison et l'hydrolyse du GTP, nécessaire à la réplication de l'ARN viral (Einav et al. 2004).

La partie Cter est présente du coté cytosolique de la membrane du RE et porte deux hélices alpha, H1 et H2. H2 médie l'association des membranes et serait impliquée dans la formation d'un complexe de réplication fonctionnel. La région Cter présente des sites de fixation à l'ARN ainsi que des sites de palmitoylations probablement impliqués dans l'oligomérisation de la protéine (Yu et al. 2006).

Cette protéine est impliquée dans différents niveaux de la réplication de l'ARN viral (Sklan and Glenn 2006). L'expression de NS4B seule induirait la formation de *membranous web* (Gouttenoire et al. 2009), réseau créé au niveau des membranes du RE qui est le lieu de réplication de l'ARN du VHC. NS4B interagit avec la protéine NS3 (Paredes and Blight 2008) et indirectement avec la NS5B, ce qui modulerait l'activité de la polymérase virale NS5B. NS4B se lierait spécifiquement au GTP et il a été montré que cette protéine se fixe à l'extrémité 3' du brin négatif (Einav et al. 2008). Des mutations dans le domaine de liaison à l'ARN empêchent la liaison au GTP ainsi que son hydrolyse et inhibent la réplication de l'ARN (Einav et al. 2004). Cette protéine serait aussi impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (Jones et al. 2009) ou encore dans la régulation de la traduction, bien que les résultats sur cette étape du cycle soient controversés. Ainsi, en utilisant une construction bicistronique similaire, l'équipe de Kato *et al.* conclut à une régulation négative de la traduction par la NS4B



### Figure 17 : Structure du dimère de NS5A (Bartenshlager et al. 2013).

Modèle du dimère NS5A de pleine longueur associé à une membrane phospholipidique. Chaque sousunité (violette et bleu, respectivement) est constituée de l'alpha-hélice amphipathique amino-terminale (AH), le domaine hautement structuré 1 (D1) et les domaines intrinsèquement désordonnés D2 et D3. Une représentation en surface de la cyclophiline A (CYPA) dans le complexe avec la cyclosporine A (CsA) est montrée en haut à gauche. Une structure supposée pour la CYPA et son site de liaison principal dans NS5A D2 est montrée en haut à droite. Notons que tous les domaines et structures sont dessinés à l'échelle pour illustrer la longueur et la flexibilité des «bras» formés par D2 et D3 et les tailles relatives du CYPA, du complexe CYPA-CsA et du NS5A. (Kato et al. 2002) alors que l'équipe de He *et al*. observe une régulation positive de la traduction (He et al. 2003).

### II-5-9- La protéine NS5A

La NS5A est retrouvée dans la cellule sous une forme phosphorylée (56 kDa) ou hyperphosphorylée (58 kDa). NS5A est une protéine multifonctionnelle homo-dimérique composée de trois domaines séparés par deux régions peu complexes (LCS pour « Low Complexicity Sequences ») (Figure 17). La première région LCS porte les sites de phosphorylation qui vont conduire aux deux états de la protéine. Ainsi, la forme phosphorylée va favoriser la réplication de l'ARN alors que la forme hyperphosphorylée supporte la production virale. NS5A interagirait principalement avec des régions riches en pyrimidines comme l'extrémité 3' non traduite du brin positif (Huang et al. 2005). La partie cytoplasmique de la NS5A est composé d'un domaine I (DI) très structuré et de deux domaines (DII et DIII) intrinsèquement désordonnés et hautement dynamiques.

Le domaine I (aa 1 à 213) contient un motif de liaison au Zinc (Tellinghuisen, Marcotrigiano, and Rice 2005) ainsi qu'une hélice amphiphatique alpha qui permet l'ancrage de la protéine aux membranes cellulaires. Alors que l'expression seule de la NS5A est montrée comme suffisante pour induire les DMV (Double Membranes Vesicules) nécessaires à la réplication de l'ARN viral, des expériences ont pu mettre en évidence l'implication du DI dans cette étape (Romero-Brey et al. 2015). De plus, un homodimère de D1 entraine la formation d'un sillon basique pouvant interagir avec l'ARN. Bien que chacun des trois domaines ait la capacité de se lier à l'ARN, DI serait le principal acteur. Une série de mutants de délétion et/ou substitution permet d'identifier l'arginine de la position 112 comme ayant un rôle prédominant pour lier l'ARN au niveau de la région polyU/UC (Hoffman, Shi, and Liu 2015a) et ainsi réguler négativement la traduction (Hoffman, Li, and Liu 2015). De plus, le mutant R112A est létal pour la réplication du virus ce qui démontre l'importance de cet acide aminé dans le cycle.

Le domaine II (aa 250 à 342) intrinsèquement déstructuré (Hanoulle et al. 2010) aurait des fonctions régulatrices en liant et modulant l'activité de la polymérase virale NS5B (Shirota et al. 2002) mais aussi en jouant sur le système immunitaire via des interactions avec les protéines kinases PKR ou PI3K (Gale et al. 1997). La région C terminale du DII n'aurait pas de rôle dans l'assemblage ou le relargage des virus infectieux mais semblerait être indispensable à la réplication de l'ARN (Ross-Thriepland, Amako, and Harris 2013). Le domaine II est aussi connu comme interagissant avec des protéines de l'hôte tels que les cyclophilines A et B (CypA

et CypB) (Hanoulle, Badillo, et al. 2009). Ces dernières ont une activité de peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIase) qui catalyse la transformation de certaines protéines de la forme *trans* à *cis*. Ainsi, plusieurs études ont pu montrer que, parmi les acides aminés de l'extrémité Cter du DII indispensable à la réplication de l'ARN, plusieurs sont aussi impliqués dans l'interaction avec la CypA (Ross-Thriepland, Amako, and Harris 2013; Dujardin et al. 2015). Par exemple, un petit motif structural dans la région DII est reporté entre la proline 314 et le tryptophane 316 de Con1. Ce dernier est essentiel pour la réplication de l'ARN et important pour la distribution subcellulaire de la NS5A. Il est aussi requis pour l'interaction avec la CypA et intervient dans l'activité PPIase de cette protéine (Dujardin et al. 2015).

Le domaine III (aa 356 à 447) est, comme le DII, intrinsèquement déstructuré (Hanoulle, Verdegem, et al. 2009) et serait un substrat de la cyclophiline A (Verdegem et al. 2011). Il est particulièrement important pour la production de virions infectieux qui aurait un lien avec la phosphorylation de résidus Ser présents dans cette région (Appel et al. 2008). En effet, une délétion dans le domaine III inhibe la production de virion infectieux sans altérer la réplication de l'ARN viral. Des analyses suggèrent alors qu'une seule sérine (Ser457) dans un motif consensus de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) serait importante pour le phénotype observé. Ce résidu régulerait la production de particules virales en fonction de son état de phosphorylation (Tellinghuisen, Foss, and Treadaway 2008).

Le domaine III contient aussi une petite région (aa 420-451) avec principalement l'aa E446 qui modulerait la traduction des protéines virales. Le mécanisme d'action sur la traduction n'est pas connu et pourrait être un résultat indirect en disruptant d'autres interactions (Hoffman, Shi, and Liu 2015b).

### II-5-10- La protéine NS5B

La NS5B est l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) du VHC. C'est une protéine de 65 kDa, phosphorylée au niveau de sa région N-terminale et ancrée à la membrane du RE par sa région C-terminale hydrophobe de 63 aa. L'enzyme présente une structure en main droite caractéristique des polymérases avec trois sous-domaines : les « doigts », le « pouce » et la « paume » (Figure 18). Alors que la paume contient les résidus permettant la catalyse et la liaison des NTP via sa triade catalytique GDD (aa317 à 319) ; les domaines « pouce » et « doigt » sont en contact serré conduisant à la structure dite « fermée » de la polymérase impliquée dans l'initiation de la synthèse. Une caractéristique notable de cette polymérase est la présence d'une boucle  $\beta$  présente sur le domaine du « pouce » et qui est proche du site actif



Figure 18 : Structure générale de la NS5B (Appleby et al. 2015).

Les sous domaines de la protéine sont colorés en rose (doigt), bleu (paume), vert (pouce) et jaune (boucle de  $\beta$ ).

de l'enzyme (Figure 18). La fonction supposée de cette boucle est le bon positionnement de l'extrémité 3' de l'ARN au sein de la RdRp (Harrus et al. 2010). Néanmoins, des changements conformationnels de la polymérase semblent être nécessaires pour libérer une place suffisante à la synthèse du nouvel ARN.

Cette protéine a la capacité d'initier une synthèse d'ARN de novo (Zhong et al. 2000). *In vitro* elle ne dépend que d'une matrice ARN, de ribonucléotides et de cations divalents ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) (Ranjith-Kumar et al. 2002).

L'initiation *de novo* nécessite plusieurs étapes : la polymérase doit reconnaitre sa matrice et positionner correctement l'ARN au niveau du site actif, les premiers NTP doivent y être présents, un primer constitué de deux nucléotides doit être généré. Par la suite, l'élongation pourra se réaliser (Figure 19). La dynamique et le changement de conformation de l'enzyme sont des paramètres essentiels au bon fonctionnement de la polymérase.

#### Fixation de la RdRp sur la matrice

Le mécanisme présidant la première étape de la réplication de l'ARN reste aujourd'hui inconnu puisque qu'aucun site spécifique de fixation de la polymérase sur sa matrice n'est encore clairement défini.

Bien que la boucle  $\beta$ , située dans le domaine du « pouce », puisse aider le bon positionnement de l'extrémité 3' au niveau du site actif (Hong et al. 2001), plusieurs hypothèses sur la fixation de l'enzyme ont été suggérées. L'équipe de Chang (Cheng, Chang, and Chang 1999) démontre par gel retard que l'extrémité 3' de la matrice contenant la partie Cter de la région codante de la NS5B est plus favorable pour déplacer l'équilibre de fixation de la polymérase que les 98 derniers nucléotides seuls. Pourtant d'après les expériences de cross-link et gel retard de Oh (Oh, Ito, and Lai 1999), la polymérase est aussi capable de se fixer sur la 3'X ; une analyse plus précise réalisée par empreinte indique une fixation de la polymérase à cheval sur les tiges-boucles SLII et SLI.

Ces expériences, *in vitro*, utilisaient des matrices ARN de petite taille ; pourtant, il est vraisemblable que l'ARN génomique du VHC soit une molécule dynamique qui subit des variations importantes de conformation. Les interactions ARN-ARN secondaires, tertiaires ou quaternaires sont en perpétuels changements et permettent probablement de réguler les différentes étapes du cycle viral, dont la synthèse de l'ARN et, potentiellement, la reconnaissance de la matrice par la NS5B. Ces interactions présentes au sein de l'ARN seront décrites dans la partie V de l'introduction. De plus, l'initiation *de novo* par la NS5B n'est pas limitée qu'aux extrémités 3' du génome puisqu'elle pourrait aussi avoir lieu sur des séquences





Les sous domaines de la protéine sont colorés en rose (doigt), bleu (paume), vert (pouce) et jaune (boucle de  $\beta$ ).

internes (Shim et al. 2002; Binder et al. 2007) ou encore des matrices circulaires (Ranjith-Kumar and Kao 2006). Ces résultats suggèrent que la NS5B pourrait aussi adopter une conformation dite « ouverte », capable de se lier sur un site d'initiation interne ainsi que sur des matrices par l'intermédiaire de primers (S E Behrens, Tomei, and De Francesco 1996).

En 2008, Chinnaswamy discute d'une nouvelle hypothèse consistant en la possibilité que la RdRp se fixe sur une séquence interne du génome puis se déplace sur la molécule jusqu'à l'extrémité 3' (Chinnaswamy et al. 2008). La polymérase pourrait alors avoir une configuration différente entre ce glissement et la synthèse. Ce mécanisme a également été proposé dans des travaux plus récents (Karam et al. 2014). En utilisant un système de FRET (*« Förster Resonance Energy Transfert »*) sur molécule unique, la dynamique entre la RdRp et l'ARN a pu être étudiée. Seules les matrices ARN sont marquées avec des fluorophores donneurs et accepteurs. Les auteurs ont pu montrer que la fixation de la NS5B sur la matrice entraine une augmentation du signal FRET. Des fluctuations importantes de ce dernier suggèrent un glissement de la polymérase sur l'ARN. De plus, le changement de conformation de l'enzyme (ouverte / fermée) semble nécessaire pour la fixation à l'ARN et la polymérisation. Lorsqu'un inhibiteur se fixe dans le sillon créé par le site actif de la RdRp, il bloque l'enzyme dans une conformation fermée : les fluctuations des valeurs de FRET sont réduites de façon dépendante de la concentration d'inhibiteur. La polymérase se déplacerait donc moins efficacement sur sa matrice.

Ainsi, Karam & *al.* proposent un modèle où l'augmentation des fluctuations de FRET peut être attribuée au glissement de l'enzyme sur l'ARN de 5' en 3'. Cette activité pourrait résulter de changements rapides entre les conformations ouvertes et fermées de l'enzyme, permettant ainsi son mouvement à la recherche de l'extrémité 3'. Une forme ouverte diminue l'affinité pour l'acide nucléique et augmente sa mobilité alors que le passage à la structure fermée empêche la dissociation du complexe binaire. La répétition de ces événements pourrait conduire au déplacement de la polymérase jusqu'à un positionnement précis du site actif sur l'extrémité 3' afin de permettre l'initiation de la synthèse (Karam et al. 2014).

#### Synthèse d'ARN de novo

La première étape de l'initiation *de novo* consiste en la synthèse d'un primer dinucléotide (Harrus et al. 2010) ; une forte concentration de deux premiers nucléotides est alors requise. De plus, des analyses montrent que la polymérase préfère incorporer un GTP en premier et que de fortes concentrations de ce dernier stimulent la synthèse d'ARN. La polymérase serait alors dans une conformation dite fermée. Par la suite, ce dinucléotide est utilisé comme primer qui

## Models for de novo initiation by the HCV RdRp

Monomer model	Closed conformation of HCV RdRp monomer initiates RNA synthesis on 3' terminus of ssRNA through intramolecular $\Delta 1$ loop-thumb interaction	TEMPLATE P
Oligomer model	A. Subunit interactions induce one subunit to be competent for de novo initiation	P
	<b>B.</b> Subunit interactions reconfigure the template channel to facilitate de novo initiation	T

. .

**Figure 20 : Modèles du monomère et de l'oligomère de la RdRp lors de la synthèse de l'ARN** (Chinnaswamy et al. 2010).

Les trois sous-unités de la polymérase sont représentées. Doigts (F), pouce (T), paume (P).

sera étendu avec 1 à 3 nucléotides de plus. A ce stade, le complexe formé est instable ce qui expliquerait la présence régulière de petit produits de synthèse compris entre 2 et 4 nucléotides uniquement. L'incorporation des nucléotides suivant pourrait induire (ou nécessite) un changement conformationnel de la polymérase. De plus, la liaison d'un GTP sur la polymérase semblerait jouer un rôle dans le passage de l'initiation à l'élongation (Harrus et al. 2010; Ranjith-Kumar et al. 2003). La NS5B semble acquérir un état dit « ouvert » en réorganisant les positions de la boucle  $\beta$  et du Cter (Harrus et al. 2010) afin de permettre l'étape d'élongation et la sortie du duplex d'ARN constitué par l'ARN néosynthétisé et la matrice. La transition entre la forme fermée et ouverte de la polymérase est donc un processus indispensable pour la synthèse de l'ARN. Des analyses structurales et fonctionnelles ont identifié un résidu à la position 405 qui pourrait être impliqué dans ce processus. La NS5B de JFH1 est plus efficace que la NS5B de la souche J6 pour la synthèse d'ARN (Schmitt et al. 2011) et le résidu 405, isoleucine pour JFH1, semble y être un facteur clé. Ainsi, lorsque la valine présente dans la NS5B-J6 est substituée, la synthèse d'ARN est augmentée en favorisant la formation du dinucléotide et en augmentant la transition vers l'étape d'élongation (Scrima et al. 2012).

Un autre modèle a également été proposé concernant le changement de conformation de la polymérase du VHC. Celle-ci pourrait s'oligomériser afin de permettre une coopération efficace entre l'initiation et l'élongation.

L'équipe de Colacino démontre l'oligomérisation de la NS5B par gel filtration, cross-link et double hybride ; cet état de l'enzyme serait favorable à la synthèse d'ARN (Wang et al. 2002). L'oligomérisation est précisée dans une autre étude comme étant dynamique et dépendante de la concentration en sels monovalents. La NS5B serait oligomérique à de faibles concentrations en sels et des monomères sont observés pour des concentrations en NaCl proches des 300 mM. De plus, des petits substrats ARN augmenteraient cette interaction protéine/protéine alors que le GTP n'aurait pas d'effet (Cramer, Jaeger, and Restle 2006; Labonté et al. 2002).

Deux modèles d'initiation *de novo* ayant été proposés (Figure 20), l'équipe de C.C. Kao a étudié lesquels des monomères ou oligomères seraient les plus aptes à initier la synthèse d'ARN (Chinnaswamy et al. 2010). Premièrement, les auteurs confirment la présence des différents états de la protéine (monomères, dimères, oligomères) par des analyses en gel natif, diffusion dynamique de la lumière, gel filtration ou microscopie électronique. Par la suite, leurs analyses biochimiques suggèrent que l'interaction entre des sous unités de la RdRp promeut l'initiation *de novo* en agissant au niveau de la beta loop et du domaine « pouce » où se présente la matrice. Les résultats supportent donc l'hypothèse selon laquelle la polymérase active serait sous la forme de dimère/ oligomère. De plus, l'oligomérisation entre sous unités de polymérase a été

reportée comme améliorant la synthèse d'ARN pour la RdRp du poliovirus (Lyle et al. 2002) et du norovirus (Högbom et al. 2009).

Bien que le changement de conformation soit vraisemblablement nécessaire, de plus amples recherches sont à réaliser pour mieux comprendre les mécanismes qui président l'initiation *de novo*.

Lorsque la synthèse est initiée et le changement conformationnel réalisé afin de permettre la formation du brin fille, la polymérase entre dans une phase d'élongation qui peut être résumée en trois étapes :

- incorporation du NTP sur le brin fille par la formation d'une liaison phosphodiester,

- libération d'un pyrophosphate
- translocation le long de la matrice.

La NS5B, processive, allongerait le brin naissant en incorporant entre 100 et 400 nucléotides par minutes (Lohmann 2013). Comparée à l'initiation, l'étape d'élongation ne requiert pas une forte concentration en nucléotides.

Peu de choses sont connues quant à la terminaison de la synthèse. Il a été suggéré que la polymérase « tomberait » à la fin de la matrice lorsque le brin complémentaire est synthétisé.

# II-6- Inhibiteurs des protéines du VHC

Récemment, de nouveaux antiviraux à action directe (AAD) ont été mis sur le marché avec une efficacité supérieure à 90% après 12 semaines de traitement. Néanmoins, ces molécules restent excessivement chères (entre 40000 et 75000 euros) et ne sont donc prescrites, en France, que dans certaines situations.

Pour que ces nouveaux traitements soient pris en charge par l'assurance maladie, il existe actuellement en France, une priorisation de l'accès au traitement pour des populations bien définies : patients ayant une atteinte hépatique sévère, manifestations extra-hépatiques et co-infection par le VIH. Ainsi, chaque prescription doit être validée en réunion de concertation multidisciplinaire.

Le principe du traitement de l'hépatite C repose sur une combinaison d'au moins deux molécules, pour une durée de 12 à 24 semaines, avec ou sans ribavirine selon les schémas thérapeutiques et les profils des patients.

### II-6-1- Inhibiteurs de la NS3-4A

Les inhibiteurs de protéases se fixent sur le site catalytique de l'enzyme NS3-4A et bloque le clivage post-traductionnel de la polyprotéine (McCauley and Rudd 2016). Les inhibiteurs de la première génération, le Telaprevir et Boceprevir, sont essentiellement actif contre le génotype 1. Ces composés peuvent entrainer l'apparition de résistances et sont donc utilisés en trithérapie avec l'IFN et la ribavirine. Ils ont alors permis d'augmenter la RVS à 75% en réduisant la durée du traitement de 48 à 24 semaines.

Lors de la seconde vague de la première génération, 2 molécules ont été approuvées : le Simepravir et le Paritaprevir. Le Simepravir est un inhibiteur macrocyclique efficace sur les génotypes 1 et 4, la durée de traitement allant de 12 à 24 semaines. Il est souvent utilisé en combinaison avec le Sofosbuvir (inhibiteur de la NS5B). Le Paritaprevir a obtenu son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2015. Il est efficace à plus de 95% contre le génotype 1 lorsqu'il est co-administré avec le Dasabuvir (inhibiteur de la NS5A) et l'Ombitasvir (inhibiteur de la NS5A). D'autres molécules de cette seconde vague, en cours d'essais cliniques, semblent efficaces contre les génotypes 1, 2 et 4.

### II-6-2- Inhibiteurs de la NS5A

La protéine NS5A est impliquée dans plusieurs étapes du cycle viral. Elle régule la réplication de l'ARN par son interaction dans le complexe de réplication mais joue également un rôle dans l'assemblage et la sécrétion des virions. Les inhibiteurs ciblent le domaine I de l'enzyme et compromettent toutes les fonctions de la NS5A. Parmi les molécules de première génération ayant eu l'AMM, on y trouve le Daclatasvir. Ce dernier se lie à la région N-ter du domaine 1 de la NS5A et induit des changements structurels de la protéine. La molécule empêche l'hyperphosphorylation de l'enzyme et bloque son déplacement cellulaire. Cela a donc des conséquences sur la réplication de l'ARN et sur l'assemblage des virions. Utilisé en association avec le Sofosbuvir, l'efficacité du Daclatasvir est supérieure à 80% pour un traitement de 12 semaines. D'autres molécules telles que le Ledipasvir (génotype 1) ou l'Ombitasvir ont également obtenu leur AMM en 2015 et restent très efficaces en bi ou tri-thérapie. Des inhibiteurs de la NS5A de deuxième génération sont en cours d'étude. Ils sont actifs contre de plus nombreux génotypes mais leur barrière de résistance ne semble que peu améliorée par rapport aux premières générations.





Le virus interagit avec les cellules cibles en se liant à des facteurs de fixation et à des récepteurs (1) qui régulent son internalisation par endocytose médiée par la clathrine (2). La fusion des membranes virales et cellulaires est déclenchée par le faible pH du compartiment endosomal et conduit à la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme (3). Le génome est traduit par les ribosomes de l'hôte pour produire un précurseur de polyprotéine qui sera clivé par les protéases cellulaires et virales pour donner lieu aux protéines virales (4). Les protéines non structurales (NS) forment un complexe de réplication, ce qui permet de multiples copies du génome d'ARN du VHC par l'intermédiaire d'un moins un brin réplicatif intermédiaire (5). L'ARN synthétisé peut soit ré-entrer dans le cycle de vie, afin de produire plus de protéines du VHC, soit être encapsidé dans des nucléocapsides (6). Le bourgeonnement de la nucléocapside dans le réticulum endoplasmique (RE) conduit à l'acquisition de l'enveloppe virale avec les glycoprotéines E1 et E2. Lors de la sécrétion, les virions subissent une maturation et sont associés avec des lipoprotéines endogènes pour former des particules lipovirales (7). Elles sont libérées de la cellule (8) ou transmises directement à travers les jonctions serrées pour infecter les cellules voisines (9).

## II-6-3-Inhibiteurs de la NS5B

Les inhibiteurs de la polymérase virale sont de deux types en fonction de leur mode d'action :

- Les inhibiteurs nucléosidiques ciblent de manière spécifique le site actif de la polymérase. Ce sont des analogues de substrats pour la RdRp qui entrainent une terminaison de chaine après avoir été incorporés dans l'ARN viral néo-synthétisé. Le Sofosbuvir est sur le marché depuis 2014. C'est un nucléotide pyrimidique monophosphorylé qui subit une métabolisation intracellulaire pour former un analogue de l'uridine triphosphate actif au site cible. Son activité antivirale est pangénomique et limite l'apparition de mutations. Pour un traitement de 12 semaines, l'efficacité de la RVS est supérieure à 90%.

Les inhibiteurs non nucléosidiques se lient à l'un des quatre sites allostériques de l'enzyme et altèrent sa conformation, bloquant ainsi sa fonction catalytique et donc la réplication de l'ARN.
Deux sites sont situés au niveau du « pouce » de l'enzyme et deux autres sont au niveau de la « paume ». Le Dasabuvir a obtenu son AMM en 2015. Il se fixe au niveau du domaine I de la « paume ». Il est efficace à plus de 95% sur des patients de génotype 1 et en co-administration avec l'Ombistavir et le Paritaprevir. D'autres inhibiteurs liant le domaine I ou II du « pouce » sont encore en essai clinique. Les molécules non nucléosidiques sont généralement actives contre le génotype 1 du VHC et peuvent entrainer des mutations de résistance.

# III- Cycle de vie du VHC

Un schéma représentant l'ensemble du cycle réplicatif est présenté Figure 21. Après l'entrée du virus dans la cellule, l'ARN viral est traduit, répliqué et encapsidé.

## **III-1- Entrée du virus**

Pour plusieurs virus, la fixation initiale aux cellules cibles est peu spécifique. Ainsi, les glycosaminoglycanes (GAG) présents à la surface des cellules représentent le premier site de liaison. La protéine d'enveloppe E2 pourrait se lier aux GAG (Barth et al. 2003) et les lipoprotéines associées aux particules du VHC interagiraient avec les LDLR (*« Low-Density Lipoprotein Receptor »*) (Molina et al. 2007).

Par la suite, le virus interagit avec au moins quatre facteurs cellulaires majeurs (Figure 21). SRB1 (« *scavenger receptor B1* ») est un récepteur à multiples ligands incluant les HDL (« *High-Density Lipoprotein* « ) ainsi que la région hypervariable 1 (HVR1) de la protéine E2 (Scarselli et al. 2002). Le récepteur CD81 appartient à la famille des tetraspanines. Il interagit principalement avec E2 et joue un rôle clé dans l'entrée du virus au sein de la cellule (Pileri et al. 1998). CD81 a aussi été montré comme interagissant avec la protéine Claudine 1 (CLDN1), ayant alors une fonction de co-recepteur (Evans et al. 2007). Les protéines CLDN1 et Occludine (OCLN) sont principalement situées dans les jonctions serrées. Les protéines OCLN sont un facteur d'entrée essentiel pour le VHC mais leur rôle précis reste inconnu (Ploss et al. 2009).

Après fixation du virus à la surface des cellules, le virion entre par endocytose médiée par la clathrine. En effet, la déplétion de la clathrine ou l'utilisation de chlorpromazine (inhibiteur de la formation des puits recouverts de clathrine à la membrane plasmique) inhibe l'infection virale (Blanchard et al. 2006). Ce résultat est concordant avec le fait que le complexe CD81-CLDN1 soit aussi internalisé de manière dépendante à la clathrine (Farquhar et al. 2012). Après l'internalisation, le virion est transporté vers les endosomes précoces et la fusion des membranes est induite par un pH acide qui entraine probablement des changements conformationnels dans les protéines d'enveloppes E1 et E2 (Tscherne et al. 2006). La décapsidation du virus permet le relargage du génome dans le cytoplasme de la cellule.

Une autre voie possible d'entrée des virions sécrétés est la transmission de cellule à cellule. Celle-ci confère un avantage particulier au virus pour échapper à la réponse immune humorale et établir une infection chronique. Cette transmission a été décrite pour les principaux génotypes et montre des mécanismes similaires à la voie d'entrée classique (Brimacombe et al. 2011). Excepté pour les LDLR qui ne semblent pas avoir été investigués aujourd'hui, tous les récepteurs décrits précédemment y seraient impliqués. Néanmoins, l'indispensabilité de SR-B1 et plus particulièrement de CD81 reste controversée pour la propagation du virus de cellule en cellule (Douam, Lavillette, and Cosset 2015).

Un autre mécanisme de la transmission de cellule à cellule pourrait impliquer les exosomes. En effet, des études réalisées sur des exosomes purifiés, à partir de cellules infectées *in cellulo* ou issues de patients, ont montré leur capacité à infecter de nouvelles cellules (Ramakrishnaiah et al. 2013; Bukong et al. 2014).

Une fois que le virus est entré dans la cellule et que l'ARN génomique est relargué dans le cytoplasme, ce dernier va devoir être pris en charge par les ribosomes cellulaires pour produire les protéines virales.

# **III-2- Traduction de la polyprotéine virale**

L'ARN génomique du VHC possède un IRES (Internal Ribosome Entry Site) à son extrémité 5'; il va permettre la traduction de la polyprotéine. L'initiation de la traduction médiée par un IRES est distincte de celle des ARNm eucaryotes qui portent une coiffe 7mG à l'extrémité 5'. En effet, cette dernière est impliquée dans le recrutement d'un certain nombre de facteurs d'initiation (eIF) qui sont eux même responsables du bon positionnement du ribosome au niveau du codon AUG.

La présence d'un IRES permet le recrutement direct et le bon positionnement de la sous-unité 40S au niveau du codon AUG. Le facteur d'initiation eIF3 et le complexe ternaire eIF2/GTP/Met-tRNA viennent alors se fixer et stabilisent la structure. Il s'en suit le recrutement des facteurs eIF5A et eIF5B qui permettront la formation de la sous-unité 48S. Le relargage des eIFs via l'hydrolyse du GTP permet la liaison de la sous unité 60S pour former le ribosome actif 80S qui pourra initier la synthèse protéique (Khawaja, Vopalensky, and Pospisek 2015) (Figure 22).

L'activité de traduction du génome viral peut être modulée par des protéines virales (protéine core) ou cellulaires (Lourenço et al. 2008). La protéine La-autoantigène stimulerait la traduction en interagissant avec une séquence proche de l'AUG initiateur (Pudi et al. 2003). La protéine NSAP1 a diverses fonctions dans le métabolisme de l'ARN comme la régulation de l'épissage ou de la traduction (Park et al. 2011). Elle se fixe sur l'IRES proche de la séquence de la Core. Elle interagit directement avec la sous unité 40S et permettrait le bon positionnement de cette dernière au niveau du codon d'initiation, elle faciliterait la formation du complexe 80S. Des protéines appartenant aux ribonucléoproteines hétérogènes (hRNP) se fixeraient également sur l'IRES et impacteraient la traduction (Paek et al. 2008). Par exemple, IMP-1 est impliquée dans la localisation des ARNm, le turnover et la traduction (Yisraeli 2005). Comme le facteur eIF3, elle est associée avec les complexes d'initiation 48S et 80S. La liaison d'eIF3 et d'IMP-1 à l'IRES favorise l'initiation de la traduction (Weinlich et al. 2009). Les protéines LSm1-7 et Gemin5 auraient des fonctions de régulation opposées. Les deux protéines se lient sur la même



# **Figure 22 : Initiation de la traduction de la polyprotéine virale** (Khawaja, Vopalensky, and Pospisek 2015).

Les facteurs d'initiation (eIF) requis pour assembler les complexes 48S et 80S de pré-initiation sont représentés. Les flèches rouges indiquent la traduction indépendante de eIF2-GTP lorsque la cellule est sous stress et que eIF2 $\alpha$  est phosphorylé. La synthèse protéique se poursuit avec eIF5B ou d'autres facteurs rapportés (eIF2A, eIF2D). Des mutations dans différents domaines IRES du VHC qui peuvent inhiber des stades particuliers de formation de complexes de traduction sont indiquées sous les flèches.

région de l'ARN et alors que LSm1-7 augmente la traduction (Scheller et al. 2009), Gemin5 la diminue (Pacheco et al. 2009).

Après la traduction de la polyprotéine, cette dernière est clivée par des protéases virales et cellulaires en protéines structurales et non-structurales.

Les signal peptidases et signal peptides peptidases médient le clivage des protéines structurales Core, E1, E2 et la jonction entre p7 et NS2. NS3 clive NS4A et NS4B, formant ainsi la protéase NS3/NS4A qui clivera les jonctions NS4B/5A et NS5A/5B. Le clivage entre NS2 et NS3 est, quant à lui, médié par la cystéine protéase NS2.

# **III-3- Réplication de l'ARN viral**

Le remodelage intracellulaire des membranes forme des structures appelées *membranous web* (MW) où siège la réplication de l'ARN. Ces structures sont des vésicules à double membranes (DMV) permettant d'augmenter la concentration des facteurs requis pour une réplication efficace de l'ARN, de coordonner spatialement les différentes étapes du cycle viral (traduction, réplication, assemblage) et de protéger les protéines virales et l'ARN des défenses cellulaires. Les protéines non-structurales NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B et certains facteurs cellulaires s'associent au niveau de ces membranes et forment ainsi le complexe de réplication (CR) (Figure 23) (Paul, Madan, and Bartenschlager 2014; Gosert et al. 2003).

Le premier inducteur des MW pourrait être la protéine transmembranaire NS4B (Egger et al. 2002) bien que cette dernière ne soit pas suffisante pour former ces structures (Romero-Brey et al. 2012). Des études ultérieures ont mis en évidence l'importance de NS5A : elle serait la seule à pouvoir former des DMV (Romero-Brey et al. 2015). Néanmoins la plupart, voir toutes les autres protéines non structurales seraient requises pour une formation efficace des MW (Wang and Tai 2016). La présence de nombreux facteurs cellulaires serait également nécessaire. Par exemple les protéines PI4P (*« Phosphatidyl-inositol-4-protein »*) interagiraient avec la NS5A et seraient accumulées dans les MW. Des protéines associées aux vésicules (VAP) ou le cholestérol seraient aussi enrichies dans les DMV (Wang and Tai 2016).

Les MW apparaissent comme les sites de réplication de l'ARN génomique. En effet, par microscopie à fluorescence, il a été montré que l'ARN nouvellement synthétisé (marqué au BrdUTP) co-localise avec la protéine NS5A, marqueur des MW (Moradpour et al. 2004).

Les protéines non-structurales dont la RdRp NS5B étant ainsi regroupées, la réplication de l'ARN viral pourra se produire. Cette étape commence tout d'abord par la synthèse d'un ARN



Figure 23 : Modèle des vésicules à double membrane lors de la réplication de l'ARN du VHC avec les protéines virales impliquées (Paul, Madan, and Bartenschlager 2014).

Les vésicules à membrane double (DMV) induites par le virus contiennent des protéines non structurales du VHC et de l'ARN et sont des sites de réplication actif d'ARN. La DMV peut contenir une ouverture (transitoire) ou un transporteur distinct pour permettre l'échange de nucléotides et d'ARN viral de l'intérieur du DMV avec le cytoplasme. On notera que la réplicase virale pourrait également résider sur la surface externe du DMV (non représenté). Les diagrammes de ruban des protéines du VHC associées à la membrane et les changements de conformation requis pour la réplication sont indiqués dans les cases à droite. NS5B: la structure de gauche correspond à la conformation fermée, représentant l'état potentiel d'initiation de l'enzyme. Le schéma de droite montre la NS5B dans un mode d'allongement hypothétique. Ce changement de conformation libérerait la rainure de liaison d'ARN pour loger un intermédiaire de réplication d'ARNdb (montré en bleu et jaune). NS5A: modèle d'un dimère de pleine longueur associé à une membrane via l'hélice  $\alpha$  amphipathique N-terminale. Les domaines (D) 2 et 3 sont intrinsèquement dépliés et pensés pour interagir avec de multiples facteurs d'hôte cooptés, y compris la cyclophiline A (CypA) se liant à D2. NS3-4A: l'orientation présumée de la membrane du complexe NS3-4A pendant la synthèse des polyprotéines et avant l'auto-clivage au site NS3 / 4A est montrée à gauche. Après le clivage, des changements structuraux profonds se produisent, notamment une insertion membranaire de la queue C-terminale de NS4A (orange) et un repositionnement du domaine C-terminal NS3-hélicase (gris) loin de la membrane. NS4B: la topologie à double membrane proposée est présentée. Les structures des hélices  $\alpha$ amphipathiques AH2 et H2 ont été déterminées expérimentalement, tandis que les autres éléments structurels sont basés sur des prédictions in silico.

complémentaire de polarité négative (ARN(-)) en utilisant le génome comme matrice. Ce nouveau brin servira alors à son tour de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules virales ARN (+). Les ARN de polarité positive seraient synthétisés 5 à 10 fois plus que les ARN intermédiaires négatifs (Reigadas et al. 2001; Suzuki et al. 2007).

La polymérase du VHC n'ayant pas d'activité proofreading, elle induit un taux d'erreur estimé à une mutation tous les 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> nucléotides.

Bien que la NS5B soit suffisante *in vitro* pour permettre la synthèse de l'ARN, les protéines non structurales NS3/4A, NS4B et NS5A auraient un effet direct ou indirect dans la réplication du génome viral. Cependant, leur rôle précis reste énigmatique puisqu'elles sont principalement étudiées *in vitro* et peu dans un contexte cellulaire du aux membranous web.

L'hélicase NS3 pourrait être impliquée dans la synthèse en résolvant les structures complexes des extrémités 3' de l'ARN matrice ainsi qu'en déroulant l'ARN double brin, intermédiaire potentiellement formé lors de la réplication. Par des expériences *in vitro*, sur des modèles cellulaires ou sur une reconstitution de bicouche lipidique, l'interaction entre ces deux protéines est démontrée comme se faisant via le domaine protéase de la NS3 (Jennings et al. 2008; Ranjith-Kumar et al. 2011; Cho et al. 2016). L'activité hélicase de la NS3 stimule l'activité RdRp (Piccininni et al. 2002) et réciproquement, la NS5B modulerait l'activité de l'hélicase NS3 (Jennings et al. 2008).

La protéine NS4A, cofacteur de NS3 régule cette dernière et agit sur l'état de phosphorylation de la NS5A (Lindenbach et al. 2007). La protéine NS4A aurait donc un rôle indirect sur la NS5B mais est aussi impliquée dans le contrôle de la réplication.

En plus de participer à la réorganisation des membranes, NS4B inhiberait la NS5B *in vitro* (Piccininni et al. 2002) mais serait aussi capable de se lier à l'ARN et posséderait une activité NTPase. De plus des interactions avec la NS3 ont été rapportées suggérant l'implication de ces protéines dans la régulation de la réplication ARN (Paredes and Blight 2008).

Enfin, NS5A semble elle aussi avoir des fonctions essentielles dans la synthèse d'ARN en culture cellulaire, notamment de par la régulation de sa phosphorylation. Les analyses ne sont pas toujours des plus claires car les différentes phospho-isoformes ne sont pas disponibles pour les études *in vitro*. Pourtant certaines recherches suggèrent que de faibles doses de NS5A stimulent la RdRp alors que de fortes quantités l'inhibent (Shirota et al. 2002), ce qui a été confirmé dans les tests cellulaires (Ranjith-Kumar et al. 2011). Des études *in vitro* permettant d'étudier les différentes phases de la synthèse d'ARN concluent en un rôle stimulateur de NS5A durant la phase d'élongation (Quezada and Kane 2009). Cette stimulation est confirmée lorsque



#### Figure 24 : Modèle de la production des particules virales (Gawlik and Gallay 2014).

a. La formation de particules du VHC commencerait sur ou près de la surface des gouttelettes lipidiques (LD), très probablement en même temps que l'enveloppement au RE, et se poursuit à travers la voie sécrétoire en association avec des composants de synthèse VLDL pour produire une forme mature de lipoviroparticles.

b. Les proteines Core interagissent avec les NS5A à la surface ou à proximité immédiate des LD. L'ARN viral peut être encapsidé dans les oligomères de protéine Core nouvellement formés. p7 recruterait l'ensemble à la membrane du RE et serait nécessaire pour les étapes finales de l'assemblage et le bourgeonnement. NS2 rapproche les sites de réplication et d'assemblage grâce à son interaction avec les glycoprotéines E1 et E2 et NS3 / 4A.

l'effet de la protéine en présence de la polymérase et d'ARN est analysé sur un support de bicouches lipidiques mimant les membranes du complexe de réplication (Cho et al. 2016). L'effet antagoniste entrainant une inhibition de l'activité de la polymérase est aussi confirmé *in cellulo* lors de co-expression des deux protéines (Ranjith-Kumar et al. 2011). Néanmoins, alors que des effets modulant la réplication de l'ARN sont observables *in vitro* en absence du domaine transmembranaire des protéines, ce dernier semble essentiel pour la synthèse lorsque la NS5B est ancrée dans les membranes (Ranjith-Kumar et al. 2011). Il est aussi suggéré que l'interaction entre ces deux protéines pourrait induire un changement conformationnel de la RdRp, régulant ainsi la synthèse d'ARN.

Outre les protéines virales, des protéines cellulaires sont impliquées dans le complexe de réplication. Plusieurs approches de criblage incluant des siRNA ont permis d'identifier plusieurs protéines (Qisheng Li et al. 2009; Tai et al. 2009). Parmi les plus étudiées, on retrouve PI4K qui est impliqué dans la formation des MW et interagit avec NS5A (Berger et al. 2009). Des protéines de la famille des VAMP (« *Vesicle-associated membrane protein* ») comme hVAP-A qui, par leurs rôles dans le transport de vésicules, pourraient être impliquées dans le réarrangement des membranes. De plus, cette protéine se lie uniquement à la forme hypophosphorylé de la NS5A qui est impliquée dans la réplication de l'ARN (Evans, Rice, and Goff 2004). La cyclophiline A interagit directement avec la NS5A et participerait à la réplication du virus (Kaul et al. 2009). Elle interagirait aussi avec la partie C-terminale de la NS5B afin d'améliorer son affinité pour l'ARN et stimuler la réplication virale (Watashi et al. 2005).

Lorsque les nouveaux génomes seront synthétisés, ils pourront être à nouveau traduits ou bien être encapsidés pour former de nouveaux virions.

# III-4- Assemblage et sortie des particules virales

Une des caractéristiques des particules virales infectieuses du VHC est leur faible densité de flottaison qui reflète la composition des lipoprotéines de faible densité. Ainsi, l'ARN semble être délocalisé des membranous web, la nucléocapside se formerait autour du génome au niveau des gouttelettes lipidiques, elle serait enveloppée par les glycoprotéines présentes aux membranes du RE puis la particule virale serait sécrétée par exocytose en suivant la voie des VLDL (Miyanari et al. 2007) (Figure 24). Alors que des caractéristiques sur les différentes

étapes ont pu être analysées, la régulation de la translocation entre les différents sites reste encore peu détaillée.

Les protéines virales Core et NS5A s'associent avec les gouttelettes lipidiques (GL) pendant l'assemblage des virions. NS5A serait impliqué dans le transport des ARN génomiques entre les DMV et les GL où l'encapsidation par les protéines Core aurait lieu (Filipe and McLauchlan 2015).

La protéine Core est localisée au niveau des membranes du RE avant d'être maturée et déplacée au niveau des GL sous forme d'homodimère.

L'hélice amphipathique du domaine I de la NS5A permet l'interaction avec les membranes intracellulaires (RE) et les GL. Lorsque NS5A est hyperphosphorylée, elle interagirait avec la protéine Core (Masaki et al. 2014) et sa fonction dans la réplication de l'ARN basculerait vers une fonction liée à l'assemblage des virions (Lindenbach 2013).

La translocation des protéines NS5A et Core vers les GL implique aussi plusieurs facteurs cellulaires (Filipe and McLauchlan 2015). Par exemple, DGAT1 (« *diacylglycerol acyltransferase-1* ») a un rôle dans la morphogénèse des GL ; DGAT1 interagirait avec les deux protéines virales, facilitant ainsi leur recrutement au niveau d'une même GL. La protéine Rab18 (« *Ras-related protein 18* ») est impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire, elle est associée au GL. Rab18 se lie avec la protéine NS5A et promeut son association avec les GL (Salloum et al. 2013). L'apolipoproteine J (ApoJ) qui est une chaperonne moléculaire associée aux lipides de très faible densité, stabilise le complexe Core-NS5A et supporte la production de virions infectieux (Lin et al. 2014).

Le complexe NS3/4A, principalement NS3, pourrait aussi être impliqué dans le passage entre la réplication et l'encapsidation. De plus, des interactions entre le domaine hélicase de NS3 et la Core protéine ont été montrées comme essentielles à l'assemblage viral (Jones et al. 2011).

Les autres protéines structurales du VHC sont les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Ces dernières seraient retenues sous forme d'hétérodimère au niveau du RE. Il a été montré que NS2 interagirait avec E1, E2 et P7 afin de déplacer E1/E2 au site d'assemblage que sont les GL (Stapleford and Lindenbach 2011). De plus, avec ses capacités d'oligomérisation et de transport de cations, P7 permettrait d'équilibrer le pH dans les compartiments de sécrétion des particules virales et donc limiterait les changements conformationnels des glycoprotéines liés au pH (Wozniak et al. 2010).

Les protéines virales ne sont pas les seules à être impliquées dans la biogénèse des virions. La voie d'assemblage des VLDL est en effet essentielle pour le relargage des virus. Plusieurs apolipoprotéines sont ainsi retrouvées associées aux particules VHC. Néanmoins, ApoE semble être l'apolipoprotéine minimale requise pour former des particules virales infectieuses (Hueging et al. 2014). Les virions néo-formés seraient ensuite sécrétés par exocytose.

# IV- Modèles d'étude du Virus de l'Hépatite C

Après la découverte du VHC en 1989, l'absence de système cellulaire était un obstacle majeur pour l'étude du virus. Les principales avancées eurent lieu en 1999 avec la mise en place d'un réplicon sous génomique du VHC et en 2005 avec la découverte d'une souche virale qui possédait la capacité d'infecter des cellules en culture. Les cellules Huh7, issues d'un hépatocarcinome humain (Nakabayashi et al. 1982) sont largement utilisées dans l'étude du VHC.

# IV-1- Systèmes d'étude de l'entrée

### IV-1-2- Les virus-like particules (VLP)

Afin de pouvoir étudier l'entrée du VHC, des modèles basés sur la production de particules virales ont été mis au point *in vitro* en 1998 (Baumert et al. 1998). Pour se faire, des cellules d'insecte ou de mammifère sont transformées avec un vecteur recombinant codant pour les protéines structurales du VHC : core, E1 et E2. Ces particules s'assemblent seules et ne portent pas de génome ; elles ne sont donc pas réplicatives. Elles ne sont pas non plus libérées dans le milieu extracellulaire, suggérant que l'étape d'assemblage ou de sécrétion est bloquée dans ce système. Ces particules peuvent néanmoins être purifiées et présentent des caractéristiques morphologiques similaires aux virus isolés de sérum de patient. Toutefois, ce modèle se limite à l'étude de l'attachement du VHC car l'absence de marqueur génomique ne permet pas le suivi du cycle viral.

## IV-1-3- Les pseudo-particules du VHC (VHCpp)

Afin d'étudier l'entrée des particules virales un autre modèle, basé sur la production des VHCpp, a été développé. Pour ce faire, trois plasmides sont utilisés : un vecteur codant pour



Figure 25 : Modèle des pseudoparticules du VHC (A) et du replicon VHC (B) (Ortega-Prieo and Dorner 2016).



#### Figure 26 : Représentation des principales mutations présentes sur le réplicon (Murray and Rice 2011).

Les réplicons de VHC bicistroniques codent pour la néomycine phosphotransferase (Neo) qui est suivie par l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite et la région codante du VHC NS3 à NS5B.

Les réplicons Con1 et H77 ne se répliquent efficacement qu'en présence de mutations adaptatives. Les points rouges représentent les mutations qui confèrent individuellement la capacité réplicative; les points bleus représentent les mutations qui doivent se produire en combinaison avec une ou plusieurs autres modifications pour permettre la réplication.

les glycoprotéines d'enveloppe du VHC E1E2, un vecteur codant pour les protéines de capsides du VIH et un plasmide codant pour un gène rapporteur flanqué par les régions LTR rétrovirales. Les cellules 293T sont transfectées par ces plasmides et sécrètent les VHCpp dans le surnageant où ils peuvent être purifiés et concentrés (Bartosch, Dubuisson, and Cosset 2003). Des cellules Huh7 peuvent alors être infectées et l'entrée du virus est quantifiée par l'expression du gène rapporteur des pseudos-particules (Figure 25).

# IV-2- Systèmes d'étude de la réplication

### IV-2-1- Le réplicon

En 1999, Lohmann et son équipe définissent quelles sont les protéines minimales requises pour permettre la réplication autonome d'un ARN sous-génomique non infectieux dans des cellules humaines (Lohmann, Körner, et al. 1999). Ils construisent alors une molécule d'ARN, nommée réplicon constituée de deux cistrons :

- Le premier code pour un gène de résistance (Néomycine) placé en aval de la région 5' non traduite du VHC. Par la suite d'autres constructions y ont inséré un gène rapporteur.

 Le second, sous le contrôle de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) code pour les protéines NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B et assure la réplication. A l'extrémité de la molécule, la région 3' non traduite du VHC est présente (Figure 25).

La transfection de ces ARN transcrits *in vitro* dans des cellules Huh7 sous pression de sélection permet la production de lignées cellulaires répliquant de manière stable ce réplicon VHC. Toutefois, la capacité à répliquer varie dépendamment de deux paramètres : la permissivité des cellules utilisées et la présence de mutations d'adaptation au niveau du réplicon. Alors qu'il est possible d'éliminer le réplicon VHC en traitant les cellules Huh7 avec de l'interféron, lorsque l'ARN du même réplicon est réintroduit dans ces cellules, la réplication de l'ARN est plus importante. On parle alors de cellules permissives au réplicon (Blight, McKeating, and Rice 2002). De plus, un certain nombre de mutations adaptatives ont aussi permis l'augmentation du niveau de réplication (Figure 26). Ces dernières sont principalement retrouvées dans les régions NS3, NS4B, NS5A et NS5B (Bartenschlager 2004). Les mutations adaptatives les plus importantes se retrouvent au sein de la protéine NS5A et modifient son état de phosphorylation (Murray and Rice 2011). Ainsi, la forme hyper-phosphorylée désavantageuse pour la réplication du virus devient moins fréquente (Neddermann et al. 2004). Des mutations


**Figure 27 : Représentation de la production de particules virales en culture cellulaire** (Gerold and Pietschmann 2014).

individuelles dans les protéines NS4B et NS5B ont aussi été retrouvées. Les changements au sein de NS3 semblent être moins efficaces et n'altèrent pas la fonction hélicase de la protéine. Ce modèle d'étude a largement contribué à la compréhension de la fonction des protéines nonstructurales ainsi qu'à l'importance des régions 5' et 3' non traduites. Néanmoins, ce système ne permet pas de distinguer l'étude de la traduction et de la réplication de l'ARN. En effet, cette dernière dépend de la quantité de protéines non structurales produites. Si par exemple la réplication de l'ARN est affectée, il y aura moins d'ARN synthétisé donc moins d'ARN disponible pour la traduction. Comme dans le virus, les deux étapes sont donc couplées dans le cadre du système réplicon. Afin de pallier ce problème, un autre modèle, nommé minigénome, a été développé au laboratoire.

#### IV-2-2- Le minigénome

Essentiellement utilisé au laboratoire, le système repose sur l'utilisation d'un ARN rapporteur transfecté dans des cellules qui expriment le complexe de réplication (Dumas et al. 2007b). Le minigénome est un ARN de 2700 nucléotides (nt) constitué des régions 5'UTR et 3'UTR du VHC encadrant les gènes codant pour l'hygromycine phosphotransférase (HygroR), l'autoprotéase 2A du FMDV (Foot and Mouth Disease Virus) et l'eGFP.

Les cellules nommées Huh7-Rep5.1 qui expriment les protéines NS3 à NS5B en hébergeant le réplicon (Rep5.1) sont utilisées. Le complexe de réplication est donc produit de manière constitutive et permet la réplication de l'ARN du minigénome sans être dépendant de sa traduction.

## IV-3- Systèmes d'étude du cycle complet

#### *IV-3-1- Les particules virales produites en culture cellulaire (VHCcc)*

Il aura fallu attendre 2005 pour que trois équipes (Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005; Lindenbach et al. 2005) réussissent à mettre en place un système de culture cellulaire du virus (Figure 27). Un ARN génomique issu d'une souche d'hépatite fulminante chez un patient japonais (JFH-1 : « *Japanese Fulminant Hepatitis 1* ») de génotype 2a a été transfecté dans des cellules Huh7. Ce dernier s'est répliqué, produisant ainsi des virions infectieux pouvant infecter des cellules hépatocytaires ainsi que des modèles animaux. Une des limites de ce modèle est que seul le génotype 2a est représenté. Afin d'améliorer le système, des virus chimériques sur

	Human	Chimpanzee	Tree shrew	Humanized mice xenotransplantation	Humanized mice genetic humanization
	-	(1) (1)		C. C	e.
HCV infection HCV pathogenesis	Yes Fibrosis cirrhosis HCC	Yes Milder than in humans	Yes Evidence for hepatitis, fibrosis cirrhosis	Yes Evidence for fibrosis	Entry only No
Immune system Costs Theorem	Human High Low	Chimp High Low	Tupaia Medium	Human Medium	Mouse Low High
Genetic manipulation Drug/Vaccine development	No Yes	Low Yes	Low No Unkown	Yes (limited) Yes (inhibitors)	Tugu Yes Yes (entry inhibitors)

Figure 28 : Principaux modèles animaux pour l'étude du VHC (Billerbeck et al. 2013).

la base du JFH1 ont été construits. L'équipe de Pietschmann a identifié un site de fusion efficace et ainsi construit des chimères avec Con1 (génotype 1b), H77 (génotype 1a), 452 (génotype 3a), et J6 (génotype 2a) (Pietschmann et al. 2006). Néanmoins, toutes ces constructions ont besoin de mutations adaptatives pour soutenir une réplication efficace en culture cellulaire.

#### IV-3-2- Les modèles animaux

Des exemples de modèles animaux sont présentés Figure 28.

#### <u>Le chimpanzé</u>

Les chimpanzés sont naturellement susceptibles à l'infection par le VHC. Ils ont été très utiles à l'identification (Choo et al. 1989) et l'analyse du virus puisqu'ils sont infectables par le sérum de patient ou par des particules VHCcc (Wakita et al. 2005). Souvent, une semaine après l'infection, la virémie devient détectable avec  $10^5$  à  $10^7$  copies de génome / ml. L'infection induit des réponses immunes innées et adaptatives mesurables dans le sang périphérique et le foie. Néanmoins, une infection chronique n'entraine pas le développement de fibrose, de cirrhose, ou de CHC comme chez l'homme (Billerbeck et al. 2013). Le chimpanzé était le modèle d'étude *in vivo* le plus utilisé jusqu'en 2013 date à laquelle la recherche fut limitée dans beaucoup de pays pour des raisons éthiques.

#### Le toupaye

Les toupayes sont des petits rongeurs proches des primates qui peuvent aussi être infectés par le VHC (Xie et al. 1998). Les animaux peuvent être inoculés avec du sérum de patient ou des particules virales produites en culture cellulaire. Cela provoque une hépatite légère avec une virémie intermittente lors de la phase aiguë de l'infection. De plus, des analyses histologiques ont révélé une infection chronique avec stéatose, cirrhose et tumeur du foie (Amako et al. 2010). Bien que ce modèle soit encourageant, le peu de matériel disponible et la difficulté d'élevage en captivité de ces rongeurs sauvages limitent leur utilisation pour la recherche sur le VHC.

#### Les souris génétiquement humanisées

Les souris sont naturellement résistantes au VHC. Ainsi, des souris exprimant les récepteurs humains CD81 et OCLN par inoculation avec des adénovirus recombinants ou par expressions transgéniques ont été rendues permissives à l'entrée du VHC (Dorner et al. 2011). Cependant,

le background génétique de la souris ne permet pas d'obtenir une infection chronique. Seule une faible infectivité est retrouvée lorsque les voies de l'IFN sont bloquées (Dorner et al. 2013).

#### Les souris xénotransplantées

Les souris SCID (« *Severe Combined ImmunoDeficiency* ») sont immunodéficientes et génétiquement modifiées dans le but d'obtenir une dégénérescence des hépatocytes. Une xénogreffe permet de repeupler le foie avec des hépatocytes humains et rend ces souris chimériques susceptibles à l'infection par le virus de manière persistante (Mercer et al. 2001). En revanche, leur immunodéficience entraine une formation tumorale rapide et ne permet pas l'étude de la pathogénèse virale.

# **V-Les interactions ARN-ARN**

L'ARN génomique du VHC est constitué d'une seule molécule qui a la capacité d'être traduite, répliquée et encapsidée. Cette molécule doit donc pouvoir être transloquée entre les différentes étapes du cycle viral. L'ARN viral expose une structure dynamique pouvant changer de conformation afin de présenter différentes régions de son ARN aux protéines virales et cellulaires qui permettront la réalisation du cycle complet. Les régions non traduites en 5' et 3' du brin génomique ainsi que leur équivalent sur le brin négatif, intermédiaire de réplication, sont, entre autres, caractérisées par leurs structures secondaires. Leur étude a largement fait progresser la compréhension des mécanismes impliqués dans la réplication du virus, néanmoins, il est important de rappeler que ces structures sont issues le plus souvent de représentation en deux dimensions, principalement issues d'analyse in vitro de petites molécules. Pour de nombreux virus ARN positif, de plus en plus d'interactions longues distances sont décrites ; ces structures tertiaires remodèlent alors la conformation tridimensionnelle de l'ARN. Un déterminant majeur de l'architecture tertiaire des ARN est la conformation des jonctions situées entre les structures secondaires. En effet, ces dernières peuvent participer à la formation d'interactions longues distances entre les nucléotides libres présents dans les boucles (par des kissing complexes par exemple) ou au niveau de régions simple brin (conduisant à des pseudo-nœuds). Un deuxième déterminant est la formation d'interactions séquences-spécifiques. Enfin, un troisième est la formation d'empilements des plateaux des bases qui requièrent généralement des cations monovalents et divalents pour être stabilisés (Butcher and Pyle 2011).



#### Figure 29 : Hypothèses du rôle des interactions de l'ARN du VHC (Shetty et al. 2013).

(I) Conformation 1 et conformation 2 de l'ARN X co-existantes. (II) Liaison de PCBP2 (cercle orange) au 5'UTR et du PTB (cercle pourpre) au 3'UTR, qui pourrait stabiliser la conformation 1 de l'ARN X. (III) Les interactions IIId avec la boucle interne 5BSL3.2 apportent le 5'UTR à proximité du 3'UTR. (IV) PTB et PCBP2 s'oligomérisent et la liaison de la protéine La pourrait promouvoir la formation d'un pont protéique qui stabiliserait la circularisation du génome du VHC. (V) Lors de la formation de ce pont protéique, la région IIId pourrait être libérée de ses interactions avec la boucle interne de la 5BSL3.2 et peut être liée par le ribosome permettant l'initiation de la traduction. (VI) Avec l'accumulation des protéines virales, PTB et PCBP2 pourraient être clivés par une protéase virale, conduisant à leur perte d'interaction avec la La Protéine et la rupture du pont protéique, ce qui entraîne à son tour la linéarisation du génome du VHC. (VII) L'ARN X en conformation 1 pourrait interagir maintenant avec la boucle apicale de la 5BSL3.2, et Alt avec la boucle interne de la 5BSL3.2, qui pourrait définir une plate-forme de l'initiation de la réplication.

Etant donné que plusieurs structures tertiaires peuvent se produire au sein d'une même région de l'ARN, cela implique une certaine exclusivité pour chaque conformation. Ces dernières pourront alors être reconnues par des protéines, des ligands ou bien d'autres molécules ARN entrainant des événements biochimiques qui impacteront le métabolisme viral. Ainsi, la dynamique perpétuelle des molécules ARN participe au pilotage des fonctions régulatrices du cycle réplicatif du virus. Un exemple schématisé non exhaustif est présenté Figure 29.

Les structures ARN de type Watson-Crick et leurs fonctions connues dans la réplication du VHC seront détaillées dans un premier temps ; ces interactions seront le cœur de la première partie de la thèse. Les structures ARN de type Hoogsteen et leurs rôles dans la réplication des virus seront décrits par la suite ; ces interactions seront au centre de la deuxième partie de la thèse.

# V-1- Structures de type Watson-Crick

### V-1-1- Le brin positif

#### V-1-1-1- Structures secondaires

#### <u>5'UTR</u>

Le 5'UTR du VHC correspond aux 341 premiers nucléotides du génome. Cette région structurée en quatre domaines (I, II, III et IV de 5' en 3') est bien conservée entre les différents sous-types. Les domaines II, III et IV forment l'IRES du génome. Ils sont constitués de tiges-boucles complexes repliées de manière indépendante et reliées entre elles par de courtes séquences. Le domaine I constitue la plus simple et plus petite des tiges-boucles de l'IRES. Sa tige est principalement formée d'interactions G-C. Le domaine II est plus long et contient un bulge interne (IIa) et une boucle apicale (IIb). Le domaine III est le plus complexe de l'IRES avec plusieurs tiges-boucles formant elle-même les sous-domaines IIIa, b, c, d, e et f. La région IIIf forme un pseudo-nœud qui permet une jonction avec le domaine IV et s'apparie en amont avec l'inter-région située entre le domaine II et le domaine III. Le domaine IV porte le codon start AUG et constitue la dernière structure du 5'UTR (Figure 30).

#### <u>3'UTR</u>

Le 3'UTR du VHC est composé par une structure tripartite avec :



**Figure 30 : Représentation des structures secondaires de l'ARN** (Fricke et al 2015). Les deux conformations de la 3'X sont représentées.

- Une région variable d'environ 40 nt suivant immédiatement le codon stop de la polyprotéine et qui pourrait former deux structures en tiges-boucles (Han and Houghton 1992).

- Une région poly-U/UC variant entre 30 et 80 nt en fonction des isolats (Tanaka et al. 1996).
Cette dernière est constituée de séquences répétées d'uridine et de cytidine/uridine.

- Une région très conservée de 98 nucléotides formant la queue 3'X (Tanaka et al. 1995).

Le domaine 3'X est lui-même replié en trois tiges-boucles nommées SL3, SL2 et SL1 (Blight and Rice 1997). Bien que cette configuration soit considérée comme majoritaire, une autre conformation uniquement constituée de deux tiges-boucles a été décrite (Shetty, Stefanovic, and Mihailescu 2013). La SL1 reste identique alors que les SL2 et 3 fusionnent pour ne former qu'une seule structure (Figure 30).

#### <u>Séquence de la protéine Core</u>

La séquence codante pour la protéine Core contient quatre structures secondaires en tigesboucles nommées SL47 (SL-V), SL87 (SL-VI) (Figure 30), SL248 et SL443 (Tuplin, Evans, and Simmonds 2004). Ces structures ont été prédites par bio-informatique puis plusieurs études se sont principalement intéressées à la SL-VI. Ces interactions et leurs rôles seront décrits dans la partie suivante.

#### Séquence de la protéine NS5B

Plusieurs structures secondaires ont été identifiées par bio-informatique dans la région codante pour la NS5B. A l'extrémité 3' les domaines 5BSL1, 5BSL2 et 5BSL3 ont été identifiés (Tuplin et al. 2002). La structure 5BSL3 est particulièrement conservée entre les différents isolats ; elle est constituée de trois tiges-boucles en croix : 5BSL3.1, 5BSL3.2, 5BSL3 (Figure 30). La 5BSL3.2 est une des structures les plus étudiées puisqu'elle est connue comme étant essentielle pour le virus (You et al. 2004). Cette dernière est constituée d'une tige avec une boucle apicale de 12 bases et une boucle interne de 8 bases. Une série de mutants avec une, deux ou trois substitutions a révélé que la plupart des nucléotides situés dans les boucles sont contraints et invariables (You et al. 2004).

#### V-1-1-2- Interactions ARN-ARN longues distances

#### Extrémité 5' du génome

La séquence située entre les nucléotides 24 et 38 du 5'UTR peut s'apparier à une séquence située entre les nucléotides 428 et 442 appartenant à la structure SL-VI de la protéine Core (Kim



**Figure 31 : Représentation des principales interactions ARN-ARN longues distances** (Shetty et al. 2013). Le 5'UTR est représenté en vert, la région codante en rouge et le 3'UTR en violet. Alt représente la séquence 9110 et X55 la SL2.

et al. 2003). L'interaction 5UTR / SL-VI entre en compétition avec la fixation du mir-122 sur l'ARN. En effet, en amont de l'IRES, deux sites de fixation de ce microARN ont été identifiés (Jopling et al. 2005; Jopling, Schütz, and Sarnow 2008). Le premier site inclus au minimum les nucléotides 1 à 3 et 22 à 27, et le deuxième site de fixation les nucléotides 29 à 33 et 38 à 43. Cette situation implique que chacune des interactions décrites ici (5UTR / SL-VI et 5UTR / mir-122) est mutuellement exclusive puisque les séquences impliquées se chevauchent entre la fixation du mir-122 et la SL-VI.

#### La 5BSL3.2

Les structures décrites dans la région codante pour la NS5B, et particulièrement la 5BSL3.2, sont impliquées dans plusieurs interactions longues distances (Figure 31). La 5BSL3.2 expose une séquence de 7 nt dans sa boucle apicale qui s'apparie par « kissing complex » à la boucle de la SL2 du 3'X (Figure31, bleu), formant ainsi une structure en pseudo-nœud (You et al. 2004). Le bulge interne de la 5BSL3.2, quant à lui, présente 6 nt pouvant s'engager dans une interaction avec une séquence située en amont, au niveau des nucléotides 9110 (Figure31, marron) (Diviney et al. 2008), ainsi que dans une interaction avec la boucle IIID de l'IRES (Figure 31, orange) entrainant une circularisation du génome (Romero-López and Berzal-Herranz 2009). Les deux structures impliquant le bulge interne de la 5BSL3.2 sont mutuellement exclusives puisqu'elles impliquent la même séquence (Shetty, Stefanovic, and Mihailescu 2013). En revanche, il est suggéré que les interactions 5BSL3.2 / seq9110 (Figure 31, marron) et 5BSL3.2 / SL2 (Figure 31, bleu) sont indépendantes et peuvent donc être simultanées. Néanmoins, ces analyses sont issues d'expérience in vitro de SPR (Palau et al. 2013) utilisant des molécules en trans ou bien de SHAPE utilisant un réplicon délété du 5'UTR viral (Tuplin et al. 2012). Bien que les deux interactions puissent réellement coexister sur des molécules ne contenant pas l'IRES, la validité de ces résultats n'a pas été vérifiée sur un génome entier structurellement dynamique et pouvant aussi former l'interaction avec la IIID. De plus, l'interaction 5BSL3.2 / IIID aurait un impact sur la structure du 3'X qui présenterait la conformation à deux tiges-boucles plutôt que celle à trois tiges-boucles, exposant ainsi plus facilement la séquence palindromique de la SL2 favorisant la dimérisation (Romero-Lopez et al. 2014).

#### Dimérisation du génome

Au sein du 3'UTR, une séquence palindromique de 16 nt est retrouvée sur la partie 5' de la tige-boucle SL2. Cette séquence est parfaitement conservée parmi tous les isolats viraux. Les premières approches menées in vitro ont montré que les extrémités 3' du VHC étaient capables de dimériser en présence de la protéine Core (Cristofari et al. 2004; Sharma et al. 2012; Shetty, Stefanovic, and Mihailescu 2013). Par la suite, la dynamique de cette dimérisation a été analysée par SPR. Les résultats obtenus indiquent que cette interaction peut se produire en l'absence de la protéine Core (Palau et al. 2013). Enfin, des analyses de structure en présence d'oligonucléotides anti-sens de différentes régions réalisées sur le réplicon incluant la structure 5BSL3 suggèrent l'implication de la séquence palindromique dans la dimérisation du génome (Romero-Lopez et al. 2014). La dimérisation serait initiée par un kissing complex formé dans la partie médiane du palindrome puis cette interaction conduirait à la formation d'un duplex plus stable de 16 nt (Shetty et al. 2010) (Figure 32-A). La structure du 3'X constituée de deux tiges-boucles (Figure 32-B) semblerait plus favorable à la dimérisation que celle constituée de trois tiges-boucles; cependant, il est important de noter que dans chacune des conformations, les nucléotides impliqués dans l'initiation du kissing complex restent disponibles puisque présents dans la boucle ou bien le bulge interne.

#### V-1-1-3- Rôles des interactions ARN

Comme cela vient d'être décrit, les génomes viraux ARN présentent, en plus de leurs séquences codantes, plusieurs niveaux de structuration et de repliements intra ou inter- moléculaires. Ces éléments dynamiques permettent la réalisation de différentes fonctions par le recrutement de facteurs protéiques et d'éléments régulateurs distants. Ainsi, les domaines fonctionnels issus des repliements de l'ARN agissent comme des régulateurs des différentes étapes du cycle viral. Principalement situées dans les régions non traduites, les structures secondaires et les interactions longues distances impliquent aussi des régions codantes, comme la séquence des protéines Core et NS5B par exemple. La plupart de ces repliements ont pu être étudiés par des approches de bio-informatique et des analyses *in vitro* ; cependant, leurs rôles biologiques ne sont pas toujours explicites mais tendent à être de mieux en mieux caractérisés.

Les interactions 5UTR / SL-VI et 5UTR / mir-122 sont exclusives et réguleraient le niveau de traduction. En effet, l'extrémité 5' du génome adopterait deux conformations (Díaz-Toledano et al. 2009) : l'une (5UTR / SL-VI) dite « fermée » (Figure 33, « C ») serait issue d'une interaction



#### Figure 32 : Schéma représentatif la SL2 avec la séquence palindromique en rouge.

- A. Dimérisation de deux SL2 via un kissing complex (Masante, Jaubert et al. 2015)
- B. Conformations à trois ou deux tiges-boucles de la 3'X (Shetty et al. 2013)

entre la région 3' du domaine I et le bas du domaine IV ; l'autre (5UTR / mir-122) dite « ouverte » (Figure 33, « O ») dépendrait de la fixation du mir-122 sur cette même région. La traduction de la polyprotéine virale serait alors dépendante de la conformation du 5'UTR. Cette hypothèse a été confirmée très récemment au laboratoire puisque des expériences utilisant un minigénome ayant ou non la boucle VI montrent que l'interaction entre la boucle VI et l'extrémité 5' du génome affecte la traduction de manière importante (Ventura et al. soumis). De plus, lorsque des substitutions de bases sont effectuées dans les sites de fixation du mir-122, l'ARN viral n'est plus en mesure de produire des virus infectieux dans les cellules transfectées. En revanche, la production virale est restaurée lorsque les cellules sont supplémentées avec des microRNA dont la séquence est complémentaire aux mutants. (Jangra, Yi, and Lemon 2010). Plusieurs hypothèses sur le mécanisme de fonctionnement de ces interactions sont alors proposées. Parmi elles, un rôle dans la stabilité des molécules est suggéré : deux équipes identifient l'intervention du mir-122 comme protégeant l'ARN des dégradations par les exoribonucléases Xrn1 et Xrn2 (Li et al. 2013; Sedano and Sarnow 2014). Les mir-122 permettraient un recrutement de la protéine Argonaute (Ago) 2 sur l'IRES médiant ainsi la stabilité de l'ARN et sa traduction (Conrad et al. 2013). Une autre hypothèse suggère que le mir-122 améliore la traduction en permettant une augmentation de l'association des ribosomes avec l'ARN viral dans la phase précoce d'initiation (Henke et al. 2008).

Pour ce qui est de l'extrémité 3' du génome, la structure 5BSL3.2 est aussi fortement dynamique puisqu'elle est impliquée directement dans au moins trois interactions longues distances : 5BSL3.2 / IIID, 5BSL3.2 / seq9110 et 5BSL3.2 / SL2 (Figure 31).

La circularisation du génome réalisée grâce au contact de la boucle IIID avec la 5BSL3.2 régulerait négativement la traduction (Romero-López and Berzal-Herranz 2012). En effet, lorsque cette structure est présente à l'extrémité 3' d'une molécule portant l'IRES et un gène rapporteur, la traduction de l'ARN diminue en fonction du temps, que le 3'UTR soit présent ou non.

L'interaction 5BSL3.2 / seq9110 est, elle aussi, indispensable à la réplication du virus. Lorsque des mutations sont effectuées pour abolir cette interaction, le titre viral diminue significativement alors qu'il est rétabli lorsque des mutations de compensations sont effectuées (Tuplin et al. 2012). Cela démontre que la structure, plutôt que la séquence, est nécessaire au virus dans ses fonctions de régulation.

Enfin, le repliement formé par la 5BSL3.2 / SL2 semble être indispensable à la réplication de l'ARN. En utilisant le système réplicon et des mutants inhibant la formation de cette interaction,





L'IRES se représenterait sous une conformation fermée 'C' (Close) ou ouverte 'O' (Open).

Friebe et al. montrent son importance dans la réplication de l'ARN (Friebe et al. 2005). Pourtant, deux paramètres ne semblaient pas être considérés à l'époque. Premièrement, les réplicons utilisés contiennent l'IRES du VHC, or, il a été démontré en 2012 que ce dernier, probablement par l'interaction 5BSL3.2 / IIID, influence la structure de la région 3'X du génome (Tuplin et al. 2012). Deuxièmement, l'interaction intermoléculaire réalisée par la SL2 via la séquence de dimérisation, chevauchant la région impliquée dans la 5BSL3.2 / SL2, venait d'être suggérée (Cristofari et al. 2004) et ne semble pas avoir été prise en compte. Il est ainsi imaginable que ces deux données structurales puissent aussi avoir des conséquences sur la réplication de l'ARN.

Roméro-Lopez propose que pendant les phases précoces de l'infection, l'IRES du VHC soit occupé par la machinerie de traduction, bloquant ainsi l'interaction 5BSL3.2 / IIID. L'étape de traduction favoriserait alors l'établissement de l'interaction entre la 5BSL3.2 / SL2 du 3'X, obstruant ainsi la séquence de dimérisation SL2 (Figure 31). Après la traduction virale et/ou après un basculement de structure, l'ensemble de l'extrémité 3' du génome pourrait être le siège de la fixation du complexe de réplication. Dans ce contexte, l'interaction 5BSL3.2 / IIID pourrait contribuer à une inhibition de l'état traductionnel et à l'amélioration du processus réplicatif. De plus, Romero-Lopez démontre que l'interaction avec l'IRES entraine un changement de conformation de la 3'X. Cette dernière adopterait alors une structure à deux tiges-boucles, favorable pour l'exposition de la séquence palindromique et donc à la dimérisation de l'ARN à l'extrémité 3' du génome. Le rôle de cette interaction intermoléculaire restait encore méconnu. Néanmoins, le modèle proposé ci-dessus concernant la dynamique de l'ARN illustre que le changement de conformation et des interactions ARN / protéines pourrait contrôler la commutation entre les différentes étapes du cycle viral et l'évolution de l'infection (Romero-Lopez et al. 2014)

#### V-1-2- Le brin négatif

### V-1-2-1- Structure de l'extrémité 3' du brin négatif

Le brin négatif (-), intermédiaire de réplication, est utilisé comme matrice pour la synthèse de l'ARN génomique. La structure de l'extrémité 3' du brin négatif a été déterminée par deux équipes en 2002 (Schuster et al. 2002; Smith et al. 2002). Le domaine I du brin (-) représenté par les nucléotides 1 à 230 est constitué de cinq tiges-boucles : SL-A1 ou I', nucléotides 5 à





A- les sites de clivages pour les Rnases T2 (carrés), A (triangles), T1 (cercles) sont représentés somme majoritaires (symboles noirs) ou minoritaires (symboles blancs).

B- représentation des réactivités au DMS et CMCT (cercles), sensibilités à la Rnase V1 (triangles), clivages au plomb (carrés). Les nucléotides non réactifs n'ont pas de symboles et les nucléotides dont la réactivité n'est pas déterminée sont encerclés.

20 ; SL-B1 ou IIz', nucléotides 21 à 104 ; SL-C1 ou IIy', nucléotides 107 à 151 ; SL-D1 ou IIIa', nucléotides 156 à 171 ; SL-E1 ou IIIb', nucléotides 177 à 222 (Schuster et al. 2002; Smith et al. 2002 respectivement) (Figure 34). Des comparaisons entre les extrémités 3' (+) et 3' (-) ont été réalisées : la SL1 de la 3'X du brin (+) est comparable à la SL-C1, autant en longueur qu'en stabilité et la SL-E1 partage 60% d'homologie avec la SL2 du brin (+) (Schuster et al. 2002). Le domaine II du brin (-) se replie dans une structure secondaire qui semble plus variable et dépendante de la taille des fragments étudiés.

#### V-1-2-2- Fonction de l'extrémité 3' du brin négatif

L'extrémité 3' du brin (-) joue un rôle analogue à celle du brin (+) pour ce qui est de la réplication de l'ARN puisqu'elles seraient toutes les deux sites d'initiation de la synthèse du brin complémentaire. Ainsi, la NS5B reconnaitrait les extrémités 3' des deux brins d'ARN afin de répliquer le génome entier. Etant donné que les séquences primaires sont différentes entre l'extrémité 3' du brin (+) et celle du brin (-), des motifs structuraux doivent être impliqués dans la reconnaissance spécifique par la polymérase. Néanmoins, relativement peu de recherches se sont consacrées à l'étude du 3' du brin négatif.

Une étude réalisée au laboratoire en 2003 analyse l'effet de plusieurs oligonucléotides complémentaires de différentes régions des 341 premiers nucléotides du 3' (-). Parmi eux, l'ODN7 se fixant sur la séquence 85 à 103 inhibe la synthèse de l'ARN. Plusieurs expériences démontrent que l'ODN7 n'interagit pas avec la RdRp et se fixe bien sur l'ARN matrice au site attendu. De plus, aucun produit de 85 nt (pouvant correspondre à un blocage au niveau de l'ODN) n'est observé. Ces données suggèrent alors que l'ODN7 pourrait affecter des propriétés structurales importantes des régions de l'ARN impliquées dans une initiation efficace de synthèse par la polymérase virale. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus précédemment par Friebe et al. qui définissent le signal minimum de réplication compris entre les nucléotides 84 et 125 du brin (-) (Friebe et al. 2001). Afin de pallier le problème de traduction lorsque l'extrémité 3' du brin (-), donc l'IRES, est modifiée, plusieurs équipes utilisent un réplicon chimérique. L'IRES du VHC, délété du codon initiateur de traduction à la position 341, est fusionné par un spacer à l'IRES du poliovirus. Dans cette construction, l'IRES du poliovirus assure la traduction du gène rapporteur luciférase. Les protéines non-structurales virales sont, quant à elles, sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV. L'utilisation de ces constructions a permis de montrer la nécessité des régions 1 à 44 et/ou 43 à 119 dans la réplication de l'ARN (Kim et al. 2002). Enfin, plus récemment, une autre équipe montre, en utilisant le type de construction décrit précédemment dans des cellules Huh7, que les 157 premiers nucléotides représentent la séquence et/ou structure minimum requise pour initier la réplication de l'ARN (Wang, Jeng, and Lai 2011). En revanche, les auteurs démontrent aussi qu'augmenter la taille de l'extrémité 3' (à 296 ou 341 nucléotides) augmente les capacités de réplication du réplicon.

Ainsi, plusieurs études montrent que les séquences et/ou structures des trois premières tigesboucles SL-A1 (I'), SL-B1 (IIz') et SL-C1 (IIy') sont nécessaires à la réplication de l'ARN et que les séquences situées en aval sont importantes pour une synthèse optimale.

En effet, des travaux réalisés au laboratoire en 2010 montrent l'importance de la tige-boucle SL-EI (région 177 à 222) pour une réplication efficace de l'ARN (Mahias et al. 2010). Des mutations réalisées pour déstabiliser la tige de la SL-EI diminuaient, *in vitro*, la synthèse d'ARN par la polymérase virale. Afin d'évaluer l'impact de ces mutations sur la réplication de l'ARN dans un contexte cellulaire, le système minigénome a été exploité (Dumas et al. 2007b). Ce modèle utilise des cellules Huh7 hébergeant le réplicon ; elles expriment ainsi de manière constitutive les protéines non structurales. Ainsi, la traduction du complexe de réplication est indépendante du minigénome rapporteur de réplication portant les séquences UTR du VHC. Ce système a permis de montrer que déstructurer la SL-EI réduit de 8 fois la synthèse de l'ARN alors que des mutations de compensation restaurent la réplication à un niveau proche du WT.

Les données obtenues sur l'extrémité 3' du brin (-) restent à être précisées puisque les régions, identifiées comme nécessaires à la réplication de l'ARN, varient en fonction des études. Il est alors envisageable qu'une dynamique structurale de la molécule soit impliquée dans l'initiation de la synthèse d'ARN par la polymérase virale, comme cela semble être le cas pour l'extrémité 3' du brin positif. De manière surprenante, ce type de repliement plus complexe de l'ARN ne semble pas avoir été identifié aujourd'hui au niveau du 3' du brin négatif. Peut-être qu'une des limites à ces avancées tient dans le fait que la plupart des hypothèses structurales formées *in silico* se basent quasi-exclusivement sur des interactions de type Watson-Crick. Il existe pourtant au sein des molécules d'ARN des appariements non-canoniques de type Hoogsteen par exemple, pouvant conduire à la formation de structures menant à des conformations telles que les G-quadruplexes.

## V-2- Structures de type Hoogsteen

#### V-2-1- Structure des G-quadruplexes

Il y a plus d'un siècle, en 1910, Ivor Bang montre la capacité de la guanosine monophosphate (GMP) à former un gel visqueux en solution aqueuse (Lagnado 2013). Cinquante ans plus tard, la diffraction par rayons X montre clairement que chaque résidu de guanine agit comme accepteur et donneur de deux liaisons hydrogènes et forme ainsi une organisation tétramérique (Gellert, Lipsett, and Davies 1962). Ainsi, un quartet de G se fait par des appariements de type Hoogsteen entre quatre G situés dans un même plan (Figure 35-A). Contrairement aux liaisons canoniques de Watson-Crick, les ponts hydrogènes de Hoogsteen impliquent le groupe N7 d'une guanine et le groupe amino en position 6. Cette structure est stabilisée par la présence d'un cation monovalent au centre de la tétrade dans l'ordre suivant :  $K^+ > Na^+ > Li^+$  (Burge et al. 2006).

Les séquences d'acides nucléiques contenant des blocs de guanine peuvent former des Gquadruplexes (G4). Un quadruplex est l'empilement d'au moins deux quartets (Figure 35-B). Les G4 exposent des topologies diverses qui dépendent : de l'acide nucléique, du cation monovalent (K+ ou Na+), du nombre de molécules impliquées dans la structure (intramoléculaire, bimoléculaire, tetramoléculaire), de l'orientation relative des brins (parallèle ou antiparallèle), du nombre de quartet de G assemblés et de la séquence nucléotidique. Une quantité considérable de travaux a été effectuée au niveau des G4 ADN alors que l'intérêt et la recherche sur les G4 ARN est plus récente. Toutefois, deux caractéristiques structurales propres aux quadruplexes ARN ont pu être identifiées : l'orientation des brins semble être exclusivement parallèle, au moins sur des structures intramoléculaires ; leur stabilité est plus importante que les G4 ADN (Bugaut and Balasubramanian 2012). Une explication de la deuxième propriété est illustrée par une étude cristallographique de G4 intermoléculaires (Collie et al. 2010) ; le groupement hydroxyle en position 2 du ribose serait impliqué dans des liaisons hydrogènes avec des atomes du quartet adjacent (Figure 35-C).

### V-2-2- Rôle des G-quadruplexes

#### V-2-2-1- Fonctions dans le génome humain

Il y aurait plus de 370 000 séquences pouvant former des G4 ADN dans le génome humain. La localisation de ces potentiels G quadruplexes ne semble pas répartie aléatoirement puisqu'ils



**Figure 35 : Représentation schématique d'un G-quadruplexe** (Bugaut and Balasubramanian 2012). A : Quartet de G. B : G-quadruplexe. C : liaisons hydrogènes intermoléculaires entre le ribose C2' et l'oxygène O4' de quartets ARN.

colocalisent avec des régions fonctionnelles du génome (Rhodes and Lipps 2015). En effet, alors que les premières études se focalisaient sur les télomères, les G4 sont aussi retrouvés enrichis dans les promoteurs des proto-oncogènes, dans les séquences codant pour les chaines lourdes des immunoglobulines et les hots spots de mutations. Au niveau des télomères, les G4 induiraient plusieurs fonctions telles que : le maintien de leur intégrité, l'alignement des chromosomes et le contrôle de l'élongation par l'action de la télomérase (Rhodes and Lipps 2015) (Figure 36). De manière plus générale, les G4 sont impliqués dans l'intégrité chromosomique et la régulation de la réplication, transcription et recombinaison (Simonsson 2001).

L'étude plus récente des G4 ARN a pu rapporter leur présence dans les ARN messagers (ARNm), les longs ARN non-codants et les extrémités non traduites. Ils entrainent alors la formation de structures secondaires et sont associés à la régulation de la traduction, le *processing* en extrémité 3', la terminaison de la transcription, l'épissage alternatif, la localisation des ARNm ou encore le recrutement de protéines (Figure 37) (Agarwala, Pandey, and Maiti 2015).

De manière intéressante, les quadruplexes sont aussi retrouvés dans le génome de plusieurs virus et remplissent des fonctions essentielles à la réplication du cycle viral. Mise à part des rétrovirus et très récemment des virus Zika où des G4 sont identifiés sur l'ARN, la plupart des recherches apportent des informations sur les virus ADN.

#### V-2-2-2- Exemples de G-quadruplexes dans les virus

#### Simian virus 40 (SV40)

Le génome du SV40 est un ADN double brin circulaire qui inclut une région non codante régulatrice (NCRR). Cette dernière contient l'origine de réplication, les séquences d'encapsidation et elle contrôle les phases précoces et tardives de la transcription. L'hélicase large T-antigène (TAg) du SV40 fut identifiée comme ayant la capacité de déstructurer les G-quadruplexes de séquences ADN en 1997 (Baran et al. 1997). Ce n'est que par la suite que des séquences pouvant former des G-quadruplexes ont été identifiées dans la NCRR (Patel, Bhavesh, and Hosur 2000). Les G4 pourraient avoir un rôle dans la réplication puisqu'ils sont un motif de liaison pour le facteur de transcription cellulaire SP1. Bien que plus récemment, des molécules stabilisant les G-quadruplexes et inhibant l'activité G4-hélicase du TAg soient disponibles (Tuesuwan et al. 2008), le rôle spécifique de ces structures dans le cycle viral reste à démontrer.

A Protection of telomeres



Figure 36 : Rôles des G-quadruplexes aux télomères (Rhodes and Lipps 2015).

Les G-quadruplexes intramoléculaires protègent les télomères des nucléases (A), les G-quadruplexes intermoléculaires permettent l'alignement des télomères (B). Stabiliser les G4 par des ligands affecte l'activité de la télomérase (C).



**Figure 37 : Fonctions de G-quadruplexes localisés dans différentes régions des pre-mRNA** (Agarwala et al. 2015).

#### Papillomavirus humain (HPV)

Le génome du HPV est un ADN double brin circulaire qui porte plusieurs loci riches en G et pouvant former des G4 (Tlučková et al. 2013). Ces derniers pourraient aussi être impliqués dans le cycle viral puisque l'hélicase E1 du HPV ressemble au TAg du SV40 et pourrait dérouler les G4. De plus les G4 sont retrouvés dans les régions régulatrices de la transcription et de la traduction, ainsi que dans les séquences codantes pour différentes protéines virales, suggérant leur implication dans l'épissage alternatif. Néanmoins, la capacité des séquences à former des G4 a été identifiée *in vitro* par des approches de biophysique (Tlučková et al. 2013) mais leur importance dans la biologie du virus est indéterminée.

#### Herpes Simplex virus-1 (HSV1)

Le génome du HSV1 est un ADN double brin linéaire qui contient plusieurs séquences répétées formant de stables G-quadruplexes. BRACO-19 est un ligand conçu pour stabiliser les G4 formés dans les télomères humains (Read et al. 2001). Ce ligand est aussi utilisé comme outil pour identifier et bloquer de nombreux G4. Une étude confirme la présence de G-quadruplexes dans le génome du HSV1 en montrant que BRACO-19 est bien capable de se fixer et de stabiliser ces structures. De plus, le ligand inhibe l'activité de la polymérase et la réplication de l'ADN viral ainsi que la production de virus dans des cellules infectées (Artusi et al. 2015).

#### Herpes Virus Humain-8 (HHV8)

Le HHV8, également appelé Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV), est constitué d'un génome ADN double brin. La région terminale répétée du HHV8 contient l'origine de réplication de l'ADN latent du virus, elle est essentielle pour le maintien de l'épisome viral dans les cellules proliférantes. Cette région du génome a été identifiée comme portant de nombreuses séquences pouvant former des G-quadruplexes *in silico* (Madireddy et al. 2016). Certains d'entre eux ont été confirmés par des expériences de biophysique. L'utilisation de ligands de G4 tels que PhenDC3 et TMPyP4, stabilisent ces structures et interfèrent avec la réplication de l'ADN viral en obstruant le mouvement des fourches de réplication.

#### Virus d'Epstein-Barr (EBV)

L'EBV est constitué d'un ADN double brin linéaire. Ce dernier code pour une protéine de maintenance du génome (nuclear antigen 1, EBNA1) qui lie des séquences riches en G pouvant

former des G-quadruplexes. La région portant ces structures se situe au niveau de l'origine de réplication virale, recrute le complexe de réplication et est impliquée dans l'attachement des chromosomes à la métaphase afin d'assurer la maintenance au cours de la méiose (Norseen, Johnson, and Lieberman 2009). L'utilisation du ligand de G4 BRACO-19 inhibe la réplication de l'ADN viral et bloque la prolifération uniquement des cellules infectées par le virus (Norseen, Johnson, and Lieberman 2009). Des G-quadruplexes sont aussi identifiés sur l'ARNm de la protéine EBNA1 (Murat et al. 2014). Lorsque ces G4 sont déstabilisés via des oligonucléotides antisens, la traduction de la protéine augmente alors qu'elle diminue avec la stabilisation des G4 par des ligands. Ces résultats révèlent l'importance des structures formées par les G-quadruplexes comme des éléments régulateurs critiques du cycle viral (Murat et al. 2014).

#### Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1)

Le VIH-1 est un rétrovirus possédant un génome constitué de deux molécules ARN qui seront converties en ADN. La présence de G4 a été identifiée aux niveaux ADN et ARN et est impliquée dans le cycle viral pour au moins 4 étapes distinctes (Métifiot et al. 2014) :

- Une structure en G4 bi-moléculaire se forme dans la région *gag*, proche de la séquence de dimérisation (Sundquist and Heaphy 1993). Ce G4 serait impliqué dans la dimérisation du génome. Par ailleurs il est localisé sur un hot spot de recombinaison et faciliterait le taux de saut de brin (Shen, Gorelick, and Bambara 2011).

Les protéines de la nucléocapside (NCp) pourraient se lier aux structures G4 (Lyonnais et al.
2003) et avoir une activité chaperonne sur la formation des quadruplexes.

- La région promotrice du VIH-1 U3 contient une séquence riche en G formant des quadruplexes (De Nicola et al. 2016). La protéine SP1 pourrait se lier sur ces structures. Néanmoins, lorsque le G4 est muté, l'activité promotrice est plus élevée que sur une région sauvage, indiquant une régulation de l'activité transcriptionnelle du VIH-1 (Piekna-Przybylska et al. 2014).

- Un G4 a aussi été identifié sur le cadre de lecture du facteur de régulation négative (Nef). La stabilisation de ce quadruplex réprime l'expression de Nef et diminue la réplication virale (Perrone et al. 2013). Le G4 joue donc également sur la régulation de la traduction des protéines du VIH-1.

#### <u>Le virus zika (ZIKV)</u>

Le ZIKV appartient à la famille des flavivirus, son génome est constitué d'une molécule ARN simple brin et de polarité positive séquencée pour la première fois en 2007 (Kuno and Chang 2007). Une analyse *in silico* permettant la prédiction de G-quadruplexes identifie plusieurs séquences pouvant former des G4 au niveau de la région codante ainsi qu'à l'extrémité 3' non traduite (Fleming et al. 2016) (Figure 38). Les séquences d'intérêts ont été transcrites et soumises à des tests de biophysique permettant de confirmer que les séquences présentes sur les protéines non structurales NS3 (Protéase Hélicase) et NS5 (ARN-polymérase ARN-dépendante) ainsi que sur la région non traduite de l'extrémité 3' pourraient former ces structures *in vitro*. Malgré l'intérêt récent porté sur ce virus, le manque de modèles d'études ne permet pas encore d'analyser le rôle de ces G4 dans le cycle viral.



**Figure 38 : Représentation schématiques des G4 potentiels identifiés** *in silico* **sur le génome du Zika virus** (Fleming et al. 2016).

# **OBJECTIFS DE L'ETUDE**

# **Objectifs de l'étude**

Les interactions ARN-ARN ainsi que leurs dynamiques semblent prendre une place essentielle dans la régulation des différentes étapes du cycle viral. En effet, une même molécule génomique est en capacité d'être traduite, répliquée et encapsidée. La commutation entre ces trois processus doit être contrôlée afin de permettre une infection productive. Identifier les structures de l'ARN et en analyser leurs rôles sont deux étapes essentielles à la compréhension de la biologie du virus.

Les mécanismes de la réplication du génome viral sont au centre des études du laboratoire.

La synthèse de l'ARN viral est réalisée par l'ARN-polymérase ARN-dépendante (NS5B) codée par le virus. Elle serait initiée à l'extrémité 3' des molécules à répliquer. Un ARN génomique complémentaire de polarité négative sera d'abord synthétisé comme intermédiaire de réplication. Il servira ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins positifs. Aujourd'hui, les mécanismes d'initiation de la polymérase restent mal connus. Bien qu'il soit très probable que les structures de l'ARN retrouvées aux extrémités 3' des molécules soient largement impliquées, des sites de fixation de l'enzyme ne sont pas clairement identifiés.

L'objectif de cette thèse consistait à caractériser des conformations prises par l'ARN au niveau des extrémités 3' du brin positif et du brin négatif ainsi qu'à analyser leurs rôles potentiels dans les étapes du cycle viral.

La dimérisation de petites molécules mimant l'extrémité 3' de l'ARN génomique a été montrée *in* vitro par plusieurs travaux dont ceux du laboratoire. Le 3' du brin positif est composée de 98 nt invariants qui sont repliés en 3 tiges boucles (SL) : SL1, SL2, SL3. Une séquence palindromique de 16 nucléotides située en 5' de la SL2 est responsable de la dimérisation. Malgré la grande variabilité génomique du VHC, la séquence palindromique est conservée dans tous les isolats, suggérant l'importance de cette région dans la réplication du VHC. Pour autant, le rôle biologique d'une dimérisation génomique et son implication dans la réplication du virus n'était jusqu'alors pas connu.

La première partie de ce travail a donc consisté à vérifier que ces résultats obtenus *in vitro* sur de petites molécules présageaient d'une réalité biologique. Grâce à des approches biophysiques, enzymatiques et cellulaire ainsi que par des observations en microscopie électronique, les

phénomènes de dimérisation de l'ARN génomique à l'extrémité 3' du brin (+) et leurs rôles dans la biologie du virus ont été analysés.

Partant de l'hypothèse que les mécanismes utilisées par la polymérase virale pourraient être similaires sur le brin (+) et sur le brin (-), la problématique décrit précédemment a été transposée à l'extrémité 3' du brin (-). Dans la seconde partie de cette thèse les approches destinées à éclairer le rôle des structures et de leur dynamique conformationnelle présentes à l'extrémité 3' du brin (-) seront décrites, principalement au niveau de la synthèse de l'ARN.

# MATERIELS ET METHODES

# Matériels et Méthodes

# I- Matériels

# I-1- Oligonucléotides / Synthèse de gène

Les oligonucléotides et les gènes synthétiques ont été obtenus chez Eurofins MWG Operon. Leurs séquences et fonction sont répertoriées dans le tableau 1.

# I-2- Oligonucléotides couplés aux billes d'or

Les billes d'or de 10 nm fonctionnalisées par un Polyéthylène Glycol (PEG) - maléimide ont été synthétisées par Stéphane Mornet (Institut de Chimie de la Matière condensée de Bordeaux-UPR9048 CNRS).

# **I-3- Plasmides**

## *I-3-1- LMTV*

Le virus a été construit à partir du squelette du virus JFH-1. Cent douze mutations ont été introduites sur le 3ème nucléotide de certains codons de E1 et E2 et un site de clonage dans NS5A constitué de 18 nt a été créé en position 7523 (LMTV: Genbank HG948568). Le virus LMTV-GLuc est dérivé du virus LMTV par insertion du gène codant pour la Gluc entre p7 et NS2 (LMTV-GLuc).

# I-3-2- Minigénome

Les minigénomes sont constitués par les régions non traduites du virus (5'UTR et 3'UTR) qui encadrent un gène rapporteur constitue par l'Hygromycine phosphotransférase, l'autoprotéase 2A du FMFV et de l'EGFP (H2AE) (Dumas et al. 2007) L'extrémité 3' de la région codant pour la NS5B portant la structure 5BSL3.2 a été insérée entre le codon de l'EGFP et le 3'UTR.

Fonction	Nom	Séquence 5'-3'
RT-qPCR	eGFP-S	GACCACATGAAGCAGCACGA
	eGFP-AS	GACGTTGTGGCTGTTGTAGT
	NS3-S	AAGTCTTTGGAGCCGTGCAA
	NS3-AS	TGTCTCAACGGGGATGAAAT
	SFRS4-S	AAAAGTCGGAGCAGGAGTCA
	SFRS4-AS	CTCTTCCTGCCCTTCCTCTT
Antisens	SL2-14	GGCTCACGGACCTT
	ODN7	ATGGCGTTAGTATGAGTGT
	ODN4	GCGTTAGTATGAGT
Mutagénèse dirigée	5BSL3.2-S	GACATATAAAGGAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCC
	5BSL3.2-AS	AGACAGGCTCCTTTATATGTCTCCCCCGCTGTAACC
	SL2 rest-S	GCTAGCTCCTTAAGGTCCGTGAGCCGCTTGACTG
	SL2 rest-AS	TCACGGACCTTAAGGAGCTAGCCGTGACTAGGGC
		GCGCGCTAGAACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCAT
Synthèse de gène pour clonage	Kistem	CCTG(T)7CCC(T)9-13C(T)30-
		38CTCC(T)9CCTC(T)7CCTTTTCTTTCCTTTGGTGGCTCCATCTTAGC
		CCTAGTCACGGACCAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCTTGACTG
		CAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGTGCATGC
	TD	GCGCGCTAGAACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCAT
		CCTG(T)7CCC(T)9-13C(T)30-
		38CTCC(T)9CCTC(T)7CCTTTTCTTTCCTTTGGTGGCTCCATCTTAGC
		CCTAGTGTGCCATCGCTGTGAAAGGTGGCACAGCCGCTTGACTGC
		AGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGTGCATGC
	SLB1	GCAGCCTCCAGGACCCCCCCCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
Synthèse de	SEDT	GGAACCCCTATAGTGAGTCGTATTA
gène pour ARN		ACTTGATCTGCAGAGAGGCCAGTATCAGCACTCTCTGCAGTCAAG
8 F	3'X	CGGCTCACGGACCTTTCACAGCTAGCCGTGACTAGGGCTAAGATG
		GAGCCACCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Matrices	miniG-17	TAATACGACTCACTATAGGGCCAGCCCCCGATTGGGGGGGG
minigenome	miniG-stop	
Matrices 555	555-17	
(5BSL3.2)	555-stop	
Matrices Con1	Con1 366-17	
	Con1 208-17	
	Con1 157-17	
	Con1-stop	
Matrices J4L6	J4L6 366-17	
	J4L6 208-17	
	J4L6 15/-1/	
	J4L6-stop	
Matrices JFH1	JFH1 366-17	
	JFH1 208-17	
	JFHI 157-17	
	JFH1-stop	
Matrices H77	H// 366-1/	
	H//208-1/	
	H// 15/-1/	
	H77 DelG4-T7	GAAAAAAATCCTCCAGGCTGCACG
	H77-stop	GCCAGCCCCTGATGGGGGGGGACAC
	H77 DelB1-stop	GCCAGCCCCTGATGGGGGGCGCGTGCAGCCTCC
	H77 polyA-stop	TTTTTTTTTTTTTTTTGCCAGCCCCTGATGGGGGGGGACAC
Amorce RT	Primer Cy5	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCC
Amorce T7	pT7	CCTATAGTGACTCGTATTA

**Tableau 1 : Amorces et synthèses de gènes utilisées lors de l'étude**.En rouge sont représentées les séquences impliquées dans le promoteur T7 permettant la transcription *in* vitro

# I-4- Polymérases virales

Les polymérases NS5B des souches H77, Con1, JFH1 et J4L6 ont été produites et purifiées au laboratoire (Astier-Gin et al. 2005).

# **I-5- Bactéries**

Pour les clonages et l'amplification des plasmides, la souche Escherichia coli DH5 $\alpha$  déficiente pour la recombinaison suite à une mutation du gène RecA a été utilisée. Son génotype est le suivant : supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi-1 relA1 deoR  $\Delta$ lacU169 [ $\Phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15].

# **I-6-** Cellules humaines

#### I-6-1- Huh7

Les cellules Huh7 sont des cellules adhérentes issues d'un carcinome hépatocellulaire humain (Nakabayashi, Taketa et al. 1982). Les cellules Huh7/QR ont été obtenues au laboratoire en traitant des cellules Huh7/Rep5.1 deux fois pendant trois semaines avec 150 U/mL d'IFNα2b en absence de G418. La disparition du réplicon a été vérifiée par RT-PCR et par la sensibilité au G418.

### I-6-2- Huh7/Rep5.1

Les cellules Huh7/Rep5.1 ont été obtenues par transfection de cellules Huh7 avec l'ARN du réplicon Con1 (Lohmann et al. 1999). Les clones résistants ont été sélectionnés pendant trois semaines sous pression de sélection à 500 µg/mL de G418. La présence du réplicon a été vérifiée par RT-PCR, par Northern Blot avec une sonde couvrant la région NS3-NS5B, ou par Western-Blot en utilisant un anticorps polyclonal de lapin contre la protéine NS5B.

# **II- Méthodes**

# **II-1- Culture bactérienne**

#### **II-1-1- Préparation bactéries chimio-compétentes**

Une colonie de bactérie DH5 $\alpha$  est mise en culture dans 5 ml de LB à 37°C sous agitation pendant la nuit. Le lendemain, 5 ml de culture sont inoculés dans 200 ml de LB et les bactéries sont cultivées à 37°C jusqu'à DO à 550 nm = 0,5. Toutes les étapes suivantes sont réalisées dans la glace. La culture est répartie dans 4 tubes de 50 ml froid et incubée 15 min dans la glace avant d'être centrifugée 5 min, 3000g à 4°C. Les culots sont repris dans 4 ml de Tampon 1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O, 30 mM acétate de potassium, 10 mM CaCl<sup>2</sup>, 15% glycérol, pH=5,8) puis les suspensions sont regroupées. Après une incubation de 15 min dans la glace et une centrifugation de 5 min, 3000 g à 4°C, le culot est repris dans 16 ml de Tampon 2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycérol, pH=6,8) puis incubé 10 min dans la glace avant d'être aliquoté dans des tubes préalablement refroidis. Les bactéries compétentes sont testées par transformation de 100 pg de plasmide natif.

#### **II-1-2-** Transformation des bactéries chimio-compétentes

Après décongélation dans la glace, 200  $\mu$ L de bactéries DH5 $\alpha$  compétentes sont incubées avec 10  $\mu$ l d'ADN plasmidique pendant 20 minutes à 4°C. Les bactéries sont agitées doucement à trois ou quatre reprises. Cette incubation est suivie d'un choc thermique de 90 secondes à 42°C puis 2 minutes à 4°C. Les bactéries transformées, supplémentées de 800  $\mu$ L de LB, sont alors incubées 40 minutes sous agitation rotative à 37°C. Elles sont ensuite collectées par centrifugation 30 secondes à 10 000 g, étalées sur boîte LB additionnée de l'antibiotique adéquat puis placées dans une étuve à 37°C durant la nuit.

# II-2- Préparation des acides nucléiques

### **II-2-1-** Purification des préparations d'ADN

De l'eau DEPC est ajoutées aux préparations d'ADN afin d'obtenir un volume final de 200  $\mu$ l. Un volume équivalent de phénol pH = 8 est ajouté puis les tubes sont vortexés pendant 30 secondes avant une centrifugation de 2 min à 14000 g. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube puis 200  $\mu$ l de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont vortexés pendant 30 secondes avant une centrifugation de 2 min à 14000 g. La phase aqueuse est à nouveau extraite et précipitée avec 2,5 volumes d'éthanol 100 % en présence de 20  $\mu$ l de NaCl 4 M pendant la nuit à -20°C.

Les précipités sont ensuite centrifugés à 14000 g et 4°C pendant 30 minutes puis lavés avec 600  $\mu$ l d'éthanol 70 % par centrifugation à 14000 g et 4°C pendant 20 minutes. Les culots sont séchés sous vide et repris dans de l'eau DEPC.

#### II-2-2- Clonage

Les mutations dans la tige-boucle SL2 de l'extrémité 3' du brin positif (Kistem et TD) ont été obtenues par synthèse de gène. Les oligonucléotides ont été clonés dans le vecteur pUC/LMTV-Gluc entre les sites EcoRV et XbaI et dans le vecteur pGEM-T/5UTR-H2AE-5BSL-3UTR entre les sites BssHII et SpHI. Après 2h de clivage, les produits sont séparés sur un gel d'agarose 1 % (25 min à 100 V). Les bandes d'intérêts (correspondant au vecteur ou à l'insert) sont excisées du gel puis purifiées avec le kit d'extraction de Qiagen (QIAquick® Gel Extraction Kit). La ligation entre le vecteur et l'insert se fait à un ratio 3 : 1 respectivement avec la T4 DNA Ligase (Promega) pendant une nuit à 16°C. Les produits de la ligation sont ensuite transformés dans *E. coli* DH5 $\alpha$  chimio-compétente par choc thermique. Après culture des bactéries et extraction de l'ADN plasmidique avec le kit NucleoBond® Xtra Midi (Machery-Nagel), ce dernier est séquencé pour vérifier la présence des mutations.

#### II-2-3- Mutagénèse dirigée

Les mutations des boucles apicales 5BSL3.2 et SL2 ont été obtenues par mutagénèse dirigée en remplaçant la séquence TCAC par AAAG dans la 5BSL3.2, et GTGA par CCTT dans la SL2 du vecteur pGEM-T/5UTR-H2AE-5BSL-3UTR.

Pour ce faire, 10 ng d'ADN ont été amplifiés par PCR dans un volume final de 50 µl constitué par : le Phusion Buffer HF (1X), du MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), du DMSO (5%), des dNTP (0,5 mM), les amorces start et stop (tableau 1) (1 pmole), la Taq Phusion (Thermo Scientific Phusion Hot Start II DNA Polymerase) (1 U). Les conditions d'amplification PCR sont : 30 s à 98°C suivi de 38 cycles de 20 s à 95°C, 30 s à 72 °C, 3 min à 72°C puis 1 cycle de 10 min à 72°C. La dégradation de l'ADN matrice se fait par traitement avec l'enzyme Dpn1 (10 U) puis les
produits sont transformés dans *E. coli* DH5α chimio-compétentes par choc thermique. Après culture des bactéries et extraction de l'ADN plasmidique avec le kit NucleoBond® Xtra Midi (Machery-Nagel), ce dernier est séquencé pour vérifier la présence des mutations.

### II-2-4- Préparation des ADN pour la transcription in vitro

### II-2-4-1- LMTV

Les plasmides portant le LMTV conservés dans du TE 1X sont clivés par l'enzyme Xba1 dans son tampon et en présence de 2 mM de MgCl2 pendant 2h à 37°C. Les ADN sont alors purifiés par un traitement au phénol puis au chloroforme et enfin précipités par trois volumes d'éthanol.

### II-2-4-2- Minigénomes, 555 derniers nucléotides du brin positif, matrices du brin négatif

Les plasmides portants les minigénomes sauvages et mutés pour l'étude du brin positif et ceux portant les minigénomes des souches H77, J4L6, Con1 et JFH1 sont soumis à une amplification par PCR. Les amorces utilisées, dont l'une contenant la séquence promotrice de la polymérase T7, sont présentés dans le tableau 1.

Dans un volume final de 50  $\mu$ L, 10 ng de plasmides sont ajoutés à 10  $\mu$ L de « Phusion Buffer 5X», 1  $\mu$ L de chaque NTP à 25 mM, 50 pmol de chaque amorce, 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 2,5  $\mu$ L de DMSO et 0,5  $\mu$ L d'enzyme (1 U). La PCR débute par une activation de la Taq 30 secondes à 98°C suivie par 42 cycles constitués par 20 secondes de dénaturation à 95°C et 2 minutes d'hybridation/élongation à 72°C. Enfin une élongation finale de 10 minutes à 72°C est réalisée.

Pour vérifier la taille des produits de PCR, 2  $\mu$ L sont déposés sur un gel d'agarose 1%. La migration est effectuée dans du TAE (40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA) pendant 20 minutes puis le gel est incubé dans du bromure d'éthidium. Les amplicons sont visualisés sous UV. Les produits PCR sont ensuite purifiés sur colonne MicroSpinTM S400 HR (GE Healthcare – Amersham). La colonne est préalablement centrifugée 1 minute à 735 g puis entre 50 et 100  $\mu$ L des produits PCR y sont déposés. La colonne est centrifugée 2 minutes à 735 g dans un tube eppendorf afin de débarrasser les produits de PCR des nucléotides et des amorces. L'ADN est alors purifié.

### II-2-5- Préparation des ARN in vitro

### II-2-5-1- Transcription

Les ADN obtenus par PCR ou restriction (LMTV) incluent en 5' la séquence du promoteur T7 nécessaire à la transcription du brin d'ARN souhaité. Cette dernière est réalisée avec le kit MEGAscript (Ambion) dans un volume final de 20  $\mu$ l à partir de 1,5  $\mu$ g d'ADN auxquels sont ajoutés 2  $\mu$ l de chaque ribonucléotide (ATP, GTP, CTP, UTP) à 75 mM initial, 2  $\mu$ L de tampon de transcription 10 X et 2  $\mu$ L d'enzyme T7. La transcription est réalisée à 37°C pendant 4 heures. Les matrices ADN sont ensuite dégradées grâce à 2 unités de la turbo DNAse pendant 20 minutes à 37°C.

Lorsque les ARN sont transcrits radioactivement au  $P^{32}$ , le protocole est identique à la différence que l'UTP est remplacé par 1,5 µl d'UTP- $\alpha P^{32}$  (3000 Ci/mmol) et 0.5 µl d'UTP froid à 75mM.

Les ADN obtenus par synthèse de gène correspondent au brin complémentaire du brin souhaité en ARN et incluent en 3' la séquence complémentaire du promoteur pT7 (tableau 1). Ainsi, 1  $\mu$ g d'ADN et quatre fois plus de promoteur portable pT7 sont incubés avec les 2  $\mu$ l de tampon de transcription 10 X dans un volume complété à 8  $\mu$ l avec de l'eau DEPC pendant 1 min à 95°C puis la température diminue à 30°C en 30 minutes. Par la suite, les nucléotides et l'enzyme sont rajoutés et la transcription redevient similaire à la description précédente.

### II-2-5-2- Précipitation et lavage des ARN

De l'eau DEPC (115  $\mu$ l) et 15  $\mu$ l d'une solution acétate d'ammonium 5 M, EDTA 100 mM sont ajoutés aux 21  $\mu$ l d'ARN transcrits. Les échantillons sont mélangés puis 150  $\mu$ l de phénol acide pH 5 est ajouté. Les tubes sont vortexés pendant 30 secondes avant une centrifugation de 2 min à 14000 g. La phase aqueuse est transvasée dans un nouveau tube et 150  $\mu$ l de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont vortexés pendant 30 secondes avant une centrifugation de 2 min à 14000 g. La phase aqueuse est à nouveau extraite et précipitée avec 1 volume d'isopropanol pendant la nuit à -80°C.

Les ARN précipités sont ensuite centrifugés à 14000 g et 4°C pendant 30 minutes puis lavés avec 600 µl d'éthanol 70 % par centrifugation à 14000 g et 4°C pendant 20 minutes. Les culots sont séchés sous vide, repris dans de l'eau DEPC et conservés à -80°C.

### II-2-5-3- Contrôle de l'intégrité des ARN

La concentration des ARN transcrits est mesurée au nanodrop. Leur intégrité et leur taille sont vérifiées sur puce (RNA Nano 6000) par électrophorèse capillaire (Agilent 2100 bioanalyseur).

### II-2-5-4- Marquage des ARN en 5' par de l'ATP- $\gamma P^{32}$

Dans un premier temps, 10 pmoles d'ARN sont déphosphorylées avec 5  $\mu$ l de phosphatase Alkaline (Roche) et 4  $\mu$ l de tampon 10 X (0.5 mM Tris pH 8,5 ; 1 mM EDTA) dans un volume final de 40  $\mu$ l pendant 1h à 50°C. L'enzyme est inactivée lors d'un traitement des échantillons à 70°C pendant 10 min. Par la suite, 10  $\mu$ l d'ARN déphosphorylés sont traités avec la T4 polynucléotide kinase (Proméga) en présence de 2  $\mu$ l d'ATP $\gamma$ P<sup>32</sup> pendant 1h à 37°C. L'enzyme est inactivé en incubant les échantillons 10 min à 65°C.

Les échantillons sont ensuite purifiés sur colonne G25 (Microspin G25 -GE Healthcare – Amersham) et conservés à -20°C.

### II-2-5-5- Biotinylation des ARN au niveau de l'extrémité 5'

La biotinylation de l'ARN en 5' s'effectue à l'aide du kit « 5' EndTag Nucleic Acid Labeling System » de la compagnie Vector Laboratories. Huit microlitre d'ARN sont incubés dans un volume final de 10 µl contenant 1 µl du tampon fourni et 1 µl de phosphatase alkaline pendant 30 minutes à 37°C. En suivant, 2 µl de tampon, 1 µl d'ATP- $\gamma$ S, 2 µl de polynucléotide kinase et 5 µl d'eau sont ajoutés et incubés 30 minutes à 37°C. Deux à cinq µl de biotine-maléimide sont ajoutés avant une nouvelle incubation de 30 minutes à 65°C.

Les ARN marqués sont ensuite purifiés par un traitement par un volume de phénol pH 8 puis précipités en présence de 5 µl de précipitant (fourni par le kit) et deux volumes d'éthanol 100 %.

Les ARN précipités sont ensuite centrifugés à 14000 g et 4°C pendant 30 minutes puis lavés avec 600 µl d'éthanol 70 % par centrifugation à 14000 g et 4°C pendant 20 minutes. Les culots sont séchés sous vide, repris dans de l'eau DEPC et conservés à -80°C.

### II-3- Analyses in cellulo

### II-3-1- Culture cellulaire

Les cellules Huh7 et Huh7/Rep5.1 sont cultivées dans du milieu DMEM (« Dulbecco's modified minimal essential medium ») contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF), 50  $\mu$ g/mL de gentamycine, et 500  $\mu$ g/mL de G 418 (Invitrogen) pour les cellules Huh7/Rep5.1. Les cultures sont réalisées en boîtes de 75 cm<sup>2</sup> dans un volume final de 15 mL. Lorsque les cellules sont à 90 % de confluence, après environ 3 jours de croissance à 37°C en présence de 5% de CO2, elles sont lavées dans du PBS puis décollées et dilacérées grâce à une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen) afin d'être diluées au 1/5 dans du milieu frais.

### **II-3-2-** Transfection des cellules

### II-3-2-1- Transfection dans des plaques de 24 puits

La veille, les cellules sont ensemencées à une densité de 80 000 cellules par puits dans 1 mL de milieu de culture. Pour la transfection, 1  $\mu$ g d'ARN est incubé avec 3  $\mu$ L de DMRIE-C dans 500  $\mu$ L d'OptiMEM pendant 30 min. Les pseudo-liposomes ainsi formés sont déposés sur les cellules préalablement lavées trois fois en PBS vont interagir avec les membranes cellulaires pour y faire pénétrer l'ARN. Après 4 heures d'incubation à 37°C, 500  $\mu$ l de DMEM + Glutamax supplémenté avec 20 % de SVF est ajouté et les cellules sont maintenues à 37°C dans 5 % de CO2.

### II-3-2-2- Transfection dans des plaques de 96 puits (reverse transfection)

En plaque 96 puits, 300 ng d'ARN sont incubés avec 0,6  $\mu$ L de DMRIE-C dans 50  $\mu$ L d'OptiMEM. Les complexes de pseudo-liposomes formés sont déposés dans la plaque puis 25 000 cellules dans 50  $\mu$ L d'optiMEM sont ajoutées dans chaque puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C, 50  $\mu$ l de DMEM + Glutamax supplémenté avec 20 % de SVF sont ajoutés et les cellules sont maintenues à 37°C dans 5 % de CO2.

### **II-3-3-** Infection des cellules

La veille de l'infection, 25 000 cellules Huh7 sont incubées dans chaque puits d'une plaque de 96 puits. Les cellules sont ensuite lavées à trois reprises avec du PBS puis 100 µl des dilutions

sérielles des ligands de G4 ou de DMSO réalisées dans du milieu de culture y sont déposés. Le surnageant contenant les particules virales LMTV dilué au 1/10 dans du milieu de culture y est ensuite ajouté à raison de 100 µl par puits. Après 24h de culture, le surnageant cellulaire est remplacé par du milieu de culture neuf. Les cellules sont maintenues à 37°C dans 5 % de CO2.

### II-3-4- Tests de cytotoxicité

Les cellules sont préparées et traitées de la même façon que lors de l'infection à la différence que du milieu de culture sans particules virales est ajouté après les ligands. Après 48h de croissance à 37°C dans 5 % de CO2, le surnageant cellulaire est remplacé par 15 µl de la solution fournie par Promega (« celltiter 96® aqueous one solution cell proliferation assay ») et 100 µl de milieu de culture. Les cellules sont incubées 1h à 37°C dans 5 % de CO2, vortexées puis l'absorbance est mesurée à 492 nm. La cytotoxicité est déduite en comparant la viabilité des cellules témoin à celle des cellules incubées avec les ligands de G4 ou le DMSO.

### II-3-5- Cytométrie en flux

Les cellules transfectées en plaque 96 puits par les minigénomes exprimant l'eGFP sont lavées au PBS puis décollées avec une solution de trypsine pendant 3 min. Cette dernière est neutralisée par l'ajout de PBS / EDTA (2 mM) / SVF (0,5%). L'analyse de chaque puits est réalisée grâce au cytomètre BD LSR Fortessa de la plateforme de cytométrie en flux de Bordeaux.

### II-3-6- Quantification de la Gaussia Luciférase

Après transfection par l'ARN ou infection par les virus LMTV, 20  $\mu$ l de surnageants cellulaires sont ajoutés à 5  $\mu$ l de tampon de lyse (« Luciferase Cell Lysis Buffer », BioLabs). L'activité de la Gaussia luciférase présente dans chaque prélèvement est dosée par luminométrie avec 10  $\mu$ L de surnageant auxquels sont injectés 30  $\mu$ L de substrat Bio-Lux GLuc dilué au 1/100. La luminescence est mesurée grâce au Varioskan microplate reader (Thermo Scientific). Huit mesures sont réalisées pour chaque point à 1 sec d'intervalles puis les 4 derniers points sont moyennés.

### II-3-7- Extraction des ARN

### II-3-7-1- Extraction de l'ARN des cellules

Les cellules transfectées en 24 puits sont lavées au PBS puis chaque puits est traité avec 300  $\mu$ L de TRI-Reagent (Molecular Research Center, Inc) contenant du thiocyanate de guanidine, du phénol et du chloroforme. Les lysats sont transférés dans des tubes de 1,5 mL et 100  $\mu$ l de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont mélangés par inversion pendant 30 secondes puis incubés à température ambiante pendant 15 min avant d'être centrifugé 15 minutes à 12000 g. La phase aqueuse est isolée puis traitée avec un volume d'isopropanol afin de précipiter les ARN. Ces derniers sont ensuite lavés avec 500  $\mu$ L d'éthanol à 70 % puis repris dans 60  $\mu$ L d'eau DEPC. L'intégrité et la taille des ARN extraits sont vérifiées sur puce (RNA Nano 6000) par électrophorèse capillaire (Agilent 2100 bioanalyzer).

### II-3-7-2- Extraction de l'ARN des surnageants

Le surnageant (250 µl) des cellules en culture dans des plaques 24 puits est prélevé et 750 µl de solution TRI-Reagent LS y sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé avant que 200 µl de chloroforme soit rajouté. Les tubes sont mélangés par inversion pendant 30 secondes puis incubés à température ambiante pendant 15 min avant d'être centrifugé 15 minutes à 12000 g. Quatre cent microlitres sont prélevés dans la phase aqueuse puis 400 µl d'isopropanol sont ajoutés pour précipiter les ARN. Ces derniers sont ensuite lavés et vérifiés par électrophorèse capillaire.

### II-3-8- RT-qPCR

La quantification du gène NS3 des virus LMTV, du gène rapporteur des minigénomes l'eGFP et du gène de ménage SFRS4 se fait par RT-PCR quantitative avec le kit qScript<sup>TM</sup>One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit, ROX<sup>TM</sup>. Le mélange réactionnel dans un volume final de 25 µl comprend : 0,15 µl des amorces sens et anti-sens (Tableau 1) à 50 µM, 12.5 µl du mix One-Step SYBR Green Master Mix, 0.5 µl de la reverse transcriptase One-Step et 5 µl des ARN extraits dilués en série à trois reprises. La reverse transcription se fait sur un cycle de 10 min à 50°C, l'enzyme est ensuite inactivée pendant 5 min à 95 °C puis l'amplification de l'ADNc est réalisée par 45 cycles de 15 s à 95°C (dénaturation) ; 30 s à 61°C pour SFRS4 ou 65°C pour eGFP (hybridation) ; 30 s à 72°C ; 30 s à 83°C (pour la mesure de la fluorescence). L'ADNc est ensuite re-dissocié pendant 30 s à 95°C et la courbe de fusion est réalisée avec 80 cycles de 10 s partant de 55°C et augmentant de 0,5 °C à chaque cycle.

Pour chaque RT-qPCR, une gamme est réalisée à partir d'une quantité connue d'ARN portant les gènes NS3, eGFP ou SFRS4. Ainsi, six dilutions au 1/10 à partir de 5.10<sup>9</sup> molécules d'ARN sont intégrées dans chaque analyse.

### **II-4-** Analyses in vitro

### II-4-1- Tests de synthèse avec la RdRp virale

Les tests de synthèse sont réalisés dans un volume total de 25 µl contenant 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM NaCl ou KCl, 13.2 U RNasin (Promega), 0.5 mM de chacun des trois NTP (ATP, CTP, GTP), 500 nM de ligand de G4 ou d'oligonucléotide quand indiqué, 10 pmoles de matrice RNA, 8 pmoles de NS5B purifiée et 2 µCi de UTP- $\alpha$ H<sup>3</sup> (3000 Ci/mmol) ou UTP- $\alpha$ P<sup>32</sup> (3000 Ci/mmol). Le mélange réactionnel est incubé 10 min à 30°C en présence ou non des ligands et oligonucléotides avant que la RdRp soit rajouté pendant 2h à 30°C. La réaction est stoppée par ajout de TCA (acide trichloroacétique) 10% dans 20 µl de mélange réactionnel. Après passage sur des filtres de 0.45 µm, la radioactivité incorporée dans les molécules néo-synthétisées exprimée en CPM (coups par minute) est déterminée sur un compteur à scintillation.

### II-4-1- Reverse transcription des ARN par la SuperScript III

### II-4-1-1- Détection des G-quadruplexes

Dix pmoles des ARN contenants 18 adénines au niveau de l'extrémité 3' sont incubés avec 1  $\mu$ l du primer Cy5 à 5  $\mu$ M dans un volume de 5,5  $\mu$ l pendant 3 minutes à 75°C. La température est diminuée à 35°C en 5 minutes puis 1  $\mu$ l d'eau et 3  $\mu$ l de tampon sont ajoutés. Le tampon est constitué de 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 0,5 mM de chaque dNTP et 0, 50, 100 ou 150 mM de KCl ou LiCl. Lorsque le mélange réactionnel est remonté à 50°C, 0,5  $\mu$ l de la superscript III (Invitrogen) sont ajoutés puis incubé 20 minutes. Avant une incubation à 95°C pendant 10 minutes, 0,5  $\mu$ l de NaOH 2 M sont ajoutés. Enfin, la réaction est arrêtée avec l'ajout de 10  $\mu$ l de tampon de charge dénaturant.

### II-4-1-2- Détection des recombinants

Les produits de synthèse (5  $\mu$ l) sont mélangés à 2 pmoles de primer (Tableau 1), 1  $\mu$ l d'un mix de chaque dNTP (25 mM) et de l'eau pour avoir un volume final de 13  $\mu$ l. Les réactifs sont incubés 2 minutes à 65°C puis déposés 5 minutes dans la glace. Sont ajoutés : 4  $\mu$ l du tampon First strand 5X, 1  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 1  $\mu$ l de RNasine et 1  $\mu$ l de reverse transcriptase SuperScript III (Invitrogen). Le mélange est incubé à 55°C pendant 60 min puis l'enzyme est inactivée à 70°C pendant 15 minutes. Afin de ne garder que les ADN complémentaires, les ARN sont dégradés par de la RNaseA pendant 20 min à 37°C.

### II-4-2- Amplification des ADNc recombinants

Afin de détecter la présence de recombinants lors des tests de synthèse, des PCR avec l'enzyme Phusion sont réalisées. Ainsi, dans un volume final de 50  $\mu$ l, le mélange est constitué de 2  $\mu$ l d'ADNc, 1  $\mu$ l de chaque primer à 50  $\mu$ M, 0.25  $\mu$ L de chaque dNTP (25 mM), 10  $\mu$ l de tampon phusion 5X, 1,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 2,5  $\mu$ L de DMSO et 0.5  $\mu$ l de Taq Phusion (1U). La Taq est activée pendant 30 secondes à 98°C puis 40 cycles sont réalisés avec une dénaturation de 15 secondes à 95°C, une hybridation de 10 secondes à 68°C et une élongation de 15 secondes à 72°C. Enfin, l'élongation finale est de 10 minutes à 72°C.

Les échantillons sont par la suite déposés sur un gel d'agarose 2 % contenant du SyberGreen ; la migration est effectuée dans du TAE puis les amplicons sont visualisées sous lumière bleu  $(\lambda = 497 \text{ nm})$ 

### **II-4-3-** Electrophorèses

### II-4-3-1- Gels dénaturants

Les gels dénaturants sont réalisés à partir d'un rapport acrylamide / bisacrylamide de 60. En fonction du pourcentage d'acrylamide souhaité dans le gel, les volumes varient. Pour 100 ml d'un gel à 8 % acrylamide et 7 M Urée par exemple, le mélange sera le suivant : 20 ml acrylamide à 40 %, 6.67 ml bis-acrylamide à 2 %, 42 g Urée, 10 ml de TBE 10X dans 100 ml final. Sont rajoutés 1 ml d'APS à 10 % et 50  $\mu$ l de Temed. Lorsque le gel est polymérisé, ce dernier est chauffé dans les conditions de migration avant dépôt des échantillons.

Pour les ARN radio-marqués, avant dépôt dans le gel, les échantillons sont chauffés dans leur tampon de charge à 92°C pendant 2 min. Ce dernier est constitué de 0,5 mM EDTA, 0,025 % SDS, 0,1 % Bleu bromophénol / xylène cyanol et 95 % formamide. Lorsque les échantillons sont déposés dans le gel de 42 cm de long, la migration est effectuée à 65 W pendant 1h30. Le gel est ensuite séché à 80°C pendant 1h30 puis incubé à -80°C avec un film radiosensible. Pour les ADNc marqués au Cy5, les échantillons sont dilués dans un tampon de charge constitué de 95 % formamide, 20 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7,5 et de dye orange. Lorsque les échantillons sont déposés dans le gel de 22 cm de long, la migration est effectuée à 27 W pendant 30 min. Le gel est ensuite analysé directement au LAS 4010 afin de détecter la fluorescence des ADNc.

### II-4-3-2- Gels natifs

La préparation des gels natifs est similaire à celle des gels dénaturant à l'exception qu'il n'y a pas d'urée dans le mélange. Lors de la préparation des échantillons, ces derniers sont mélangés au tampon de charge constitué de : 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 30 % glycérol et 0,1 % de xylène cyanol / bleu de bromophénol. Afin de ne pas déstructurer les échantillons, le gel de 22 cm de long ne doit pas chauffer lors de sa migration. Cette dernière est réalisée avec un courant de 100 V pendant 1h puis 200 V pendant 2 à 3h. Le gel est ensuite séché à 80°C pendant 1h30 puis incubé à -80°C avec un film radiosensible.

### II-4-4- Microscopie électronique à transmission

### II-4-4-1- Préparation des échantillons

Les ARN génomiques sont préparés avec 3.10<sup>11</sup> molécules d'ARN dans 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et 10 mM de NaCl. Les échantillons sont ensuite chauffés 2 min à 72°C, puis la température est abaissée à 30°C en 30 min puis maintenus dans la glace jusqu'à congélation.

- Lorsque les préparations sont réalisées en présence des oligonucléotides SL2 marqué en 3' par des billes d'or de 10 nm (SL2\_14\_or), les ARN sont préparés dans les mêmes conditions et une fois à 30°C, 6.10<sup>10</sup> molécules SL2\_14\_or sont ajoutées pour une incubation de 4 h à 30°C avant d'être déposés sur les lames.

- Lorsque le leur SL2\_14 est présent dans l'expérience,  $3.10^{12}$  molécules d'oligonucléotide non marqué sont ajoutés en plus des  $6.10^{10}$  molécules SL2\_14\_or.

- Lorsque l'expérience est réalisée avec la stréptavidine couplée à des billes d'or de 6 nm (DeltaMicroscopies), ces dernières sont ajoutées aux oligonucléotides SL2\_14\_or dans les proportions « particule d'or\_strepta : molécule ARN génomique » de 1 : 1 ou 2 : 1. Ainsi 3.10<sup>11</sup> ou 6.10<sup>11</sup> particules d'or\_strepta sont ajoutées à 6.10<sup>10</sup> particules SL2\_14\_or sur 3.10<sup>11</sup> molécules d'ARN puis incubées 4 h à 30°C après la pré-incubation de l'ARN génomique décrite précédemment.

### II-4-4-2- Coloration négative

Pour chaque échantillon, 6  $\mu$ l sont déposés sur une grille en cuivre (300 mesh) carbonée pendant 2 min à température ambiante. Préalablement les grilles ont été soumises à une procédure standard d'effluvage (2 mA / 0,1 mBar / 40 secondes). Après adsorption, l'excès d'échantillon est éliminé à l'aide d'un papier Whatman 5. Puis les grilles sont rincées rapidement avec 6  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O milliQ, blottées, contrastées pendant 30 secondes avec 6  $\mu$ l de d'acétate d'uranyle à 2 % à température ambiante et séchées avec du papier Whatman 5.

### II-4-4-3- Cryo-microscopie

Des grilles lacey (Formvar/Carbon 300Mesh copper grids) sont utilisées et congelées (selon le mode opératoire de film mince) à l'aide d'un EM GP (LEICA) qui garantit le contrôle de la température de l'échantillon et de l'humidité de la chambre de préparation. Ainsi, 4,2 µl de la solution sont déposés sur une grille côté carbone, soumise au préalable à une étape de « glow discharge » (3mA / 0.3 mBar / 40 secondes). La solution est incubée sur la grille pendant 10 secondes en chambre humide (70 % humidité à 15°C). La grille est ensuite congelée dans de l'éthane liquide (maintenu à -183°C) après absorption de l'excès de solution avec du papier whatman 5 pendant 2 à 2,2 sec sur la face cuivre de la grille. Les grilles sont ensuite conservées dans l'azote liquide jusqu'à observation.

# RESULTATS -DISCUSSION

## **Résultats - Discussion**

# I- Structure et rôle de l'extrémité 3' de l'ARN génomique

Les régions 5' et 3' de l'ARN viral du VHC portent des structures secondaires conservées entre les différents isolats qui peuvent être impliquées dans des interactions ARN-ARN longue distance. Pour une même région, plusieurs conformations sont souvent décrites impliquant un basculement entre les structures mises en jeu. Cette dynamique, générée par la commutation d'une interaction vers une autre, est supposée jouer un rôle moteur dans le contrôle des différentes étapes de la réplication virale. En effet, l'ARN génomique doit être traduit, répliqué et encapsidé pour produire des virions infectieux. Identifier ces interactions et en analyser le rôle sont deux étapes essentielles à la compréhension de la biologie du virus.

L'extrémité 3' du génome est l'un des sièges de ces interactions. Bien que nombre d'entre elles aient été identifiées *in silico* et *in vitro*, leurs rôles dans la réplication virale restent majoritairement à être élucidées.

La région 3'X est composée de 98 nucléotides qui se replient en trois tiges-boucles : SL1, SL2, SL3. Il a été montré, *in vitro*, que la séquence palindromique de 16 nucléotides présente au niveau de la tige-boucle SL2 serait responsable de la dimérisation de deux molécules. Pour autant, le rôle biologique de cette interaction n'était, jusqu'alors, pas connu.

Au cours de ce travail de thèse, trois axes impliquant la dimérisation du brin génomique ont été étudiés :

- Le premier consistait à analyser le rôle de la dimérisation de l'ARN génomique au cours du cycle viral. La majorité des résultats obtenus ont permis la publication d'un premier article.
- Le deuxième consistait à démontrer, *in vitro*, que la dimérisation est observable sur le génome entier.
- Enfin, le troisième axe visait à étudier l'impact de la dimérisation et de la polymérase virale sur la création de recombinants.



**Figure 39 : Schéma représentatif de la dimérisation de la SL2.** La séquence palindromique est représentée en rouge.



**Figure 40 : Représentation des mutants de dimérisation.** Les mutations sont présentées en bleu.



### Figure 41 : Séquence et structure de la 5BSL3.2.

La mini5BSL3.2 représente la version tronquée de la structure injectée lors des tests par SPR. Les nucléotides en gras interagissent avec la boucle apicale de la SL2.

### I-1- La dimérisation du génome est nécessaire pour la réplication virale

La tige-boucle SL2 de la région 3'X est impliquée dans au moins deux interactions : l'une, intramoléculaire, avec une séquence située en amont nommée 5BSL3.2 ; l'autre, intermoléculaire, conduit à la formation d'un dimère. Ce dernier s'organise autour du palindrome présent dans la partie 5' de la tige de la SL2. La dimérisation débuterait par la formation d'un *kissing complex* au niveau du bulge interne de deux monomères (Figure 39) (Shetty et al. 2010).

Afin de définir le rôle biologique de cette interaction intermoléculaire, des mutations empêchant la dimérisation ont été introduites dans l'ARN génomique puis l'effet de ces mutations a été analysé au cours des différentes étapes du cycle viral.

### I-1-1- Design et analyse des mutants de dimérisation

Des mutants de la SL2, ont été conçus dans le but de perturber la dimérisation sans affecter l'interaction avec la 5BSL3.2. En effet, l'interaction 5BSL3.2 / SL2 implique les nucléotides de la boucle apicale de la SL2 qui appartiennent également à l'extrémité 3' de la séquence palindromique. Ainsi seuls les nucléotides situés au niveau du bulge interne ont été mutés. Ces derniers étant impliqués dans le *kissing complex* suggéré comme initiateur de la dimérisation, ils devraient inhiber cette interaction.

Synthétisé par mutagénèse dirigée, le mutant nommé Kistem est conçu pour séquestrer les nucléotides de la séquence palindromique au sein de la structure fermée en tige de la SL2 ; il comprend une substitution et une addition nucléotidique (Figure 40). Les mutants UU et AU sont réalisés pour empêcher la formation du *kissing complex* qui conduit à la dimérisation. Dans le mutant nommé TD, le bulge interne de la SL2 a été transloqué sur le côté 3' de la tige (Figure 40).

Les ARN mutants de la SL2 ont été testés pour leur capacité à dimériser et interagir avec la 5BSL3.2 par résonnance plasmonique de surface (SPR). Ces expériences ont été réalisées par nos collaborateurs, William Palau et Carmelo Di Primo (INSERM, U869, laboratoire ARNA). Pour vérifier que la mutation empêche la dimérisation, les séquences de la SL2 biotinylées en 5' sont immobilisées sur des puces de streptavidine, les mêmes ARN non biotinylés sont analysés pour leur capacité à interagir. Pour vérifier que l'interaction avec la 5BSL3.2 est



#### Figure 42 : Sélection des mutants de dimérisation.

A- Analyse cinétique de la dimérisation de la SL2 et de l'interaction avec la mini5BSL3.2 par SPR. Les ARN biotinylés SL2wt (a), SL2Kistem (b), SL2UU (c), SL2AU (d) et SL2TD (d) ont été fixés sur les puces de streptavidine puis les ARN homologues ainsi que l'ARN mini5BSL3.2 ont été injectés à 50  $\mu$ L/min.

B- Deux microgrammes de chaque ARN ont été déposés sur un gel d'acrylamide natif à 15 %.

maintenue chez les mutants, une version tronquée de la 5BSL3.2 (mini5BSL3.2) est produite (Figure 41). Comme présenté dans la Figure 42-A-a, l'augmentation de signal obtenu lorsque la matrice mini5BSL3.2 ou SL2<sub>wt</sub> est injectée démontre une interaction de la SL2<sub>wt</sub> avec ces deux molécules. La dimérisation ainsi que l'interaction 5BSL3.2 / SL2 sont donc réalisables. Les sensorgrammes obtenus lorsque la matrice mini5BSL3.2 est injectée sur chacun des mutants SL2 immobilisés démontrent l'existence d'une interaction entre les deux molécules (Figure 42-A). En revanche, lorsque les matrices SL2 homologues sont injectées, le signal n'augmente pas pour les ARN SL2<sub>Kistem</sub> SL2<sub>UU</sub> et SL2<sub>TD</sub>, indiquant qu'ils ne peuvent pas auto-interagir (Figure 42-A-b, c et e respectivement). Cela n'est pas le cas pour le mutant SL2<sub>AU</sub> qui montre une dimérisation (Figure 42-A-d).

Afin d'étayer ces résultats, les différentes matrices sont déposées sur un gel natif d'acrylamide (Figure 42-B). Deux bandes majoritaires sont observées pour l'ARN SL2wT et SL2<sub>AU</sub> indiquant l'existence de 2 conformations ; la bande inférieure correspond vraisemblablement au monomère et la bande supérieure au dimère. Le profil de migration obtenu pour les matrices SL2<sub>Kistem</sub> et SL2<sub>TD</sub> ne présente pas de bande supérieure. Cela confirme l'absence de dimérisation pour ces mutants. En revanche, la bande unique du mutant SL2UU migre plus lentement que celle des matrices SL2<sub>Kistem</sub> et SL2<sub>TD</sub> suggérant une conformation monomérique différente. Ainsi, les mutants SL2<sub>UU</sub> et SL2<sub>AU</sub> ont été exclus des analyses suivantes. Seuls les mutants Kistem et TD ne permettent pas à la SL2 de dimériser alors que la capacité d'interagir avec la 5BSL3.2 est maintenue. Ils seront donc utilisés afin d'identifier la fonction biologique de la dimérisation du génome du VHC.

## I-1-2- La dimérisation de l'ARN génomique est requise pour la réplication virale

Afin d'étudier le rôle de la dimérisation au cours des étapes du cycle viral, les mutations ont été intégrées dans un virus infectieux (LMTV-Gluc). Ce dernier a été produit au laboratoire par synthèse de gène (LMTV : Genbank HG948568). Il est basé sur le JFH-1 où la séquence des gènes E1 et E2 a été modifiée grâce à 105 mutations silencieuses (99 et 6 respectivement). Le gène codant pour la Gaussia Luciférase (GLuc) a été inséré entre p7 et NS2. La réplication de ce virus peut ainsi être suivie en mesurant la luminescence des surnageants de culture. Le LMTV-GLuc présente un niveau de réplication similaire à la souche parente JFH-1.

Les mutations générant les structures secondaires SL2<sub>kistem</sub> et SL2<sub>TD</sub> ont été insérées dans le génome LMTV-GLuc. L'effet des mutations sur la réplication virale a été analysé en





### Figure 44 : Effet des mutations de dimérisation sur la réplication virale.

Quatre vingt mille cellules Huh7 ont été transfectées avec 1 µg d'ARN LMTV-Gluc<sub>WT</sub>, LMTV-Gluc<sub>Kistem</sub>, LMTV-Gluc<sub>TD</sub>.

A : L'expression de Gluc a été mesurée pour 4  $\mu$ l de chacun des surnageants à 24, 48 et 72h post-transfection (moyenne  $\pm$  Ecartype de 3 expériences indépendantes en duplicate).

B : Les cellules exprimant chacun des trois virus sont ensemencées au 1/3 72h post-transfection. Trois jours après, les ARN sont extraits à partir des cellules et du surnageant puis quantifiés par RT-qPCR pour le gène NS3, en utilisant l'ARN SFRS4 comme contrôle. Les résultats sont normalisés à 100 % pour le LMTV-Gluc WT (moyenne  $\pm$  Ecartype de 3 expériences indépendantes en duplicate, en utilisant 2 préparation d'ARN,).

C : Les cellules contenant chacun des trois virus sont passées au 1/3 72h post-transfection puis après trois jours de culture, 50  $\mu$ l de chaque surnageant viral est utilisé pour infecter 10<sup>5</sup> cellules Huh7. Après 72h, l'expression de Gluc est mesurée dans 4  $\mu$ l de surnageant.

(moyenne ± Ecartype de 3 expériences indépendantes en duplicate).

transfectant des cellules Huh7 par chacun des ARN : LMTV-GLucwT, LMTV-GLucKistem, LMTV-GLucTD. L'expression de la GLuc présente dans le surnageant et la quantité d'ARN viral ont été mesurées après plusieurs jours de culture des cellules. Un schéma représentant les étapes de l'expérience est présenté Figure 43.

Dans un premier temps, la production de GLuc a été quantifiée 24 h, 48 h et 72 h posttransfection (Figure 44-A). L'ARN sauvage produit efficacement la protéine GLuc après 24 h de culture puis le signal augmente de façon exponentielle entre 48 et 72 h, indiquant une réplication active du virus. Alors que la production de GLuc à 24h pour les ARN LMTV-GLuc<sub>Kistem</sub> et LMTV-GLuc<sub>TD</sub> est similaire à celle du WT, il n'y a pas d'augmentation du signal à 48 et 72 h. Ces résultats indiquent que la traduction de la GLuc est identique pour les trois virus à 24 h mais que les virus mutants présentent un défaut dans la réplication virale lorsque la séquence de dimérisation est modifiée.

Pour déterminer quelle étape du cycle est affectée, la quantité d'ARN viral présent dans les cellules infectées et dans les virions produits dans le surnageant de culture a été quantifiée par RT-qPCR. Si la réplication de l'ARN est affectée, le nombre de génomes viraux doit globalement diminuer dans les cellules ainsi qu'au sein des virions produits dans le surnageant de culture. En revanche, si l'encapsidation est affectée, le nombre de génomes viraux doit diminuer dans le surnageant et éventuellement augmenter dans les cellules.

Afin d'éviter d'éventuelles contaminations par l'ARN transfecté et de laisser le temps aux virus de se répliquer, les cellules ont été lavées plusieurs fois avec du PBS, passées 72 h post-transfection et cultivées pendant 3 jours (Figure 43, jour 6). Un second passage a été réalisé puis les cellules sont à nouveau cultivées pendant 3 jours (Figure 43, jour 9). Les ARN ont alors été extraits des cellules et du surnageant de culture aux jours 6 et 9 puis la quantité d'ARN viral a été quantifiée par RT-qPCR (Figure 44-B). Le gène cellulaire SFRS4 (« *Splicing factor, arginine/serine-rich 4* ») a été utilisé en référence pour évaluer la quantité d'ARN viral par ARN cellulaire.

Pour le virus sauvage, le nombre de génomes présents dans les cellules reste similaire entre les deux passages ( $46 \pm 10$  versus  $47 \pm 11$  copies de génomes/copie de SFRS4) et diminue dans le surnageant ( $24 \pm 7 \times 10^3$  versus  $5 \pm 71 \times 10^3$  copies de génomes/µl). Les quantités de génomes obtenues pour chacun des virus mutés sont alors rapportées au virus sauvage pour chaque condition. Dans les cellules, le niveau d'ARN viral du LMTV-GLuc<sub>Kistem</sub> et LMTV-GLuc<sub>TD</sub> est inférieur à la quantité d'ARN LMTV-GLuc<sub>WT</sub> après le premier passage (jour 6) alors qu'il reste similaire dans le surnageant (Figure 44-B, passage 1). Ces résultats suggèrent que les génomes



### Figure 45 : Effet des mutations de dimérisation sur la traduction et la stabilité des ARN.

A : Vingt mille cellules Huh7 sont transfectées avec 300 ng des ARN minigénomes 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>WT</sub>, 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>kistem</sub> et 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>TD</sub>. Les cellules sont récupérées après 24h de culture et la fluorescence moyenne est mesurée par cytométrie en flux. Les résultats sont normalisés à 1 par rapport au WT (moyenne  $\pm$  écartype de 8 expériences indépendantes avec trois préparations d'ARN, \*\* : p < 0,001 en utilisant le test de student).

B : Quatre vingt mille cellules sont transfectées avec 1 µg des ARN minigénomes 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>WT</sub>, 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>kistem</sub> et 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>TD</sub>. Les ARN sont extraits des cellules 24 et 72h post-transfection avec du TRI-Reagent. La quantité de minigénome est quantifiée par RT-qPCR sur le gène eGFP en utilisant SFRS4 comme contrôle. Les résultats sont exprimés sous forme d'une pente entre 72h et 24h puis normalisé à 1 par rapport au WT (moyenne ± écartype sur les expériences réalisées avec trois préparations d'ARN différentes en triplicate, \*\* : p < 0,001 en utilisant le test de student).

mutants sont compétents pour la traduction des protéines virales, dont les protéines structurales puisqu'ils semblent être encapsidés et relargués hors de la cellule.

Après le deuxième passage (jour 9), il n'est plus possible de quantifier les génomes mutés dans les cellules et la quantité de génome dans le surnageant est drastiquement réduite (Figure 44-B, passage 2). Ces résultats suggèrent que la réplication de l'ARN plutôt que l'encapsidation semble être affectée pour les virus ne pouvant plus dimériser.

Afin de confirmer que les virus formés sont compétents pour l'entrée dans de nouvelles cellules, les surnageants viraux produits ont été utilisés pour infecter des cellules Huh7 naïves (Figure 43). La quantité de GLuc produite est mesurée 72 h post-infection (Figure 44-C). Alors que le virus sauvage entraine une production conséquente de GLuc, les virus mutés n'en produisent que très peu. Cette faible production des virus LMTV-GLuc<sub>Kistem</sub> et LMTV-GLuc<sub>TD</sub>, témoigne cependant de la présence d'un ARN génomique non réplicatif.

Les virus mutés pour la dimérisation sont donc capables d'entrer dans de nouvelles cellules et d'être traduits et encapsidés mais semblent être affectés pour la réplication génomique.

### I-1-3- Effet de la dimérisation génomique au niveau de la traduction

Les données précédentes indiquent que la réplication du génome est altérée. Cette situation pourrait résulter d'une baisse de la traduction qui affecterait la production des protéines non structurales et donc des complexes de réplication. Pour vérifier cette hypothèse, des minigénomes constitués par les extrémités 5' et 3' UTR du virus qui encadrent le gène codant pour l'eGFP ont été modifiés afin d'y insérer les mutations de la SL2. Les minigénomes, nommés 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR ne sont pas réplicatifs en l'absence du complexe de réplication ; seule la traduction et la stabilité seront quantifiées. Les ARN sauvages et mutés pour la dimérisation ont été transfectés dans des cellules Huh7 puis le niveau de traduction de l'eGFP a été analysé par cytométrie en flux 24h post transfection (Figure 45-A). Les mutants 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>kistem</sub> et 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>TD</sub> produisent presque deux fois moins d'eGFP que le minigénome 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>WT</sub> (56  $\pm$  8 % et 52  $\pm$ 5 % respectivement). La traduction est donc diminuée lorsque les minigénomes sont mutés au niveau de la séquence de dimérisation.

Etant donné que le niveau d'eGFP est dépendant de la stabilité de l'ARN, l'évolution de la quantité d'ARN minigénome au cours du temps a été mesurée. L'ARN est extrait des cellules 24 et 72h post-transfection et le gène de l'eGFP est quantifié par RT-qPCR. Le nombre de

génome est rapporté par nombre de copies de SFRS4 puis normalisé à 1 pour le WT (Figure 45-B). Le niveau d'ARN diminue d'environ 30 % pour les minigénomes 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>kistem</sub> et 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>TD</sub> (73  $\pm$  16 % et 72  $\pm$  13% respectivement). Ces données indiquent que les mutations empêchant la dimérisation des molécules entrainent une diminution dans la stabilité des ARN.

La différence de stabilité des minigénomes mutés peut expliquer les variations de traduction observées pour ces ARN, néanmoins ces variations restent faibles et ne permettent pas d'expliquer la diminution drastique de la réplication des virus LMTV.

### I-1-4- Effet de la dimérisation génomique au niveau de la réplication de l'ARN

Les étapes de traduction et de réplication de l'ARN sont couplées dans le virus et le modèle réplicon ; le niveau de synthèse de l'ARN impacte directement la traduction des protéines virales. En effet, moins il y a d'ARN répliqué, moins il y aura de molécules disponibles pour être traduites. Par conséquent, ces modèles d'études ne permettent pas de déterminer laquelle de ces deux étapes serait affectée par une mutation du génome. Pour analyser l'étape de traduction et de réplication séparément, deux types cellulaires ont été utilisés.

Le premier représente des cellules Huh7 naïves où seule la traduction et la dégradation de l'ARN du minigénome ont lieu. Le deuxième constitue les cellules Huh7-Rep5.1 (Dumas et al. 2007) qui hébèrgent le réplicon Con1. Elles produisent ainsi constitutivement le complexe de réplication avec les protéines virales NS3 à NS5B. Dans les cellules Huh7-Rep5.1, en plus des processus de traduction et dégradation, l'ARN minigénome est répliqué.

Ainsi, pour déduire le niveau de réplication de l'ARN en tenant compte de sa traduction et sa dégradation, la courbe d'expression de l'eGFP obtenue dans les Huh7-Rep5.1 entre 24 et 72h par cytométrie en flux sera soustraite de celle obtenue dans les cellules Huh7.

Les mesures du niveau de traduction sont, comme précédemment, réalisées en utilisant les cellules Huh7. Celui-ci est directement lié à la fluorescence émise par les cellules Huh7 transfectées par l'ARN minigénome. La moyenne de fluorescence est donc fonction de la quantité d'ARN total. Cela correspond à la quantité d'ARN transfectée diminuée de la quantité d'ARN dégradé par la cellule.

*Eq.*  $n^{\bullet}1$  : Fluorescence<sub>Huh7</sub> = f (ARN total) = f (ARN transfecté – ARN dégradé)



#### Figure 46 : Effet des mutations de dimérisation sur la réplication de l'ARN.

Vingt milles cellules Huh7 ou Huh7-Rep5.1 ont été transfectées avec 300 ng des ARN minigénomes 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>wT</sub>, 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>kistem</sub> et 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>TD</sub>.

A : Après 24h et 72h de culture la fluorescence moyenne émise par l'eGFP est mesurée par cytométrie en flux. La pente issue des valeurs entre 24 et 72h pour les cellules Huh7-Rep5.1 est soustraite de celle obtenue à partir des cellules Huh7 puis normalisé à 1 pour le minigénome WT. (moyenne  $\pm$  écartype de 8 expériences indépendantes avec trois préparations d'ARN, \* : p < 0,05 en utilisant le test de student).

B : Après 72h de culture, les ARN cellulaires ont été extraits puis la quantité de minigénomes quantifiée par RTqPCR sur le gène eGFP en utilisant le gène cellulaire SFRS4 comme contrôle. Les résultats sont normalisés à 1 par rapport au minigénome WT (moyenne  $\pm$  écartype sur les expériences réalisées avec trois préparations d'ARN différentes en triplicate, \* : p < 0,05 en utilisant le test de student). L'étude du niveau de réplication est réalisée en comparant les résultats de fluorescence obtenus avec les cellules Huh7-Rep5.1 à ceux obtenus avec les cellules Huh7. L'**Eq. n°1** devient alors :

*Eq. n*<sup>•</sup>2 : Fluorescence<sub>Huh7-Rep5.1</sub> = f (ARN transfecté – ARN dégradé + ARN répliqué)

En tenant compte de l'**Eq. n**°**1** et en assumant que les niveaux de traduction et de dégradation sont similaires dans les deux types cellulaires, alors l'**Eq. n**°**2** peut s'écrire :

*Eq.*  $n^{\circ}2'$ : Fluorescence<sub>Huh7-Rep5.1</sub> = Fluorescence<sub>Huh7</sub> + f (ARN répliqué<sub>Huh7-Rep5.1</sub>)

Afin d'évaluer la capacité à répliquer des différents minigénomes, l'évolution de la réplication est analysée entre 24 heures et 72 heures post-transfection. L'**Eq. n**° **3** correspondant au niveau de réplication devient :

$$Eq. n^{\bullet}3: \text{Réplication} = \frac{\text{Fluorescence}_{\text{Huh7-Rep5.1}} (72h-24h) - \text{Fluorescence}_{\text{Huh7}} (72h-24h)}{72h-24h}$$

Un rapport positif témoignera donc d'une réplication efficace ; l'équation n°3 a été appliquée pour les expériences où le minigénome sauvage est correctement répliqué. Les deux lignées cellulaires sont transfectées avec chacun des minigénomes 5UTR-H2AE-5BSL-3UTRwT, 5UTR-H2AE-5BSL-3UTRkistem et 5UTR-H2AE-5BSL-3UTRTD. Le facteur de réplication est normalisé à 1 pour le minigénome WT, les résultats obtenus pour les mutants montrent un facteur négatif tant pour le 5UTR-H2AE-5BSL-3UTRkistem que pour le 5UTR-H2AE-5BSL-3UTRTD (Figure 46-A), indiquant que la réplication de ces ARN est largement affectée par les modifications introduites dans la tige-boucle SL2.

Afin de confirmer ces résultats, les quantités d'ARN présentes dans les cellules Huh7-Rep5.1 ont été mesurées par RT-qPCR 72h post-transfection. La quantité d'ARN mesurée pour le minigénome sauvage est normalisée à 1 (Figure 46-B). Alors que la quantité d'ARN pour le mutant 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>kistem</sub> ne semble pas affectée, le mutant 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>kistem</sub> ne semble pas affectée, le mutant 5UTR-H2AE-5BSL-3UTR<sub>to</sub> de synthèse (Figure 46-B). La synthèse d'ARN est donc affectée pour le minigénome 5BSL-3UTR<sub>TD</sub> dans ce modèle expérimental.

Cependant, ces quantifications ne permettent pas de conclure si la réplication et/ou la dégradation de l'ARN est responsable des variations observées par fluorescence. Bien que les



#### Figure 47 : Effet des mutations de dimérisation sur la synthèse d'ARN.

A :Représentation schématique des constructions ARN. Les flèches représentent des interactions intramoléculaires impliquant la structure 5BSL3.2.

B : Les tests de synthèse avec la RdRp sont réalisés avec 8 pmoles de NS5B purifiée et 1 pmole d'ARN. Les matrices sont mutés pour la dimérisation (Kistem et TD) ou pour l'interaction intramoléculaire 5BSL3.2 / SL2 au niveau de la boucle apicale (5BSL3.2<sub>wt</sub> / SL2<sub>555mut</sub>). La restauration de cette interaction est obtenue en mutant réciproquement la boucle apicale de la 5BSL3.2 (5BSL3.2<sub>mut</sub> / SL2<sub>555mut</sub>). La synthèse d'ARN est exprimée en pourcentage de valeurs obtenues par rapport au WT (moyenne ± écartype sur 3 à 5 expériences indépendantes réalisées avec deux préparations d'ARN différentes, \*\* : p < 0,001 en utilisant le test de student).

analyses de cytométrie en flux incluent les niveaux de traduction et de dégradation ; les données indiquent une diminution de la réplication de l'ARN lorsque les mutations sont introduites. Néanmoins, il n'est pas exclu que les différences observées dans la production d'eGFP soient dues à des variations de stabilité de l'ARN dans ce système.

### I-1-5- La dimérisation est nécessaire pour une synthèse efficace par la RdRp

### I-1-5-1- Analyse quantitative des produits de synthèse

La diminution de la stabilité et de la traduction ne suffisent pas à expliquer le phénotype obtenu pour les virus mutants. La capacité de la polymérase virale à synthétiser *in vitro* de nouveaux ARN à partir de matrices capables ou non de dimériser a alors été évaluée. Pour ce faire, des matrices ARN portant les 555 derniers nucléotides de l'extrémité 3' ont été synthétisées (Figure 47-A). Ces matrices portent les séquences 5BSL3.2 et la séquence en amont nommée seq9110 afin de permettre, en plus de la dimérisation, les interactions 5BSL3.2 / seq9110 et 5BSL3.2 / SL2.

La synthèse d'ARN médiée par la RdRp virale purifiée au laboratoire diminue significativement pour les mutants TD<sub>555</sub> et Kistem<sub>555</sub> par rapport à l'ARN sauvage WT<sub>555</sub> (78  $\pm$  4% et 55  $\pm$  3% de synthèse respectivement) (Figure 47-B). Ces données suggèrent que les ARN mutants constituent une matrice moins bien répliquée par la RdRp.

Afin de vérifier que ces résultats ne sont pas dus à une modification de séquence ou de structure mais bien à l'abolition de l'interaction intermoléculaire, une interaction intramoléculaire a été mutée puis le niveau de synthèse mesuré. Ainsi, les mutations inhibant l'interaction 5BSL3.2 / SL2 et d'autres mutations la restaurant sont analysées (5BSL3.2<sub>555</sub>mut et 5BSL3.2<sub>555</sub>mut / SL2<sub>555</sub>mut respectivement). Pour chacune de ces matrices, le niveau de la synthèse d'ARN n'est pas affecté comparé à celui de la matrice sauvage (Figure 47-B).

Les résultats présentés ici montrent que la synthèse du brin négatif par la RdRp dépend principalement d'une interaction intermoléculaire qui conduit à la dimérisation de deux brins d'ARN positifs au niveau de l'extrémité 3' du génome.

### I-1-5-2- Analyse qualitative des produits de synthèse

Les matrices ARN du VHC pouvant dimériser semblent favorables à la synthèse par la RdRp. Afin d'analyser la qualité des produits néosynthétisés lorsque les matrices 555<sub>Kistem</sub> et 555<sub>TD</sub> sont utilisées, 50 000 cpm de chaque échantillon sont déposés sur un gel dénaturant (Figure 48).



### Figure 48 : Analyse des produits de synthèse à partir des matrices WT<sub>555</sub>, kistem<sub>555</sub> et TD<sub>555</sub>.

Après une réaction de synthèse d'ARN par la NS5B pendant 2 heures à 30°C, en présence d'UTP-P<sup>32</sup>, les produits de synthèse sont déposés sur gel d'acrylamide à 5 % en présence d'Urée 7 M après avoir été chauffés 2 min à 92°C ; 10000 CPM et 50000 CPM sont déposés pour les matrices  $WT_{555}$  (1), Kistem<sub>555</sub> (2) et  $TD_{555}$  (3) et produits de synthèse  $WT_{555}$  (4), Kistem<sub>555</sub> (5) et  $TD_{555}$  (6). L'expérience a été réalisée 2 fois sur des préparations d'ARN indépendantes.

Les matrices WT<sub>555</sub>, Kistem<sub>555</sub> et TD<sub>555</sub> servant de témoins de taille, sont déposés dans les pistes 1, 2 et 3 respectivement. La bande majoritaire correspond à la forme monomérique des molécules de 555 nucléotides. Les produits de synthèse obtenus après l'action de la RdRp sur les matrices WT<sub>555</sub>, Kistem<sub>555</sub> et TD<sub>555</sub>, sont déposés dans les pistes 4, 5 et 6 respectivement. Le profil de migration est similaire entre chacun des ARN néosynthétisé. Cependant, les bandes majoritaires sont de plus petite tailles que celle de la matrice (piste 1 à 3). Seule une faible portion des produits de synthèse semble atteindre les 555 nucléotides. Ces résultats corroborent les résultats obtenus au laboratoire par le passé et indiquent que, pour une part, la polymérase n'initie pas la synthèse à l'exacte extrémité 3'. Les bandes de tailles supérieures présentes sur les produits de synthèse (piste 4 à 6) restent similaires pour l'ARN WT<sub>555</sub> et les mutants Kistem<sub>555</sub>.

La dimérisation entre deux génomes du VHC semble nécessaire pour initier efficacement la réplication de l'ARN mais ne parait pas affecter la qualité des produits néosynthétisés.

### I-1-6- Conclusion - discussion

Les données obtenues lors de cette première partie démontrent que le virus doit dimériser au niveau de l'extrémité 3' du brin génomique pour assurer une réplication productive. Des mutations présentes dans la tige-boucle SL2, ayant pour but l'abolition de la dimérisation, inhibent la réplication du virus *in cellulo*. Alors que la traduction et la production de virus infectieux ne semblent pas être affectées de manière significative, une synthèse d'ARN efficace nécessite l'intégrité de la séquence de dimérisation.

Pour autant, chacune des approches développées ici telles que l'utilisation du virus LMTV, des minigénomes ou des tests *in vitro* convergent et confirment l'hypothèse qu'une réplication de l'ARN efficace nécessite la dimérisation de deux génomes.

Cependant, bien que le système minigénome permette une analyse indépendante de la traduction et de la réplication *in cellulo*, ce modèle a aussi ses limites. Premièrement, les minigénomes transfectés dans des cellules Huh7 naïves ne reflètent pas entièrement la situation de cellules Huh7-Rep5.1, ni les cellules Huh7 infectées par le virus. En effet, la présence des *membranous web* et des protéines virales peuvent influencer la stabilité et protéger l'ARN viral des RNases cellulaires. De plus, la tige-boucle SLVI présente dans la séquence codante pour la protéine Core interagit avec une séquence en amont de l'IRES (Díaz-Toledano et al. 2009). La tige-boucle SLVI est absente du système minigénome. Or, l'interaction SLVI / IRES parait

impliquée dans la régulation de la traduction et de la stabilité des molécules (Ventura et al. soumis). Néanmoins les résultats obtenus avec ce modèle viennent appuyer les conclusions des expérimentations réalisées sur le virus.

Les résultats obtenus par les études sur la réplication virale ont, de plus, pu être consolidés par des analyses *in vitro* de la synthèse d'ARN. En effet, l'intégrité de la séquence de dimérisation est nécessaire pour une réplication efficace de l'ARN par la polymérase virale. Etant donné que disrupter la structure formée entre la 5BSL3.2 et la SL2 n'a pas de conséquence sur la synthèse, il semble que seule l'interaction intermoléculaire formée par la SL2 soit nécessaire à une synthèse efficace. Le fait que le niveau de synthèse *in vitro* reste non négligeable pourrait s'expliquer par la non-spécificité de la polymérase. En effet, la NS5B est capable de répliquer des ARN non relatés au VHC comme les homopolymères ou le D-RNA par exemple (Behrens, Tomei and De Francesco 1996). Ainsi il est vraisemblable qu'à côté d'une synthèse spécifique sensible à la présence d'un dimer, une synthèse « non spécifique » se développe sans être affecté par la structure de l'ARN. Les produits néo-synthétisés analysés sur gel dénaturant sont similaires entre les matrices sauvages et les matrices Kistem et TD ; cela évoque plutôt un défaut d'initiation que d'élongation lors de la synthèse d'ARN.



**Figure 49 : Schéma représentant le génome du VHC sous la forme monomérique (A) et dimérique (B).** Lorsque la séquence palindromique (en rouge) est impliquée dans la dimérisation, la tige-boucle SL2 prend une conformation ouverte et rend accessible la séquence opposée où l'ODN SL2\_14 (en vert) peut venir se fixer.



### Figure 50 : Retard sur gel de l'ARN WT<sub>555</sub> en présence des oligonucléotides SL2\_14 et ODN4.

Les oligonucléotides sont marqués radioactivement en 5' par de l'ATP- $\gamma P^{32}$ . Dix mille CPM (0,02 pmoles) de SL2-14 (puits 1 à 6) et d'ODN4 (puits 8 à 13) ont été incubés avec l'ARN WT<sub>555</sub> en dilué en série au 1/10 (20 pmoles à 0,2 fmoles) pendant 20 min à 30°C. Les échantillons sont déposés sur gel d'acrylamide 14%. L'ODN SL2\_14 et l'ODN4 ont été déposés seuls en piste 7 et 14 respectivement.

### I-2- Analyse de la dimérisation du génome du VHC in vitro

La dimérisation de l'extrémité 3' du brin positif a été étudiée par gel natif et SPR sur des petites molécules d'ARN ne dépassant pas les 98 nt (Shetty et al. 2010; Palau et al. 2013; Masante et al. 2015). L'objectif ici consistait à valider *in vitro* la présence de cette interaction intermoléculaire sur des matrices plus longues ou sur le génome entier du VHC.

Deux approches ont été exploitées afin de visualiser la dimérisation : l'une consistait en l'analyse du profil de migration de l'ARN génomique sur gel natif, l'autre en l'observation des structures de l'ARN génomique par cryo-microscopie.

L'ARN viral a été utilisé seul ou bien en présence d'un oligonucléotide (ODN) marqué soit radioactivement (gel natif), soit par des billes d'or (microscopie). L'ODN SL2\_14 a été conçu comme marqueur spécifique de la dimérisation. Lorsque la SL2 du 3'X entre en interaction avec une autre molécule au niveau de la séquence palindromique, la région complémentaire sur la tige SL2 devient simple brin. Cette séquence, située sur le côté 3' de la tige, apparait alors disponible pour la fixation de l'oligonucléotide complémentaire SL2\_14 (Figure 49). La région de fixation de l'ODN est intacte dans l'ARN WT et le mutant Kistem mais a été modifiée sur le mutant TD où le bulge interne permettant l'initiation de la dimérisation a été transloqué (Figure 40). Ainsi, seuls les ARN WT et Kistem seront utilisés pour ces expériences.

### I-2-1- Etude de la dimérisation par gel natif

### I-2-1-1- Mise en évidence de la dimérisation sur les 555 derniers nucléotides

Afin de valider le choix de l'oligonucléotide, la matrice sous génomique longue de 555 nucléotides a été utilisée. Elle débute en aval de la 5BSL3.2 et inclut l'intégralité de la 3'X. Dans un premier temps, la capacité de fixation de l'oligonucléotide SL2\_14 sur la matrice WT<sub>555</sub> a été vérifiée. L'ODN SL2\_14 et un oligonucléotide non relaté, l'ODN4, ont été marqués en 5' avec de l'ATP-P<sup>32</sup>. Ils ont ensuite été incubés avec l'ARN WT<sub>555</sub> dans un rapport ODN : ARN de 1 : 100 pour la plus forte concentration d'ARN avant d'être déposés sur un gel d'acrylamide natif. Comme le montre la Figure 50 un retard proportionnel à la quantité d'ARN est observé avec l'ODN SL2\_14 (pistes 1 à 6) alors que l'ODN4 contrôle (pistes 8 à 13) n'en provoque aucun. Ainsi, l'ODN SL2\_14 est capable de se fixer spécifiquement sur l'ARN WT<sub>555</sub>.

SL2\_14





### Figure 51 : Retard sur gel de l'ARN WT<sub>555</sub> et Kistem<sub>555</sub> en présence de l'oligonucléotide SL2-14.

Dix mille CPM (0,02 pmoles) de SL2-14 (puits 1 à 9) ont été incubés avec l'ARN WT<sub>555</sub> (puits 1 à 4) ou avec l'ARN Kistem<sub>555</sub> (puits 5 à 8) en dilution en série au 1/10 (20 pmoles à 0,02 pmoles) pendant 20 min à 30°C. Les échantillons sont déposés sur gel d'acrylamide 14%. L'ODN SL2\_14 a été déposé seul en piste 9.





## Figure 52 : Retard sur gel de l'ARN génomique $LMTV_{WT}$ et $LMTV_{kistem}$ et des ARN $WT_{555}$ et Kistem<sub>555</sub> en présence de l'oligonucléotide SL2-14.

Dix mille CPM (0,02 pmoles) de SL2-14 (puits 1 à 13) ont été incubés avec 2 pmoles d'ARN LMTV<sub>WT</sub> ou LMTV<sub>Kistem</sub> (piste 1 et 2), avec l'ARN WT<sub>555</sub> (pistes 3 à 7) ou avec l'ARN Kistem<sub>555</sub> (pistes 8 à 12) en dilution en série au 1/10 (20 pmoles à 0,002 pmoles) pendant 20 min à 30°C. Les échantillons sont déposés sur gel d'agarose à 1%. L'ODN SL2\_14 a été déposé seul en piste 14. Les flèches pointent sur les retard obtenus avec l'ARN LMTV et l'ARN WT<sub>555</sub>.

Dans un deuxième temps, l'ODN SL2\_14 est analysé pour sa capacité à sonder la dimérisation de la SL2 en utilisant l'ARN WT555 et Kistem555.

L'ODN SL2\_14 a été incubé avec des dilutions sérielles de l'ARN WT555 ou de l'ARN Kistem555 puis les échantillons ont été déposés sur gel d'acrylamide natif.

A concentration équivalente, l'ARN Kistem<sub>555</sub> muté pour la dimérisation n'entraine que 50% de retard par rapport à l'ARN WT<sub>555</sub> (Figure 51). A partir de 0,2 pmoles d'ARN, alors que le WT<sub>555</sub> permet encore la fixation de l'ODN SL2\_14, le Kistem<sub>555</sub> a perdu cette capacité. La différence observée entre ces deux matrices permet de conclure que la partie 5' de la tige de la SL2 est plus accessible pour l'ARN WT<sub>555</sub> que pour l'ARN Kistem<sub>555</sub>. Ces résultats confirment la présence d'une conformation dimérique dans le cas de l'ARN WT<sub>555</sub>, et indiquent que l'ODN SL2\_14 peut être utilisé comme marqueur de cette interaction intermoléculaire.

### I-2-1-2- Mise en évidence de la dimérisation sur l'ARN génomique

La dimérisation de l'extrémité 3' du brin positif étant montrée par gel retard sur des matrices de 555 nucléotides, l'expérience a été reproduite en présence de l'ARN génomique complet. Les gels d'acrylamide ne permettant pas une séparation de molécules de grande taille, un retard sur gel d'agarose a été réalisé.

Les ARN viraux LMTV<sub>WT</sub> et LMTV<sub>Kistem</sub> obtenus par transcription *in vitro* ont été incubés avec l'oligonucléotide SL2\_14 radiomarqué puis déposés sur le gel natif. Dans le cas du génome complet, un retard est observé sur le LMTV<sub>WT</sub> (Figure 52 piste 1) alors que le génome muté LMTV<sub>Kistem</sub> (piste 2) n'occasionne aucun déplacement de l'ODN SL2\_14. Les ARN WT<sub>555</sub> et Kistem<sub>555</sub> sont utilisés comme contrôles. De façon similaire au gel d'acrylamide, un retard significativement plus important pour les matrices WT<sub>555</sub> (piste 3 à 7) que pour les matrices Kistem<sub>555</sub> (piste 8 à 14) est retrouvé.

Les résultats de ces expériences suggèrent que le génome viral entier est capable de dimériser, au moins en solution, par le biais de sa séquence palindromique située au niveau du 3'X.

### I-2-2- Etude de la dimérisation par microscopie électronique

### I-2-2-1- Analyse de la dimérisation par coloration négative

Dans le but de visualiser la dimérisation de l'ARN par une approche plus directe, des expériences de microscopie électronique à transmission sur le génome entier du VHC ont été réalisées. Les résultats présentés ici ont été obtenus grâce à une collaboration avec Marion



Figure 53 : Observation par microscopie électronique après coloration négative des ARN génomiques sauvages et Kistem.

Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission FEI CM120.

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une camera 2kx2k Ultra Scan Gatan.

L'échelle est représentée sur l'image et les flèches rouges montrent l'ARN.



### Figure 54 : Observation par cryo-microscopie électronique après congélation des ARN génomiques sauvages.

Les échantillons contenant  $3.10^{11}$  molécules d'ARN dans 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et 10 mM de NaCl sont chauffés 2 min à 72°C, puis la température est abaissée à 30°C en 30 min avant congélation. Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission FEI CM120. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une camera 2kx2k Ultra Scan Gatan. L'échelle est représentée sur l'image. Les flèches rouges montrent l'ARN qui serait sous forme monomérique (A) ou dimérique (B). Decossas et Olivier Lambert (UMR 5248, Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets, Université de Bordeaux).

L'ARN LMTV<sub>WT</sub> a été déposé sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de carbone puis a été coloré à l'acétate d'uranyle. Des filaments d'ARN linéaires sont observés (Figure 53). Etant donné qu'aucune structure secondaire et/ou intramoléculaire n'est visible, il parait improbable de visualiser des interactions intermoléculaires en excluant une possible superposition de deux molécules. Cette expérience a été reproduite en faisant varier les concentrations de sel (Mg<sup>2+</sup>, NaCl) et en incluant différentes conditions de dénaturation/renaturation des ARN sans plus de succès. L'absence de structures au sein des molécules pouvant être due aux techniques de préparation des grilles a conduit à développer une autre approche de microscopie.

### I-2-2-2- Analyse de la dimérisation par cryo-microscopie

La cryo-microscopie électronique consiste à congeler rapidement des échantillons biologiques sous forme hydratés dans de l'azote liquide, de manière à les figer dans leur état natif dans une glace amorphe non cristalline. Cette technique a été appliquée à l'ARN viral LMTV<sub>WT</sub> qui a été incubé dans 2 mM Mg<sup>2+</sup> et 10 mM NaCl avant d'être congelé sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone non continu. Les molécules sont observées dans les trous de carbone ; elles sont inclues dans la glace amorphe. La forme des molécules observables Figure 54 est bien plus structurée que par coloration négative (Figure 53). En outre, plus les molécules sont structurées, plus le contraste est élevé facilitant ainsi l'observation. Les images permettent d'identifier ce qui pourrait être des tiges-boucles dans les parties les plus contrastées reliées par des régions moins structurées. Ainsi, un monomère peut être observé Figure 54-A alors que par la différence de taille et d'aspect, la Figure 54-B est compatible avec la présence d'un dimère de génomes.

### lère approche : Utilisation d'oligonucléotides marqués à l'or

Afin de vérifier que deux molécules sont bien dimérisées par l'intermédiaire de la séquence palindromique située dans la 3'X, une approche utilisant l'oligonucléotide SL2\_14 marqué en 3' avec une bille d'or de 10 nm a été mise en œuvre (Figure 55). En effet, comme démontré précédemment, l'oligonucléotide SL2\_14 peut permettre de détecter la structure dimérique. Dans ce cas, deux ODN SL2\_14 pourraient alors se fixer sur chacune des molécules lors de l'interaction intermoléculaire. Si l'ODN est greffé avec une bille d'or, deux billes devraient se



Figure 55 : Représentation schématique de la dimérisation et de la distance maximale de 27 nm (8 + 8 + 10,9) entre deux billes d'or de 10 nm.



Figure 56 : Représentation schématique du marquage des oligonucléotides SLA\_14 par les billes d'or.

	Rapport bille d'or : Oligo	Beta mercaptoéthanol
A0	1 :0	-
A1	1:1	-
A2	1 :10	-
A3	1:100	-
A4	1:1000	-
В0	1 :0	+
B1	1:1	+
В2	1 :10	+
В3	1 :100	+
B4	1 :1000	+

Tableau 2 : Préparation du marquage des oligonucléotides SL2\_14 par les billes d'or.

trouver à proximité dans le cas d'une dimérisation génomique. La séquence palindromique de 16 nt ayant une longueur connue (10.9 nm), la séparation entre les deux billes d'or portant l'ODN SL2\_14 ne devra pas excéder la longueur du palindrome augmentée de la longueur du spacer (8 nm) utilisé pour la fixation de la bille d'or à l'oligonucléotide. Les deux billes se retrouveraient alors à moins de 27 nm l'une de l'autre pour que l'image soit considérée comme représentative d'une dimérisation spécifique. Cette approche a pour but de distinguer les formes dimériques des autres formes de l'ARN présentant des structures double brins, qu'elles soient intra ou intermoléculaires.

### Préparation des oligonucléotides marqués à l'or (SL2\_14\_or)

L'oligonucléotide SL2\_14 a été fonctionnalisé par un thiol afin d'être greffé sur une bille d'or de 10 nm par l'intermédiaire d'un spacer Polyéthylène Glycol (PEG) - maléimide Figure 56. Ce spacer permet d'éloigner l'oligonucléotide de la surface de la bille afin de diminuer les interactions non spécifiques et l'encombrement stérique pouvant perturber la dimérisation. Cette synthèse a été réalisée par Stéphane Mornet, spécialiste de la chimie des Nanomatériaux (Institut de Chimie de la Matière condensée de Bordeaux-UPR9048 CNRS). Les billes d'or de 10 nm, recouvertes de PEG – maléimide, ont été incubées avec des quantités croissantes de l'oligonucléotide SL2\_14 (Tableau 2, A0 à A4). Un lot des SL2\_14\_or a été traité avec du bétamercaptoéthanol afin de neutraliser les charges générées par les PEG libres restants sur les billes (Tableau 2, B0 à B4).

Dans le but de contrôler le nombre d'oligonucléotides fixés par billes d'or pour maitriser les interactions lors des incubations précédent la microscopie, un certain nombre d'analyses ont été réalisées mais aucune n'a abouti. Le lot dont le rendement théorique s'élève à 100 ODN/bille et traité au  $\beta$ -mercaptoéthanol a alors été utilisé pour les observations (Tableau 2, B3).

### Observation par cryo-microscopie des ARN marqués avec l'oligonucléotide SL2\_14\_or

Pour observer la dimérisation, les ARN génomiques ont été incubés avec les ODN SL2\_14\_or avant d'être congelés sur les grilles de cuivre.

Les images de la Figure 57 sont représentatives des objets attendus avec la présence de deux billes d'or éloignées au plus de 27 nm. La cryo-microcopie électronique d'échantillons biologiques impose un type d'observation dit en mode « low dose » de par leur sensibilité aux électrons. En effet, l'irradiation de l'échantillon par les électrons induit sa destruction. La sélection des zones d'intérêt se fait donc à faible grossissement (environ x5000) où la dose


# Figure 57 : Observation par cryo-microscopie électronique après congélation des ARN génomiques en présence des billes SL2\_14\_or de 10 nm.

Les échantillons contenant  $3.10^{11}$  molécules d'ARN dans 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et 10 mM de NaCl sont chauffés 2 min à 72°C, la température est abaissée à 30°C en 30 min puis  $6.10^{10}$  molécules SL2\_14\_or sont ajoutées pour une incubation de 4 h à 30°C avant congélation.

Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission FEI CM120. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une camera 2kx2k Ultra Scan Gatan. L'échelle est représentée sur l'image. Les flèches rouges montrent l'ARN qui serait en présence de 2 billes d'or de 10 nm.

	2 billes	2 billes + ARN
HCV <sub>wT</sub> + Au-SL2	169	12
HCV <sub>WT</sub> + SL2 + AU-SL2	44	1
HCV <sub>kistem</sub> + Au-SL2	11	0

Tableau 3 : Analyse quantitative des ARN dimériques issu des images de cryo-microscopie.

d'électrons par unité de surface est plus faible qu'au grossissement utilisé pour le cliché (x50 000). A faible grossissement, seuls les objets bien contrastés sont visibles. Ainsi, pour réaliser une analyse quantitative, toutes les zones montrant deux billes d'or proches ont été sélectionnées puis imagées à fort grandissement.

La présence ou non d'ARN en contact avec ces billes a ensuite été quantifiée (tableau 3). Les différents échantillons analysés sont les suivants :

Echantillon 1 : L'ARN LMTV<sub>WT</sub> incubé en présence de l'ODN marqué à l'or SL2\_14\_or.
Cette préparation permettrait de quantifier les dimères génomiques.

- Echantillon 2 : L'ARN LMTV<sub>WT</sub> incubé en présence de l'ODN marqué à l'or SL2\_14\_or et en présence d'un compétiteur constitué par l'ODN SL2\_14 non marqué. L'ODN SL2\_14 devraient diminuer la fixation des ODN SL2\_14\_or en diminuant le nombre d'objets portant deux billes d'or observables.

Echantillon 3 : L'ARN LMTV<sub>Kistem</sub> incubé en présence de l'ODN marqué à l'or SL2\_14.
L'ARN muté pour la dimérisation servira de témoin négatif. Pas ou peu d'ARN doit être en présence de deux billes d'or.

Dans la première condition, 169 images ont été sélectionnées avec la présence de deux billes d'or suffisamment proches. Parmi les clichés, 12 images (soit 7 %) sont considérées comme positives puisque de l'ARN est présent sous les ODN SL2\_14\_or. Pour la seconde condition, 44 images ont été analysées pour la présence de deux billes d'or proches. Parmi elles, une seule contient aussi de l'ARN viral, soit 2 %. Enfin, la troisième condition ne présente aucune image identifiée avec de l'ARN sous les billes d'or pour 11 images contenant deux ODN SL2\_14\_or à moins de 27 nm.

Bien que le nombre d'images observées soit encore insuffisant, les données obtenues par cette approche sont encourageantes puisqu'elles suggèrent que l'ARN LMTV<sub>WT</sub> pourrait dimériser en solution.

# 2<sup>ème</sup> approche : Utilisation d'oligonucléotides marqués à l'or et marquage de l'extrémité 5'

Une nouvelle approche a été développée dans le but de renforcer les résultats précédents et de vérifier que les ARN qui dimérisent sont bien constitués de génomes entiers. Pour cela, alors que la région de dimérisation en 3' est marquée par l'ODN\_SL2\_14 couplé à des billes d'or de 10 nm, les extrémités 5' des génomes sont marquées par des billes d'or de 6 nm (Figure 58).



Figure 58 : Représentation schématique de la dimérisation en présence des SL2\_14 marqué par des billes d'or de 10 nm (orange) et des billes d'or de 6 nm marquant l'extrémité 5' des génomes (bleu).



Figure 59 : Vérification de l'intégrité des ARN génomiques non marqué (A) ou biotinylé (B) par électrophorèse capillaire.

Cent ng d'ARN ont été déposés sur une puce Nano600.



# Figure 60 : Vérification par électrophorèse capillaire de l'intégrité des ARN génomiques biotinylés et incubés avec les billes d'or couplées à la streptavidine.

Cent ng d'ARN LMTV passés sur des billes de streptavidine avant (A) et après traitement par 10 mM DTT (B) ont été déposés sur une puce Nano600

Ainsi, deux molécules intègres et dimériques devraient se retrouver en présence de deux billes d'or de 10 nm et de deux billes d'or de 6 nm.

# Préparation des échantillons

## Biotinylation des ARN

Le marquage permettant d'identifier l'extrémité 5' des génomes a été réalisé par une interaction entre la streptavidine couplée à des billes d'or de 6 nm et les ARN LMTV<sub>WT</sub> préalablement biotinylés.

La biotinylation des échantillons requiert plusieurs étapes de chauffage qui peuvent engendrer des dégradations de l'ARN. L'intégrité des génomes de 9700 nt a donc été contrôlée par électrophorèse capillaire. Les puces nano6000 d'Agilent utilisées lors de cette technique ne permettent pas d'identifier avec précision des tailles de molécules supérieures à 4000 nt mais permettent de déceler d'éventuelles dégradations de l'ARN.

Comme le montre la Figure 59, le profil de l'ARN biotinylé est similaire à celui du génome non traité avec un pic majoritaire au-delà de 4000 nt précédé d'un épaulement vraisemblablement dû à des structures secondaires et/ou tertiaires de l'ARN. Néanmoins, les ARN génomiques représentés par ce profil étant infectieux en culture cellulaire, ils sont considérés comme intègres. L'ARN biotinylé se présente donc sans traces notables de dégradation.

Afin de dénombrer les molécules correctement biotinylées pour connaitre le rendement de l'expérience et préparer les grilles à congeler dans les bonnes concentrations, les ARN ont été purifiés via des billes magnétiques couplées à la streptavidine puis analysés par RT-qPCR. Un ARN non biotinylé subissant le même traitement est utilisé comme contrôle négatif. La quantification des ARN biotinylés par cette technique ne fut pas concluante. Le manque de spécificité lors de la sélection des ARN par la streptavidine et / ou la présence de RNases dans les billes magnétiques peuvent en être la raison.

### - Traitement des billes streptavidine\_or

Aucun fournisseur n'a pu certifier l'absence de RNase dans les préparations de streptavidine couplées aux billes d'or de 6 nm. L'absence de RNase a alors été contrôlée en incubant les billes streptavidine\_or avec l'ARN viral puis en l'analysant par électrophorèse capillaire. La disparition du pic de haut poids moléculaire et l'apparition d'un pic de petite taille témoigne d'une dégradation quasi totale des ARN (Figure 60-A). Ces résultats indiquent que les billes streptavidine\_or seraient contaminées par des RNases.



Les échantillons contenant  $3.10^{11}$  molécules d'ARN dans 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et 10 mM de NaCl sont chauffés 2 min à 72°C, la température est abaissée à 30°C en 30 min puis  $6.10^{10}$  molécules SL2\_14\_or et  $3.10^{11}$  (A) ou  $6.10^{11}$  particules d'or\_stréptavidine (B) sont ajoutées pour une incubation de 4 h à 30°C avant congélation.

Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission FEI CM120. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une camera 2kx2k Ultra Scan Gatan. L'échelle est représentée sur l'image. Les flèches montrent la présence des billes d'or de 6 ou 10 nm.



Figure 62 : Observation par cryo-microscopie électronique après congélation des ARN génomiques.

Les échantillons contenant  $3.10^{11}$  molécules d'ARN sauvage (A) ou kistem (B) dans 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et 10 mM de NaCl sont chauffés 2 min à 72°C, puis la température est abaissée à 30°C en 30 min avant congélation.

Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission FEI CM120. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une camera 2kx2k Ultra Scan Gatan. L'échelle est représentée sur l'image. Les flèches rouges montrent l'ARN qui serait sous forme dimérique ou monomérique.

Afin d'inactiver ces dernières et pallier à ce problème, les billes ont été traitées au DTT (Pasloske and Wu 2004) puis incubées à nouveau avec l'ARN génomique. Comme le confirme l'électrophorèse capillaire (Figure 60-B), un pic majoritaire est présent au-delà de 4000 nt et le profil est similaire à la Figure 59. Le traitement au DTT semble donc efficace pour inactiver les RNases présentes dans les billes de streptavidine\_or.

# Observation par cryo-microscopie des ARN biotinylés / streptavidine\_or 6 nm / SL2\_14\_or 10 nm

La préparation des échantillons est identique à celle permettant les observations ARN / SL2\_14 à l'exception de l'ajout des billes d'or de 6 nm couplées à la streptavidine dans les rapports molaires ARN / streptavidine-or de 1 / 1 et 1 / 2. La Figure 61 représente le type d'image obtenue : les billes d'or de 6 nm couplées à la streptavidine ou celles de 10 nm couplées à l'oligonucléotide sont repérables. Néanmoins, l'ARN présent sur les grilles de cuivre est majoritairement non structuré et difficilement observable. De plus, les conditions optimales tendant à réduire le bruit de fond formé par des billes de 6 et 10 nm non fixées n'ont pas abouties.

## 3<sup>ème</sup> approche : Comparaison des génomes sauvages et mutés pour la dimérisation

Les approches de quantification via les billes d'or étant globalement peu concluantes, les expériences initiales avec des préparations contenant l'ARN génomique seul ont été renouvelées. Cette fois, les expériences ont été réalisées avec le génome sauvage et le génome Kistem pour lequel la dimérisation a été abolie. Afin de faire une comparaison statistique entre les génomes sauvages et mutés pour la dimérisation, une centaine d'images sont réalisées. L'observation des images obtenues semble indiquer la présence d'un plus grand nombre de dimères dans le cas de l'ARN sauvage (Figure 62-A) par rapport à l'ARN muté (Figure 62-B). Cependant, pour quantifier objectivement les monomères ou dimères et comparer la surface moyenne occupée par chaque objet, une analyse réalisée à l'aide d'un script développé sous Image J (NIH) par Jean-Christophe TAVEAU (Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets, UMR5248, Université de Bordeaux) sera utilisée. Brièvement, les étapes seront les suivantes (Figure 63) : à partir de l'image de base (1), une inversion du contraste ainsi qu'une étape de soustraction du bruit de fond (dû à l'inhomogénéité de la glace), puis une augmentation des contrastes seront réalisées (2). Les images seront ensuite seuillées (3) puis un masque binaire sera créé à partir de la dernière image (4). Sur ce masque, différents paramètres pourront



**Figure 63 : Approche quantitative par analyse des images de cryo-microscopie avec Image J.** L'image de base (1) subit une diminution du bruit de fond et inversion / augmentation des contrastes (2). Les images sont seuillées (3) puis soumises à un masque binaire (4).

être analysés comme la surface ou encore le centre de gravité des molécules. Les dernières acquisitions et les analyses des objets étant en cours, les résultats devraient être disponibles prochainement.

# I-2-3- Conclusion – discussion

Alors que la dimérisation de l'extrémité 3' du brin positif était analysée sur de petites molécules, les approches exploitées lors de la thèse par gel natif et microscopie électronique suggèrent que le génome entier du VHC est capable de dimériser *in vitro*.

L'oligonucléotide SL2\_14 a été utilisé comme marqueur de la dimérisation. La séquence complémentaire de l'ODN étant localisée sur la partie 3' de la tige-boucle SL2, seuls les molécules WT et Kistem ont été analysées puisque dans le mutant TD, cette région est modifiée par la translocation du bulge interne de la SL2.

Les analyses sur gel natif suggèrent la présence d'un dimère pour le génome sauvage. La dimérisation de l'ARN sauvage a pu être étayée par l'utilisation de molécules contenant les 555 derniers nucléotides de l'extrémité 3'.

Les expériences réalisées ici corroborent les travaux de Romero Lopez (Romero-Lopez et al. 2014) visant à étudier la structure de l'extrémité 3' du génome par des puces portant des oligonucléotides complémentaires de chaque région. En effet, en présence de l'IRES, la région 3' de la tige-boucle SL2 devient plus accessible à un oligonucléotide nommé 9550 alors que les oligonucléotides chevauchant la séquence palindromique ne sont pas en capacité de se lier. L'oligonucléotide 9550 cible la même région que l'oligonucléotide SL2\_14 utilisé au cours de la thèse. Ceci indique que la SL2 peut se présenter sous une forme « ouverte » ou la partie 5' est protégée alors que la partie 3' reste accessible. Ces données sont donc compatibles avec la dimérisation de deux molécules.

Dans un second temps, des expériences de microscopie électronique à transmission ont été réalisées sur les génomes sauvages et Kistem. La coloration négative ne fut pas concluante puisque les ARN visibles ne présentent pas de structure secondaire ; la visualisation d'une interaction intermoléculaire semblait donc compromise. La technique de coloration négative impliquant une étape de séchage de la grille, des effets de déstructuration ainsi que d'agrégation des molécules pourraient être à l'origine de la formation de structures linéaires qui auraient tendance à se rassembler. Bien que le type d'images obtenues soit similaire à celles présentées

au cours des travaux d'Isken et al. qui mettent en évidence une circularisation de l'ARN par l'implication de la PTB (Isken et al. 2007), une autre approche de microscopie a été exploitée au cours de la thèse. Afin de conserver une structure proche de celle prise par des ARN en solution, la cryo-microscopie fut exploitée. Plusieurs essais ont été réalisées en présence de l'oligonucléotide SL2\_14 marqué en 3' par des billes d'or de 10 nm mais les mises au point furent fastidieuses et prirent beaucoup de temps. En effet, la congélation et l'observation d'une seule condition nécessite la réservation de la plateforme pour plusieurs heures. De plus, lorsque les expériences ont été réalisées dans le but de marquer la dimérisation par les billes d'or de 10 nm et l'extrémité 5' par des billes d'or de 6 nm, les images obtenues présentent des objets similaires à celles analysées par coloration négative ; l'ARN y est principalement linéaire et non structuré. Cela peut être une conséquence de la biotinylation des génomes qui ont alors subit plusieurs traitements et étapes de chauffage. Ces expériences n'ont donc malheureusement pas pu être interprétées.

Ainsi, l'approche visant à analyser les ARN génomiques sauvages et Kistem seuls a été renouvelée. Les images obtenues (Figure 62) semblent permettre la différenciation entre les molécules monomériques et dimériques. De plus, le nombre de dimères visibles sur les préparations contenant l'ARN sauvage est plus important que sur l'ARN muté pour la dimérisation. Afin de pouvoir confirmer statistiquement et de caractériser la dimérisation du génome du VHC, l'analyse fine des images est en cours de réalisation.

Ces travaux sont aussi concordants avec les expériences de Gilmore et al. qui ont étudié l'architecture génomique du VHC par microscopie à force atomique (gilmore et al. 2014). En calculant le volume prit par chaque objet, les auteurs ont noté la présence de certaines molécules ayant un volume doublé, suggérant la présence de molécules dimériques.

11.11.11.11.11.11.11.11.11.11.11.11.11.	1   9110   9120   9130   9140   9150   9140   9230   9240     9110   9120   9130   9150   9160   9170   9190   9200   9230   9240     AGTIACTCTCCAGGTGAGATCATAGEGGTGGCTCCAGGGAAACTTGGGGGGGGGG	9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9350 9350 9370 9380 9397 TCTTCAACTGGGGCAGTAAGGCTCAAGCTCACTCACGGCGGGGGGGG	0 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9480 9490 9500 9500 9520 9530 954 IGCCTACTCCTACTTCTCTACTACTCACCCAACCCAATGAACGGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCAATCGGTTTTTTTTTT	0 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9640 9650 9660 9670 9680 969 TITCICCTITITITICCTITITITICCTITICTITICT
CTGATEACTCATTICTTCTCCCATCCTT		GIGGCAAGTACTTTTAACTGGGCAG	Baso 9400 9410 Sector Carter	
Con1 JFH-1	Con1 JFH-1	Con1 JFH-1	Con1 JFH-1	Con1 JFH-1

# Figure 64 : Alignement de l'extrémité 3' des séquences Con1 et JFH1.

La séquence de dimérisation est encerclée en orange.



# Figure 65 : Vérification de la présence de recombinants *in vitro*.

Les matrices Con1 + JFH1 ont été incubées pendant 2 h à  $30^{\circ}$ C avec (piste 2) ou sans la NS5B (piste 3) puis ils ont été reverse-transcrits avec la superscript III et amplifiés avec l'enzyme Phusion. Les amplicons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2 %. Le marqueur de taille DNA 1kb est déposé piste 1.

# I-3- Dimérisation du génome et recombinaison

# I-3-1- Analyse de la recombinaison in vitro

Les expériences précédentes indiquent que le génome du VHC dimérise *in vitro* et *in cellulo,* par ailleurs cette interaction intermoléculaire serait nécessaire pour une synthèse d'ARN efficace.

Chez certains rétrovirus, il est connu que la dimérisation de leur génome entraine la possibilité pour la polymérase virale de passer d'un brin à l'autre lors de la réplication de l'ARN ; ces « saut de brin » résultent en des recombinaisons.

Pour ce qui est du VHC, des recombinants ont été identifiés dans le sérum de patient, chez le chimpanzé et *in cellulo*. Le mécanisme privilégié lors de ces événements serait une recombinaison réplicative impliquant la polymérase virale. Cependant, les aspects moléculaires sont, aujourd'hui encore, méconnus.

Les expériences développées ici visent à déceler si l'extrémité 3' du génome et sa dimérisation seraient impliqués dans un changement de brin matrice par la RdRp.

La présence de recombinants a été recherchée entre les matrices ARN issues des souches Con1 (génotype 1b) et JFH1 (génotypes 2a). La région 3'X permettant la dimérisation est parfaitement conservée entre les différents isolats du VHC (Figure 64) ; une dimérisation intergénotypique est possible. En revanche, les nucléotides situés en amont sont suffisamment variables entre les virus Con1 et JFH1 pour pouvoir être identifiés (Figure 64).

Les 700 derniers nucléotides de l'extrémité 3' des deux virus ont été obtenus par transcription *in vitro*. Les ARN ont été incubés en présence (ou non) de la polymérase virale pour un test de synthèse *in vitro*. Par la suite, des amorces spécifiques ont été utilisées afin de déceler d'éventuels recombinants par RT-PCR. S'il y a des recombinants, le jeu d'amorce mixte devrait permettre l'obtention d'amplifias. Cela ne devrait pas être le cas en absence de la RdRp.

Les produits de synthèse catalysés par la RdRp sont ensuite rétro-transcrits avec l'amorce spécifique de la souche Con1 par la Superscript III. Après digestion de l'ARN par la RNaseH, la PCR est réalisée en présence de cette même amorce associée au primer JFH1\_stop. Les produits d'amplification issus des tests de synthèse en présence de la RdRp du VHC présentent un amplicon (Figure 65 piste 3) absent dans l'échantillon contrôle sans RdRp (Figure 65 piste 2). Ces résultats reproductibles semblent indiquer que la polymérase virale peut induire la formation de recombinants.



#### Figure 66 : Vérification de la présence de recombinants in vitro.

Les matrices Con1 + JFH1 ont été incubées conjointement pendant 2 h à 30°C avec (piste 2) ou sans la NS5B (piste 3) ou séparément avec la NS5B puis mélangés pour être reverse-transcrits avec la superscript III puis amplifiés avec l'enzyme Phusion (piste 4). Les amplicons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2%. Le ladder DNA 1kb est déposé piste 1.

Le séquençage de cet amplifia n'a pas conduit à des résultats probants et le manque de temps n'a pas permis de s'orienter vers des expériences de clonage / séquençage de ce produit. Néanmoins les résultats obtenus vont dans le sens d'une possible recombinaison lors de la synthèse d'ARN par la polymérase virale.

Afin de vérifier que les recombinants n'étaient pas la conséquence d'un saut de brin lors de la réverse transcription, d'autres contrôles ont été réalisés. Pour cela la synthèse des ARN par la RdRp du VHC a été effectuée avec :

Echantillon 1 : Matrices ARN de Con1 et JFH1 en présence de la NS5B

Echantillon 2 : Matrices ARN de Con1 et JFH1 en absence de la NS5B

Echantillon 3 : Matrice ARN de Con1 en présence de la NS5B

Echantillon 4 : Matrice ARN de JFH1 en présence de la NS5B

Par la suite, l'échantillon 1 et 2 ainsi qu'un mélange entre les échantillons 3 et 4 ont été soumis aux étapes de RT puis de PCR.

Les résultats attendus sont retrouvés Figure 66 puisqu'une bande est présente dans l'échantillon 1 (piste 2) alors qu'aucune bande n'est visible pour l'échantillon 2 (piste 3). Cependant, un amplicon similaire est décelable lorsque les produits de synthèse Con1 et JFH1 ont été mélangés pour l'étape de RT puis de PCR (piste 4). Ces données n'excluent pas le fait que de la recombinaison puisse être réalisée par la reverse transcriptase lors l'étape de RT. Néanmoins, le contrôle réalisé en absence de la NS5B semble pertinent et pourrait indiquer une possible recombinaison par la polymérase virale.

# I-3-2- Conclusion-discussion

D'autres données appuient le fait que la dimérisation génomique pourrait se produire lors de l'étape de réplication de l'ARN. En effet, plusieurs souches du VHC ont été rapportées comme issues de recombinaison inter-génotypiques, intra-génotypiques et intra-sous-typiques (Galli and Bukh 2014; Echeverría et al. 2015). Or, comme cela est décrit dans le cadre du VIH-1, la dimérisation du génome ARN entraine des événements de recombinaison. Le mécanisme implique un saut de la reverse transcriptase virale entre les deux brins dimérisés. Pour le VHC, la recombinaison pourrait aussi se produire de manière réplicative avec un changement de brin de la polymérase virale. Il est alors envisageable que la séquence palindromique permette le rapprochement de deux génomes parentaux, comme dans le cas du VIH-1. Cette hypothèse a été considérée lors de la thèse et les résultats obtenus, certes préliminaires, laissent à penser que

la polymérase virale pourrait effectivement réaliser ce saut de brin entre deux matrices proches lors de la réplication de l'ARN.

Lors des expériences de synthèse réalisées, plusieurs jeux de primer ont été utilisés afin de maximiser les chances d'amplifier des amplicons recombinants. Cependant, seul l'un des couples s'est avéré spécifique. Un amplifia marqueur de recombinaison a ainsi été retrouvé sur plusieurs tests indépendants. Le séquençage de l'amplicon n'a été tenté qu'une fois sur un produit de PCR et n'a pas permis de déterminer clairement la séquence de ce produit. Il faudrait reprendre ces expérimentations arrêtées par manque de temps et cloner les produits de PCR pour un séquençage efficace. Si la recombinaison s'avère réellement positive, les expériences pourraient être reproduites avec les matrices mutées pour la dimérisation. Cela permettrait de confirmer la présence et l'implication de cette interaction intermoléculaire au sein des événements de recombinaison. Cela permettrait aussi d'identifier si la polymérase est effectivement en capacité de faire du saut de brin, comme cela est le cas lors de la recombinaison des rétrovirus.

L'ensemble des résultats obtenus dans la première partie de cette thèse indiquent donc que l'ARN génomique du virus de l'Hépatite C dimérise et que cette interaction intermoléculaire est nécessaire à sa réplication.

# II- Structure et rôle de l'extrémité 3' du brin négatif

La première partie des résultats a pu montrer que l'ARN génomique dimérise au niveau de l'extrémité 3' du brin positif et que cette interaction est nécessaire pour une synthèse efficace de l'ARN. Si ce mécanisme est important pour le virus, il est envisageable que l'extrémité 3' du brin négatif, intermédiaire de réplication, possède des propriétés similaires. La structure secondaire de cette région, identifiée en 2002 par empreintes chimiques et enzymatiques, est constituée de plusieurs tige-boucles. Les travaux issus de trois études indépendantes (Schuster et al. 2002; Smith et al. 2002; Dutkiewicz et al. 2008) sont concordants quant à la conformation des cinq premières tige-boucles (nucléotides 1 à 230). Néanmoins, des structures plus complexes secondaires ou tertiaires n'ont pas été décrites au sein de cette extrémité. Ainsi, bien que l'extrémité 3' du brin négatif soit largement impliquée dans la synthèse d'ARN, les conformations de l'ARN engagées dans ce processus biologique ne sont pas clairement élucidées.

Au cours de cette étude, trois axes visant à analyser les interactions ARN, une possible dimérisation et leurs rôles dans la réplication virale ont été abordés :

- Le premier consistait à rechercher, à l'extrémité 3' de l'ARN (-), la région minimum impliquée dans la synthèse d'ARN.
- Le deuxième axe a conduit à identifier la présence de G-quadruplexes et à analyser leurs fonctions dans la réplication virale. Les résultats obtenus ont conduit à l'écriture d'un deuxième article bientôt soumis à publication.
- Enfin, le troisième axe s'est focalisé sur l'étude d'une séquence palindromique et son rôle éventuel dans la réplication de l'ARN.

Dans ce chapitre les séquences nucléotidiques seront numérotées de 3' en 5'.



### Figure 67 : Représentation schématique des virus chimériques.

Les IRES de différentes isolats viraux sont clonés en amont dans le squelette du virus LMTV codant la gaussia luciférase.



#### Figure 68 : Réplication de virus LMTV-Gluc possédant des IRES issus de divers isolats.

Quatre vingt mille cellules Huh7 sont transfectées par 1  $\mu$ g des LMTV-Gluc portant les divers IRES. L'expression de Gluc est mesurée dans 4  $\mu$ l de surnageant à 4, 24, 48 et 72h post-transfection. La figure est représentative de trois expériences indépendantes.

# II-1- Identification de la région de l'extrémité 3' de l'ARN (-) impliquée dans la synthèse de l'ARN

# II-1-1- Le niveau de la réplication virale est modulé par la nature de l'IRES

Lors d'une collaboration avec Cyrille Feray (INSERM U955, Créteil), l'activité des IRES de différents génotypes a été évaluée sur la réplication virale. Pour ce faire, ces IRES ont été clonés à la place de celui du JFH-1 dans le LMTV-GLuc (Figure 67). La production de Gaussia luciférase a été quantifiée à 4, 24, 48 et 72h post-transfection. Comme le montre la Figure 68, d'importantes variations sont observables entre les virus chimères alors que les ARN sont identiques de la protéine Core à l'extrémité 3'. Curieusement, le virus non modifié LMTV, portant le même IRES que le JFH1, est répliqué bien moins efficacement qu'avec un IRES de la souche H77 ou Con1.

Le rôle de l'activité traductionnelle des IRES et la stabilité des ARN viraux au cours de la réplication ont été analysés par l'équipe de Cyrille Feray. Les résultats qu'ils ont obtenus ne corrélaient pas avec les activités réplicatives des virus observées dans la Figure 68. L'hypothèse que les divergences au sein de la réplication virale pourraient être dues à des variations du niveau de synthèse de l'ARN (+) à partir de la matrice ARN (-) a alors été émise. En effet, lors de cette étape, la polymérase virale NS5B initie la synthèse d'ARN au niveau de l'extrémité 3' de sa matrice. Un brin complémentaire au génome, de polarité négative, est d'abord synthétisé puis sert à son tour à la production de nombreux génomes. L'IRES présent en 5' du brin (+) voit donc sa séquence complémentaire présente en 3' du brin (-), lieu d'initiation de la réplication de l'ARN.

# II-1-2- Le niveau de synthèse par la RdRp est modulé par la nature des IRES négatifs

Afin de vérifier cette hypothèse, des études sur les IRES négatifs de plusieurs isolats testés dans les expériences précédentes et / ou disponibles au laboratoire ont été réalisées. Ainsi, les 366 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin négatif des souches H77 (génotype 1a), J4L6 (génotype 1b), Con1 (génotype 1b) et JFH1 (génotype 2a) ont été soumis à des tests de synthèse par la RdRp. Dans un premier temps, la polymérase du JFH1 a été utilisée pour réaliser l'expérience. Au même titre que dans les analyses sur la réplication virale, la réplication de l'ARN est supérieure, pour l'IRES négatif de la souche H77 (normalisé à 100 %) à celle de la



Figure 69 : Effet des matrices issues des isolats H77, J4L6, Con1 et H77 et de leurs polymérases sur la synthèse d'ARN.

Les tests de synthèse avec la RdRp H77 (A), J4L6 (B), Con1 (C) et JFH1 (D) sont réalisés avec 8 pmoles de NS5B purifiée et 1 pmole d'ARN. Chaque test produit aux environs de 40 000 cpm qui sont rapportés au nombre de U présents dans la séquence puis normalisés à 100% pour la matrice H77 (moyenne  $\pm$  écartype sur 3 à 5 expériences indépendantes réalisées avec deux préparations d'ARN différentes).



# Figure 70 : Alignement des 366 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin négatif des souches H77, J4L6, Con1 et JFH1.

L'alignement est réalisé par le logiciel BioEdit (ClustalW). Les positions 157 et 208 sont représentées par des flèches rouges.

souche Con1 (90  $\pm$ 6 %) puis celle de JFH1 (32  $\pm$  2 %) (Figure 69-A). L'IRES négatif de la souche J4L6 a un niveau de réplication de l'ARN proche de la souche H77 (122  $\pm$  18%). Afin de savoir si la provenance de la polymérase a un effet sur la synthèse ou si seule la matrice en est responsable, le test est reproduit en présence de plusieurs RdRp. Les résultats présentent un profil similaire (Figure 69), que la polymérase utilisée provienne de la souche JFH1, H77, Con1 ou J4L6. Ces données, concordantes avec les réplications virales (Figure 68), indiquent que le génotype de l'IRES négatif utilisée serait responsable des variations obtenues au niveau de la réplication de l'ARN.

# II-1-3- Les 157 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin (-) sont responsables des variations de synthèse

La séquence des ARN étudiés présentent des variations nucléotidiques ; un alignement de séquence des souches H77, Con1, J4L6 et JFH1 est illustré Figure 70. L'alignement prend en référence la séquence de la souche H77. Alors que J4L6 ne présente que deux substitutions (204, 243), la souche Con1 en présente sept (10, 11, 12, 64, 35, 204, 243) et la souche JFH1 en présente vingt (1, 4, 11, 14, 28, 78, 107, 119, 179, 183, 187, 210, 213, 220, 223, 224, 262, 270, 302, 350).

Dans le but d'identifier quelles variations sont responsables des différences de synthèse, des ARN ont été synthétisés en délétant une partie de l'extrémité 5'. Ainsi deux nouvelles matrices ont été conçues :

L'une est constituée des 208 premiers nucléotides contenant les structures en tige-boucle SL-A1, SL-B1, SL-C1, SL-D1 et la moitié de la SL-E1 (Figure 71).

- L'autre est constituée des 157 premiers nucléotides contenant les structures en tige-boucle SL A1, SL-B1 et SL-C1 (Figure 71).

Les résultats obtenus à l'issu des tests de synthèse montrent des profils similaires quelle que soit la taille de l'ARN (Figure 72). Par rapport à la matrice H77, les matrices de J4L6 sont répliquées à des niveaux de synthèse proches ( $117 \pm 18$  % pour la matrice 208 et 95 ± 20% pour la matrice 157) tandis que la matrice Con1 est moins bien répliquée ( $65 \pm \%$  pour la matrice 208 et 65 ± 10 % pour la matrice 157) puis vient la matrice JFH1 ( $19 \pm 10$  % pour la matrice 208 et 26 ± 7 % pour la matrice 157).



Figure 71 : Représentation des matrices constituées des 366, 208 et 157 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin négatif de la souche H77.



Figure 72 : Test de synthèse réalisé avec la RdRp du virus J4L6 sur les matrices ARN H77, J4L6, Con1 et JFH1.

Les tests de synthèse avec la RdRp sont réalisés avec 8 pmoles de NS5B purifiée et 1 pmole d'ARN de 157 nt (A) ou 208 nt (B). Après incorporation d'UTP H3, les produits de synthèse sont filtrés et comptés au compteur à scintillation. Chaque test produit aux environs de 10 000 cpm qui sont rapportés au nombre de U présents dans la séquence puis normalisés à 100% pour la matrice H77 (moyenne  $\pm$  écartype sur 3 expériences indépendantes réalisées avec deux préparations d'ARN différentes).

Les différences de synthèse obtenues pour chacun des ARN sont comparables avec celle obtenues à partir des matrices longues de 366 nt. Le niveau de réplication de l'ARN semble donc dépendant de la souche virale et plus particulièrement des variations de séquences ou de structures présentes au sein des 157 premiers nucléotides du brin négatif.

# II-1-4- Conclusion – discussion

Alors que des études en collaboration avec le laboratoire de Cyrille Feray ont montré l'effet de différents IRES sur la réplication virale, ces variations ne semblent pas être corrélées avec les étapes de traduction et de stabilité de l'ARN. Les études réalisées au cours de cette thèse ont permis d'attribuer les variations réplicatives à la synthèse d'ARN issue de la séquence du brin négatif correspondant au 5'UTR des différentes souches.

Dans l'objectif de déterminer quelle est la région de l'IRES responsable de ces variations, des analyses ont été effectuées sur les 366, 208 et 157 premiers nucléotides du brin négatif. Les effets sur la synthèse d'ARN dépendant des souches utilisées ont ainsi pu se résumer aux 157 premiers nucléotides. Alors que *in cellulo*, la réplication du virus JFH1 est particulièrement efficace, la synthèse d'ARN du brin positif à partir de l'intermédiaire de réplication est la moins efficace parmi toutes les souches testées. Lorsque les séquences des 157 premiers nucléotides sont alignées en prenant le H77 comme référence, la souche Con1 présente 5 substitutions et la souche JFH1 en présente 8. Il est ainsi envisageable que l'une ou plusieurs de ces substitutions aient un effet sur la structure de l'ARN et donc affecte l'efficacité de la polymérase. Afin de percevoir une éventuelle hétérogénéité structurale des matrices, des gels natifs avec chacune de ces matrices auraient pu être réalisés.

Certaines études suggèrent que la RdRp commence la synthèse à la parfaite extrémité 3' de l'ARN négatif (Sesmero and Thorpe 2015) or, le JFH1 contient une substitution A-C à l'extrémité 3' du brin (-). Afin de savoir si ce changement est responsable des faibles capacités de synthèse (entre 10 et 30 %) par rapport au H77, la substitution a été réversée. Cette modification augmente sensiblement les niveaux de synthèse *in vitro* de la souche (Reigadas et al. 2001) mais ne permet pas d'atteindre le niveau obtenu pour l'ARN de Con1 ou de H77.



## Figure 73 : Analyse de l'hétérogénéité structurale des ARN sur gel natif.

Les ARN ont été marqué par incorporation d'UTP- $\alpha P^{32}$  lors de la transcription avec la T7 polymérase. Les trois gels sont indépendants.

A : Les ARN maintenus 1h30 à 30°C (piste 1 à 4) ou dénaturé à 70°C pendant 2 min puis diminués à 30°C en 1h30 (pistes 5 à 8) ont été incubés dans un tampon contenant 20 mM Tris, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (piste 1 et 5) et 40 mM LiCl (Piste 2 et 6) ,ou 40 mM de NaCl (Piste 3 et 7) ou de KCl (piste 4 et 8. La migration est réalisé avec 10 000 CPM dans un gel d'acrylamide 6 % pendant 1h à 160V puis 3h à 220V. Les gels présentés sont représentatifs de 3 expériences.

B : L'ARN H77 a été chauffé 2 min à 92°C puis 10 000 CPM sont déposés sur un gel dénaturant 6 % acrylamide 7M Urée.

C : L'ARN de 98 nt correspondant à la 3'X du brin positif est incubé 1h30 à 30°C dans un tampon contenant 20 mM Tris, 1mM DTT, 5mM MgCl2, 40 mM KCl puis la migration est réalisée avec 10 000 CPM dans un gel d'acrylamide 6 % pendant 1h à 160V puis 3h à 220V.

# II-2- A la recherche de la dimérisation du brin négatif

Les analyses précédentes ont permis de réduire l'étude de l'extrémité 3' du brin négatif pour son rôle dans la synthèse d'ARN aux 157 premiers nucléotides. Or, il a été montré au cours de la première partie que l'ARN génomique peut dimériser au niveau de son extrémité 3' et que cela conditionne une réplication efficace. L'hypothèse guidant les travaux sur l'extrémité 3' du brin (-) envisage la présence d'interactions intermoléculaires et d'une dynamique structurale de l'ARN qui pourraient être impliquées dans une régulation de la synthèse.

Ainsi, afin d'identifier une éventuelle complexité moléculaire issue d'une dynamique structurale, l'ARN matrice de 157 nucléotides issu de la souche H77 est déposé sur un gel natif après avoir été incubé dans différents tampons et conditions de température.

Trois bandes sont identifiables quel que soit le sel utilisé sur le gel natif (Figure 73-A, piste 1 à 4) alors que la matrice ne présente qu'une unique bande sur un gel dénaturant (Figure 73-B). Des conformations différentes semblent donc être présentes en solution. La bande supérieure (Figure 73-A, piste 1 à 4) serait compatible avec une éventuelle dimérisation de l'ARN comme c'est le cas avec la matrice 3'X (Figure 73-C). La bande intermédiaire de la Figure 73-A pourrait, quant à elle, correspondre à une structure monomérique alternative à la structure principale. En revanche, lorsque les matrices ont été chauffées, la bande correspondant au potentiel dimère n'est pas retrouvée, et ceci quelles que soient les conditions testées (Figure 73-A, piste 5 à 8).

Ces données indiquent que l'ARN de l'extrémité 3' du brin négatif semble être le siège d'une dynamique entre plusieurs structures, et comme pour l'extrémité 3' du brin génomique, il pourrait dimériser dans certaines conditions.

Les structures adoptées par l'ARN sont conditionnées par des interactions intra et vraisemblablement intermoléculaires. La présence de blocs de guanines au niveau de la tige boucle SL-C1 pourrait être le siège de cette alternative structurale. En effet des interactions nucléotidiques de type Hoogsteen nommées G-quadruplexes pourraient s'y former conduisant à une conformation différente des modèles Watson-Crick. Par ailleurs, la présence d'une séquence palindromique localisée entre les positions 82 et 89 inclus au niveau de la tige boucle SL-B1 pourrait être la base d'un mécanisme de dimérisation.

L'identification et le rôle de ces deux régions seront décrits dans la suite des résultats.



Figure 74 : Représentation graphique de la recherche de G-quadruplexes sur un alignement de 117 génomes du VHC en utilisant G4Hunter.



Figure 75 : Logo issus des alignements de 117 séquences du VHC représentant la séquence impliquée dans un potentiel G4 dans le somaine SL-C1.





Des tests de synthèse sont réalisés avec une matrice polyrA et 8 pmoles de RdRp en présence de concentration croissante des ligands AuPG (Gris clair) et PhenDC3 (Gris foncé). Les valeurs obtenues pour chaque synthèse sont normalisés à 100% pour ARN en absence de ligand.

# II-3- Caractérisation d'un G-quadruplex à l'extrémité 3' du brin négatif

## II-3-1- Analyse in silico

Le logiciel G4Hunter (Bedrat, Lacroix, and Mergny 2016) permet d'analyser la propension qu'a une séquence à se structurer en G-quadruplex (G4). Il prend en compte le nombre de G contigus et leur environnement pour établir un score croissant avec la probabilité d'une conformation en G4. Les C sont également analysés afin d'avoir le même type d'information pour le brin complémentaire. Chaque position pour un nucléotide a un score attribué entre -4 et 4. Le score est de 0 pour A ou T, positif pour les G et négatifs pour les C. Lorsqu'un seul G est présent, le score est de 1. Par la suite, chacun des G a un score de 2 pour une séquence GG, un score de 3 pour GGG et de 4 pour GGGG. Les C sont marqués de manière similaire mais avec des valeurs négatives. Ainsi, le score d'une séquence est centré sur 0 et un résultat > ou = à +1 indique un potentiel G4 sur le brin positif alors qu'un résultat < ou = à -1 représente le brin complémentaire. Un alignement de 177 séquences génomiques du VHC a été soumis à cet algorithme. Le score obtenu est de -1,1 entre les positions 110 et 131 (Figure 74) suggérant que la séquence située dans la SL-C1 à l'extrémité 3' du brin négatif pourrait former un G-quadruplex. De plus, les quatre blocs de guanine sont très conservés entre les différents isolats (Figure 75), renforçant l'idée de l'importance de cette région pour la réplication virale.

# II-3-2- Effet des ligands de G-quadruplexes sur la synthèse de l'ARN

Afin de cibler les G-quadruplexes, plusieurs variétés de ligands ont été développées. Ces derniers sont sélectionnés pour leur capacité à reconnaitre des quadruplexes en les distinguant des duplexes d'acides nucléiques. Ainsi spécifiques des G4, les ligands se lient sur ces structures et les stabilisent. Un des ligands le plus connu de la famille des bisquinoliniums nommé PhenDC3 (De Cian et al. 2007; Halder et al. 2011) ainsi qu'un ligand dérivé des porphyrines, nommé AuPG, seront utilisés.

Dans un premier temps, l'effet des ligands sur l'activité de la polymérase a été testé sur la synthèse d'ARN avec une matrice polyrA-oligoU qui ne peut pas former de G4. Comme le montre la Figure 76, à partir de 0.625  $\mu$ M, le ligand PhenDC3 affecte l'activité de la polymérase puisque la synthèse d'ARN diminue de 30%. Le ligand AuPG n'a pas d'effet visible à cette concentration. Les ligands seront utilisés à 0.5  $\mu$ M pour la suite des expériences.



### Figure 77 : Effet des ligands de G-quadruplexes sur la synthèse d'ARN<sub>157</sub>.

Les tests de synthèse sont réalisés avec 1 pmole des matrices sauvage (ARN<sub>157</sub> WT), 5BSL3.2 et polyrA préincubés avec 0,5  $\mu$ M de chaque ligand puis 8 pmoles de RdRp sont ajoutées dans le milieu réactionnel. Les produits de synthèse radioactifs sont purifiés puis quantifiés avec un compteur à scintillation (entre 10 000 et 30 000 CPM en fonction des matrices). Les valeurs obtenues sans ligands sont normalisés à 100 % pour chacun des ARN (moyenne ± écartype sur 3 ou 4 expériences indépendantes réalisées avec 2 ou 3 préparations d'ARN différentes).



Afin de savoir si les ligands de G4 ont un effet sur la synthèse d'ARN avec une matrice naturelle contenant potentiellement un G4, chaque ligand est incubé avec différentes matrices puis la RdRp est ajoutée et le niveau de synthèse quantifié. Les ARN utilisés ici sont respectivement les 157 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin négatif de la souche H77 (nommée WT), les 555 derniers nucléotides de l'extrémité 3' du brin positif ne présentant pas de G-quadruplexes potentiels (nommée 5BSL3.2) et le polyrA-oligoU (nommé polyrA). Le niveau de synthèse pour chaque matrice est rapporté à celui de la même matrice en absence de ligand (Figure 77). Une diminution drastique de la quantité d'ARN synthétisée est notable en présence des ligands PhenDC3 et AuPG ( $24 \pm 3 \%$  et  $32 \pm 9 \%$  respectivement) lorsque la matrice WT est utilisée. En revanche, les matrices contrôles 5BSL3.2 et polyrA-oligoU ne sont que très peu affectées.

L'effet des ligands PhenDC3 et AuPG sur la synthèse de l'ARN WT démontre leur capacité à se lier sur l'extrémité 3' du brin négatif de l'ARN du VHC. La présence de G-quadruplex dans cette région est donc probable. L'inhibition très modérée en présence des ARN polyrA et 5BSL3.2 est vraisemblablement dû à un léger effet des ligands sur la polymérase.

# II-3-3- Identification d'un G-quadruplex dans le domaine SL-C1

# II-3-3-1- Approches Biochimiques

Afin de confirmer la présence d'une telle structure et son importance dans la réplication de l'ARN, la région potentiellement responsable de la formation du G4 a été mutée.

#### Design du mutant DelG4

La séquence du G-quadruplex ayant été identifiée au niveau de la tige-boucle SL-C1, un mutant, nommé DelG4, a été conçu. Ce dernier conserve la structure en tige-boucle de la partie basse de la tige SL-C1 en substituant les ribonucléotides G-C impliqués dans ces interactions par des A-U. De plus, un des blocs GG en haut de la tige est remplacé par un CC (Figure 78).

# Effet de la mutation DelG4 sur la fixation des ligands de G4

La nouvelle matrice ARN de 157 nt DelG4 est soumise au test de synthèse en présence des ligands de G4. Les résultats présentés Figure 79 indiquent que la réplication de l'ARN DelG4



#### Figure 79 : Effet des ligands de G-quadruplexes sur la synthèse d'ARN DelG4.

Les tests de synthèse sont réalisés avec 1 pmole des matrices DelG4, 5BSL3.2 et polyrA pré-incubés avec 0,5  $\mu$ M de chaque ligand puis 8 pmoles de RdRp sont ajoutées dans le milieu réactionnel. Les produits de synthèse radioactifs sont purifiés puis quantifiés avec un compteur à scintillation (entre 3 000 et 30 000 CPM en fonction des matrices). Les valeurs obtenues sans ligands sont normalisées à 100% pour chacun des ARN (moyenne ± écartype sur 3 ou 4 expériences indépendantes réalisées avec 2 ou 3 préparations d'ARN différentes).



#### Figure 80 : Effet des cations Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup> sur la synthèse d'ARN.

Les tests de synthèse sont réalisés avec 1 pmole des matrices WT, DelG4, 5BSL3.2 et polyrA et 8 pmoles de RdRp dans des tampons contenant soit du Na<sup>+</sup>, du K<sup>+</sup> ou du Li<sup>+</sup>. Les produits de synthèse radioactifs sont purifiés puis quantifiés avec un compteur à scintillation (entre 3 000 et 30 000 CPM en fonction des matrices). Les valeurs obtenues en Na<sup>+</sup> sont normalisés à 100% pour chacun des ARN (moyenne  $\pm$  écartype sur 3 expériences indépendantes pour les conditions en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>).



# Figure 81 : Effet des matrices WT et DelG4 sur la synthèse d'ARN par la RdRp virale.

Les tests de synthèse sont réalisés avec 1 pmole des matrices WT et DelG4 en présence de 8 pmoles de RdRp. Les produits de synthèse radioactifs sont purifiés puis quantifiés avec un compteur à scintillation. La quantité de CPM est rapportée au nombre de U puis les valeurs obtenues pour le WT sont normalisés à 100 % (moyenne  $\pm$  écartype sur 7 expériences indépendantes avec trois préparations d'ARN différentes).

n'est pas plus affectée par les ligands PhenDC3 et AuPG ( $65 \pm 18$  % et  $70 \pm 4$ % respectivement) que celles des matrices 5BSL3.2 ( $68 \pm 14$  % et  $71 \pm 7$  % respectivement) et polyrA ( $89 \pm 31$  % et  $88 \pm 2$  % respectivement). Ces résultats montrant que les ligands n'ont plus d'effets sur la synthèse d'ARN à partir de la matrice DelG4 indiquent qu'un G-quadruplex était bien présent au niveau de la tige boucle SL-C1.

### Effet des cations sur les matrices sauvages et DelG4

Un G-quadruplex est stabilisé de façon plus ou moins importante selon la nature du cation présent dans le milieu ; la structure est plus stable en présence de potassium ( $K^+$ ), qu'en présence de sodium ( $Na^+$ ) ou de lithium ( $Li^+$ ).

Pour confirmer la présence du G4 sur l'ARN, ce dernier est analysé avec chacun des trois sels. L'expérience a été réalisée sur les matrices sauvages et DelG4 ainsi que sur les ARN 5BSL3.2 et polyrA afin de confirmer que les éventuels effets observés ne sont pas une conséquence de leur action sur la polymérase.

La quantité d'ARN synthétisée est normalisée à 100 % en présence de Na<sup>+</sup> puisqu'il est communément utilisé dans les tests de synthèse avec la NS5B du VHC. La Figure 80 montre que le niveau de synthèse est quasi nul en présence de lithium quelle que soit la matrice. Ce cation inhibe l'activité de la polymérase dans ce test. En revanche, le potassium, connu pour stabiliser les structures G4, diminue le niveau de synthèse de 30 % par rapport au Na<sup>+</sup> pour la matrice sauvage. Aucune différence significative entre les cations Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> n'est observée pour la matrice DelG4 qui ne forment plus de quadruplex. Comme attendu, les contrôles 5BSL3.2 et polyrA ne sont pas affectés par le changement de cation.

Ces résultats confirment la présence d'un G-quadruplex sur la matrice sauvage et indiquent que la stabilisation de cette structure réduit la synthèse d'ARN.

### Effet de la mutation DelG4 sur la synthèse d'ARN

### Analyse quantitative des produits de synthèse

Afin d'analyser l'importance de la structure en G-quadruplex de l'extrémité 3' du brin négatif dans la réplication de l'ARN, les matrices sauvages et DelG4 sont soumises à un test de synthèse. Lorsque l'ARN n'est plus en capacité de former un G4, le niveau de la synthèse est abaissé à  $26 \pm 7$  % par rapport à la matrice sauvage (Figure 81).

Ces résultats signifient que la formation du G-quadruplex est requise pour une synthèse d'ARN efficace par la RdRp virale. Cependant, les données précédentes indiquent que stabiliser le G4



# Figure 82 : Nature des produits de synthèse issus des matrices sauvage s(WT) et DelG4 en présence de différents cations et du ligand AuPG.

Une pmole des matrices ARN WT (piste 1 à 3) et DelG4 (piste 4 à 6) ont été mise en présence de 8 pmoles de RdRp pendant 2h à 30°C dans un tampon contenant du KCl (piste 1 et 4), du NaCl (piste 2 et 5) ou pré-incubée en présence du ligand AuPG pendant 10 min à 30°C (piste 3 et 6), Les échantillons sont chauffés 2' à 92°C avant d'être déposés sur gel d'acrylamide 6%, 7M urée à raison de 10 000 CPM/puits. Le gel est représentatif de 3 expériences indépendantes. Trois milles CPM de la matrice WT marquée par incorporation d'UTP- $\alpha$ P32 lors de la transcription avec la T7 polymérase sont déposés piste 7.



157 nt



# Figure 83 : Analyse de l'hétérogénéité structurale des ARN en présence ou non des ligands de G4.

Les ARN sauvage (piste 1 à 3), DelG4 (piste 4 à 6) et 3'X (piste 7 à 9) ont été marquée par incorporation d'UTP- $\alpha$ P32 lors de la transcription avec la T7 polymérase. Les échantillons sont incubés 30 min à 30°C dans 40 mM KCl, 5 mM MgCl2,1 mM DTT, 20 mM tris en présence des ligands AuPG (piste 2, 5 et 8) ou PhenDC3 (piste 3, 6 et 9) puis la migration est réalisée avec 10 000 CPM dans un gel d'acrylamide 6% pendant 1h à 160V puis 3h à 220V.

par le ligand ou le potassium affecte aussi la réplication de l'ARN. La structure formée par le quadruplex est donc nécessaire mais semble ne devoir pas être trop stable pour une synthèse efficace de l'ARN. La dynamique structurale de l'extrémité 3' du brin négatif, donc son changement de conformation, parait importante pour l'action de la polymérase virale NS5B.

#### Analyse qualitative des produits de synthèse

Pour déceler une éventuelle différence dans la nature des produits de synthèse issus d'une matrice pouvant former ou non des G-quadruplexes, les produits ont été déposés sur un gel d'acrylamide dénaturant. Les tests de synthèses ont été réalisés en utilisant les matrices sauvages et DelG4 en présence de différents cations ou du ligand AuPG.

L'ensemble des pistes (Figure 82, piste 1 à 6) présente une bande majoritaire qui correspond à la taille attendue du transcrit (puits 7). Que la matrice utilisée soit l'ARN WT ou DelG4, le cation utilisé ne semble pas influencer la qualité des produits puisque les profils obtenus en présence de K<sup>+</sup> et de Na<sup>+</sup> (puits 1 et 2 et 4 et 5 respectivement) sont similaires. En revanche, la présence du ligand AuPG induit un arrêt de synthèse spécifique à partir de la matrice sauvage (puits 3, flèche rouge). Cet arrêt pourrait être dû au G-quadruplex. Par ailleurs des produits de taille supérieure à la taille de la matrice sont visibles ; ils pourraient correspondre à des concatémères de produits néo-synthétisés. Leurs tailles atteindraient 2, 3 et 4 fois celle de la matrice pour l'ARN sauvage alors que seule une duplication est observable dans le cas de l'ARN DelG4. Pour ces deux matrices, l'utilisation de ligand réduit le niveau de concaténation. Enfin un produit de taille légèrement supérieure à la matrice apparaît pour l'ARN DelG4.

Ces résultats permettent de conclure que muter le G-quadruplex de la matrice ou bien le stabiliser par un ligand ont un effet sur la qualité des produits néo-synthétisés.

### Analyse par gel natif des matrices ARN

Afin d'identifier si PhenDC3 et AuPG influencent la structure de l'ARN matrice, les transcrits WT et DelG4 pré-incubés avec les ligands ont été déposés sur gel natif.

Les profils de migration Figure 83 montrent trois entités structurales pour la matrice sauvage (pistes 1 à 3) de manière similaire aux résultats précédents (Figure 73) alors qu'une conformation majoritaire n'est observable pour la matrice mutée (Figure 83 piste 4 à 6). En présence des ligands de G4, les profils sont identiques au sein de chacune des matrices. Les ligands sont décrits comme se fixant sur des G-quadruplexes déjà formés, ils ne semblent donc pas altérer la structure de l'ARN.



### Figure 84 : Analyse des produits de synthèse obtenus par la reverse transcriptase SuperScript III sur les matrices WT et DelG4.

Dix pmoles des ARN sauvages (Panel A) et DelG4 (Panel B) portant un polyA de 18 nucléotides au niveau de l'extrémité 3' sont incubés avec un primer polyT marqué au Cy5 et la SuperScript III dans un tampon sans sel ou bien en présence de 50, 100 ou 150 mM de KCl (piste 2 à 4) ou de LiCl (piste 5 à 7). Les ADNc produits sont déposé sur un gel dénaturant 8 % acrylamide, 7M Urée. Les pistes 1 et 9 représentent la migration des bleus de xylène cyanol (~75pb) et de bromophénol (~19pb). Les gels sont représentatifs de 7 expériences indépendantes.

В

Ces données suggèrent que, dans des conditions expérimentales similaires, la matrice DelG4 présente majoritairement une conformation monomérique alors que la matrice sauvage s'organiserait en trois conformations distinguables sur le gel : deux seraient monomériques et différemment structurées, l'autre pourrait être un dimère. Cette dimérisation serait donc conditionnée par la présence du G4 qui introduit la possibilité d'une dynamique au sein de ces trois structures.

#### Identification par reverse transcription

Une autre approche visant à détecter la présence de G-quadruplexes a été développée dans l'équipe de Kwork en 2015 (Kwok and Balasubramanian 2015). Ce dernier utilise la reverse transcriptase Superscript III, un primer ADN marqué au Cy5 en 5' et une matrice ARN portant un G4. Lorsque l'enzyme rencontre une structure en quadruplex, la synthèse de l'ADNc est bloquée. Une bande de taille inférieure à la matrice est alors visible sur un gel d'acrylamide dénaturant 7M urée.

Ainsi, les matrices WT et DelG4 ont été soumises à une reverse transcription par la Superscript III en présence de K<sup>+</sup> ou Li<sup>+</sup>. Lorsque l'enzyme reverse transcrit les matrices WT et DelG4, aucune bande de blocage n'est visible en présence de potassium (Figure 84-A et B respectivement, piste 3 à 5). En revanche, une bande apparait en présence de lithium sur la matrice WT (Figure 84-A, pistes 6 à 8) mais n'est pas présente sur la matrice DelG4 (Figure 84-B, pistes 6 à 8). Le blocage par la Superscript III peut être la résultante d'une enzyme plus sensible en présence de ce cation.

Le lithium n'inhibe pas la formation des G-quadruplexes, mais les rend légèrement moins stables, il est ainsi très probable que le G4 identifié au niveau des nucléotides 110 à 131 entraine un blocage de la reverse transcription, absent sur la matrice DelG4. Un changement de structures entre la matrice WT et la matrice DelG4 à lieu puisque les profils sont différents et l'enzyme a un arrêt précis sur la matrice sauvage.

# II-3-3-2- Approches biophysiques

Afin de confirmer la présence du G-quadruplex caractérisé par les approches biochimiques, des expériences de biophysique ont été réalisées en collaboration avec Samir Amrane, Carmelo Di Primo et Jean-Louis Mergny (IECB / US01 / UMS 3033 Inserm U1212 - CNRS UMR 5320) sur un ARN de 22 nucléotides correspondant à la région 110 – 131 de l'extrémité 3' (-). Tout d'abord, l'absorbance à 295 nm est mesurée en fonction de la température en présence de





Figure 85 : Evidences biophysiques de la formation d'un G4 sur l'ARN WT de 22 nucléotides.

A : Profils de fusion enregistrés à 295 nm en présence de 10 mM de tampon cacodylate de lithium , pH 7,0 à 22 ° C, contenant soit 100 mM de KCl , NaCl ou LiCl . L'ARN est concentré à 2,5 uM.

B : Spectre RMN enregistré dans 20 mM de tampon phosphate de potassium, pH 7 , contenant 70 mM KCI . La concentration de l'ARN était de 100  $\mu$ M.

C : Profils de dichroisme circulaires enregistrés à 263 nm en présence de 10 mM de tampon cacodylate de lithium , pH 7,0, contenant 10 mM de KCl. La concentration de l'ARN etait de 2,5 uM. la concentration PhenDC3 était de 0  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M et 5  $\mu$ M.





# Figure 86 : Activité des ligands de G4 sur la réplication virale.

Des dilutions sérielles du ligand AuPG ou PhenDC3 sont ajoutés sur 25 000 cellules Huh7 infectées par la suite avec 20  $\mu$ l de surnageant viral LMTV-Gluc. L'activité de la Gluc est mesurée après 48h de culture (moyenne ± écartype sur 3 expériences indépendantes en duplicate).

# Figure 87 : Cytotoxicité des ligands de G4 sur les cellules Huh7.

Des dilutions sérielles du ligand AuPG ou PhenDC3 sont ajoutées sur 25 000 cellules Huh7. Après 48h de culture la viabilité cellulaire est analysée grâce au Celltiter (Promega) (moyenne  $\pm$  écartype sur 2 expériences indépendantes en triplicate). différents sels (Figure 85-A). En effet, à cette longueur d'onde, une hypochromicité (diminution de l'absorbance à une certaine longueur d'onde) est caractéristique des structures en Gquadruplex est observable. Les profils d'UV-melting révèlent que la température de fusion est fortement dépendante du cation dans la solution (Mergny and Lacroix 2009). En présence de 100 mM de potassium, une forte transition avec une diminution de l'absorbance est observée pour une température de fusion de 71°C. Au contraire, de très faibles transitions sont observées en présence de sodium et lithium. En effet, la variation de l'absorbance est quasi nulle en fonction de la température à 295 nm (Figure 85-A). Ces résultats démontrent qu'une structure en G4 très stable est formée en présence de potassium sur la matrice de 22 nucléotides.

Le spectre obtenu par résonance magnétique nucléaire (RMN) dans des conditions en potassium indique la formation d'une conformation en G-quadruplex (Figure 85-B). En effet, les pics caractéristiques présents dans les régions 11 - 12 ppm indiquent la présence de ponts hydrogènes de type Hoogsteen impliqués dans la formation des tétrades de G. Ces résultats ont été confirmés par des expériences de dichroisme circulaire (CD) ; l'analyse de l'ellipticité donne aussi des informations sur les températures de fusion. Comme attendu avec une faible concentration de potassium (10 mM), le Tm de la séquence diminue de 71°C (Figure 85-A) à 53°C (Figure 85-C) en absence de ligand (courbe noire). Le Tm est donc dépendant du K<sup>+</sup>, caractéristique d'un G4 stabilisé par ce cation. En présence de 1 à 2 fois plus de ligand PhenDC3 que d'ARN, la température de fusion a un  $\Delta_{Tm}$  passant de 11 à 18°C respectivement. Cet effet confirme donc la capacité de l'ARN à former un G-quadruplex stabilisé par PhenDC3.

De façon concordante avec les résultats obtenus par des approches biochimiques sur les 157 premiers nucléotides de l'extrémité 3' (-), les analyses de biophysique confirme que la séquence de 22 nucléotides présente au sein de la tige-boucle SL-C1 peut former un G-quadruplex en solution.

# II-3-4- Effet des ligands de G-quadruplexes sur la réplication du VHC

Les ligands PhenDC3 et AUPG ayant un effet inhibiteur sur la synthèse d'ARN *in vitro*, il est possible qu'ils puissent perturber le cycle du VHC et ainsi être utilisés contre l'infection. Pour répondre à cette question, des cellules Huh7 ont été infectées par le virus LMTV, en présence de ces ligands.

La réplication virale est drastiquement impactée par les deux ligands, avec un IC<sub>50</sub> de 0.3  $\mu$ M pour AuPG et 0.5  $\mu$ M pour PhenDC3 (Figure 86) sans que la viabilité cellulaire soit notablement affectée (Figure 87).

Les analyses réalisées *in silico* tendant à prévoir la formation potentielle de G4 sur le génome du VHC ont identifié au moins un autre site avec un score > à 1 sur le brin positif. Bien que cette structure n'ait pas été caractérisée, il n'est pas impossible qu'elle soit aussi impliquée dans une régulation du cycle viral et que les ligands de G4 aient un effet. Ces molécules ayant potentiellement plusieurs cibles sur le VHC, elles pourraient être intéressantes comme approche thérapeutique.

# II-3-5- Conclusion – discussion

### Identification d'un G-quadruplexs à l'extrémité 3' du brin (-)

Dans un premier temps, des analyses bio-informatiques ont décelé la présence de deux Gquadruplexes potentiels. Un premier pourrait être situé dans la région codante de l'ARN génomique et un second au sein des 157 premiers nucléotides de l'ARN négatif, intermédiaire de réplication. Seul ce dernier a été caractérisé au cours de la thèse.

Par des approches biochimiques, des ligands se fixant spécifiquement aux G4 et non aux duplexes d'ARN ont montré un effet sur la synthèse *in vitro*. Afin de confirmer la présence d'un G-quadruplex, la région identifiée comme impliquée dans sa formation a été mutée (DelG4) puis la nouvelle matrice a été soumise au test de synthèse en présence des ligands. La disparition de l'effet des ligands sur le mutant indique que le G-quadruplex a été abolie. Il est décrit que la nature du cation présent dans la solution a un effet sur la stabilité du G4 (K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup>). Ainsi le potassium a un effet plus marqué que le sodium sur l'ARN sauvage alors qu'il n'en a pas sur la matrice mutée DelG4. Ces données indiquent qu'un G-quadruplex pourrait se former en impliquant la séquence située du côté 3' de la tige-boucle SL-C1 ; il pourrait ainsi exister une dynamique structurale de l'ARN entre une conformation en duplexe (tige-boucle) et une conformation en G-quadruplex.

Les expériences réalisées avec la reverse transcriptase Superscript III ont été basées sur les travaux de Kwork (Kwok and Balasubramanian 2015). Ces derniers proposent une méthode de détection des G-quadruplexes en analysant l'arrêt de la reverse transcriptase lorsqu'elle rencontre ces structures. Leurs travaux sont réalisés sur de petites séquences ARN (25 à 40 nucléotides) déjà connues comme formant des G4 par approches biophysiques. Ainsi, en présence de 150 mM potassium, l'enzyme s'arrête de copier la matrice au niveau du G4 et une


## Figure 88 : Prédiction de la structure secondaire de l'extrémité 3' de l'ARN négatif d'après Smith et al. 2002 (A) et Schuster et al. 2002 (B).

A- les sites de clivages pour les Rnases T2 (carrés), A (triangles), T1 (cercles) sont représentés somme majoritaires (symboles noirs) ou minoritaires (symboles blancs).

B- représentation des réactivités au DMS et CMCT (cercles), sensibilités à la Rnase V1 (triangles), clivages au plomb (carrés). Les nucléotides non réactifs n'ont pas de symboles et les nucléotides dont la réactivité n'est pas déterminée sont encerclés.

bande d'arrêt devient visible par gel dénaturant. En revanche, pour une même concentration de lithium, leur ARN est parfaitement rétro-transcrit.

Les matrices ARN sauvage et DelG4 ont donc été soumises à ce test. L'expérience n'a pas été concluante sur les matrices de 157 nt. Alors qu'il n'y a pas de bande de blocage en potassium sur la matrice sauvage ou DelG4, une différence des produits de synthèse est observée en présence de lithium. Dès lors que 50 mM de ce cation sont présent dans le mélange réactionnel et que la concentration augmente jusqu'à 150 mM, l'enzyme est de moins en moins efficace. Cette donnée n'apparait pas dans les travaux de Kwork. La Superscript III parait alors se bloquer particulièrement au niveau des nucléotides 105 à 110 dans le cas de la matrice sauvage uniquement. Cette région peut à la fois correspondre au début du G4 comme au début de la structure en tige-boucle SL-C1. Les échelles réalisées au cours des expériences n'ont pas permis de localiser plus finement la bande d'arrêt. Ces données mettent donc en évidence une différence de structure entre l'ARN sauvage et muté (DelG4) mais pour autant, la présence d'un G4 n'a pu être certifiée. Il est possible que la Superscript III, dans ces conditions, puisse se bloquer sur une structure en tige boucle stable autant que sur un G-quadruplex. En effet, le mutant DelG4 a été conçu dans le but de faire disparaître le G4 tout en gardant la structure en tige-boucle. Cependant, les interactions G-C ou G-U ont été remplacées par des interactions A-U qui peuvent faciliter l'ouverture de la tige-boucle SL-C1 et expliquer l'absence d'arrêt de la polymérase.

L'identification du G-quadruplex impliquant la séquence 110-131 a été confirmée par nos collaborateurs en utilisant des approches biophysiques. Ces derniers ont démontré la présence d'une telle structure par résonnance magnétique nucléaire avec un spectre caractéristique des G4 ; par l'analyse des profils d'UV-melting indiquant qu'en présence de potassium uniquement, une transition structurale est observée pour une température de fusion de 71°C ; et enfin par dichroïsme circulaire qui confirme l'interaction avec le ligand PhenDC3, spécifique des G4.

Les structures préalablement publiées décrivent une conformation en tige-boucle formant le domaine SL-C1 (Schuster et al. 2002; Smith et al. 2002). La formation d'un G-quadruplex n'était pas mentionnée lors de ces travaux. Dans la structure proposée par Smith et al., les  $G_{114}$  et  $G_{115}$  sont sensibles à la RNAse T1 et les nucléotides opposés dans la tige  $U_{142}$  et  $C_{143}$  sont sensibles à la RNAse A (Figure 88-A). Cette région pourrait donc ne pas être exclusivement engagée dans une interaction Watson-Crick. De plus, dans le modèle de Schuster et al., les nucléotides  $G_{121}$ ,  $G_{122}$  et  $G_{123}$  sont légèrement réactifs au plomb (Figure 88-B), indiquant que

cette région pourrait être engagée dans une structure alternative telle qu'une conformation en G-quadruplex. Ces indications et les données obtenues lors de ce travail indiquent que les séquences de l'extrémité 3' du brin négatif pourraient se présenter sous différentes conformations conduisant à une dynamique structurale de l'extrémité 3' du brin négatif.

#### Rôle des G-quadruplexes dans la réplication virale

Lors de l'identification du G-quadruplex par les approches biochimiques, deux résultats apparemment contradictoire, quant à son rôle dans la synthèse d'ARN, ont été obtenus : stabiliser le G4 par des inhibiteur ou du potassium affecte la synthèse mais supprimer le G4 par mutation provoque aussi une diminution de la synthèse par la RdRp. Une hypothèse serait qu'une dynamique entre les structures d'ARN, pouvant être médiée par la formation / déformation du G-quadruplex semble nécessaire au bon fonctionnement de la polymérase virale.

La séquence impliquée dans le G-quadruplex étant localisée entre les nucléotides 110 à 131 du brin négatif, il est délicat d'insérer le mutant dans le génome viral puisque la séquence sur le brin positif correspond à la région de l'IRES entre les domaines II et III, domaines impliqués dans la traduction des protéines virales. C'est donc l'effet des ligands de G4 qui a été analysé sur la réplication du virus *in cellulo*. Ces molécules inhibent la réplication virale sans être cytotoxique pour la cellule. Bien que cela ne soit pas restreint au G-quadruplex identifié en 3' du brin intermédiaire de réplication et puisse agir sur d'autres potentiels G4 du génome, ces données suggèrent que ces ligands pourraient avoir un rôle antiviral contre le VHC. De plus, le fait qu'il y ait probablement plusieurs cibles des ligands de G4 sur le génome du VHC permettrait de diminuer les mécanismes d'échappement du virus envers ces molécules.



Figure 89 : Représentation schématique des 157 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin négatif.

La séquence palindromique est entourée en rose, l'ODN7 est schématisé en vert et la séquence impliquée dans le G-quadruplexe est en bleu.



A. Les ARN ont été marquées par incorporation d'UTP- $\alpha$ P32 lors de la transcription avec la T7 polymérase. Les échantillons sont incubés 30 min à 30°C dans 40 mM KCl, 5 mM MgCl2,1 mM DTT, 20 mM tris en puis la migration est réalisée avec 10 000 CPM dans un gel d'acrylamide 6% pendant 1h à 160V puis 3h à 220V.

B. Un  $\mu$ g des ARN WT et DelG4 ainsi que le ladder DNA 1kb sont déposés dans un gel d'agarose 2 % puis colorés au Bromure d'éthidium après la migration.



## Figure 91 : Analyse de la dimérisation de la SL-B1 par SPR.

L'ARN biotinylé SL-B1 a été fixé sur une puce de streptavidine puis son homologue non marqué à été injecté à 50  $\mu$ l/min.



## Figure 92 : Effet des matrices WT et DelB1 sur la synthèse d'ARN par la RdRp virale.

Les tests de synthèse sont réalisés avec 1 pmole des matrices WT et DelB1 en présence de 8 pmoles de RdRp. Les produits de synthèse radioactifs sont purifiés puis quantifiés avec un compteur à scintillation. La quantité de CPM est rapportée au nombre de U puis les valeurs obtenues pour le WT sont normalisés à 100 % (moyenne  $\pm$  écartype sur 3 expériences indépendantes).

#### II-4- Dimérisation de l'extrémité 3' du brin négatif

#### II-4-1- Implication de la SL-B1 dans la dimérisation

Lors des analyses précédentes, il a été montré sur gel d'acrylamide natif que l'ARN sauvage de 157 nucléotides adopte plusieurs conformations (Figures 73 et 83), l'une d'entre elles pouvant correspondre à un dimère. L'identification de la région de la molécule responsable de cette interaction intermoléculaire a donc été recherchée. Deux domaines pouvaient être candidats : la SL-B1 où une séquence palindromique a été identifiée, ou la SL-C1 qui présente un G-quadruplex (Figure 89).

Lorsque la séquence formant le G4 est mutée (DelG4) au sein de la SL-C1, l'ARN présente la même hétérogénéité structurale que l'ARN sauvage puisque plusieurs bandes sont décelables après migration sur gel d'acrylamide (Figure 90-A) ou sur gel d'agarose (Figure 90-B). La délétion du G-quadruplex provoque tout de même une diminution importante des formes alternatives. Néanmoins, une entité pouvant correspondre au dimère est présente avec chacune des matrices. Le G-quadruplex n'est donc pas directement impliqué dans la dimérisation.

L'autre domaine pouvant être responsable de la dimérisation est le domaine SL-B1 qui comporte une séquence palindromique entre les nucléotides 82 et 89 parfaitement conservée au sein des souches du VHC. Dans le but de savoir si la SL-B1 peut dimériser, cette région de 83 nucléotides a été transcrite *in vitro* puis analysée par SPR (W. Palau, IECB, ARNA). Lorsque la SL-B1 immobilisée par de la biotine sur le une puce de streptavidine et voit son homologue injecté, le sensorgramme présente une augmentation de signal (Figure 91). Cela indique une interaction entre les deux molécules et que la région SL-B1 est en capacité de se dimériser.

Afin d'évaluer le rôle de la tige-boucle SL-B1 dans la synthèse de l'ARN, cette dernière a été délétée de l'ARN<sub>157</sub> (DelB1). La matrice alors constituée des structures SL-A1 et SL-C1 a été analysée lors de tests de synthèse par la polymérase virale. Ainsi lorsque la boucle SL-B1 est absente de l'ARN, le niveau de synthèse est abaissé à  $34 \pm 5$  % par rapport à la matrice sauvage (Figure 92). Ces résultats soulignent l'importance du domaine SL-B1, pouvant dimériser, pour une synthèse efficace d'ARN *in vitro*.



Figure 93 : Effet de l'ODN7 sur la synthèse d'ARN à partir des matrices de 157 WT, DelG4 et 366 WT.

Les tests de synthèse sont réalisés avec 8 pmoles de RdRp, 1 pmole de chaque ARN et 2  $\mu$ M d'ODN7. Les matrices et l'oligonucléotide sont incubés avant l'ajout de la polymérase à 30°C pendant 30 min ou 62°C 5 min puis la température diminue à 30°C en 30 min. Les produits de synthèse radioactifs sont purifiés puis quantifiés avec un compteur à scintillation. La quantité de CPM est rapportée au nombre de U puis les valeurs obtenues pour les ARN sans l'ODN7 sont normalisés à 100 % (moyenne ± écartype sur 2 ou 3 expériences indépendantes).

#### II-4-2- Importance de la dynamique structurale dans la synthèse de l'ARN

II-4-2-1- Effet d'un oligonucléotide complémentaire à la séquence palindromique sur la synthèse de l'ARN

Lors de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, l'effet de plusieurs oligonucléotides complémentaires de l'extrémité 3' du brin (-) sur la synthèse d'ARN a été analysé (Reigadas et al. 2003). Les auteurs identifient alors un oligonucléotide anti-sens, l'ODN7, comme inhibant l'initiation de la synthèse de l'ARN. Les raisons de cet effet, inconnues, suggèrent tout de même l'importance de la région complémentaire à l'ODN7 dans la réplication. Or, en ré-analysant ces données, il s'avère que l'ODN7 chevauche la séquence palindromique de la structure SL-B1. Il est donc envisageable que l'oligonucléotide puisse affecter la dimérisation de l'ARN en se liant sur la région palindromique. Ainsi, comme dans le cas de l'ARN par la RdRp.

Les études de Reigadas et al. ont été réalisées sur la matrice de l'IRES négatif long de 366 nucléotides (Reigadas et al. 2003). Afin de vérifier l'hypothèse proposée, l'effet de l'ODN7 sur la synthèse de l'ARN a été analysé sur les matrices de 157 nt sauvage et DelG4 (Figure 93). Alors que la synthèse à partir de la matrice de 366 nt est inhibée de 65 % en présence de l'ODN7, ce dernier n'a aucun effet sur la matrice de 157 nt WT. De manière surprenante, il entraine une augmentation de deux fois du niveau de la synthèse à partir de la matrice DelG4. La pré-incubation entre les matrices et l'oligonucléotide n'influence que très peu les résultats (Figure 93), qu'elle soit réalisée à 30°C ou qu'il y ait une dénaturation à 62°C puis renaturation à 30°C afin de faciliter l'accessibilité de l'ODN à sa séquence complémentaire.

II-4-2-2- Fixation de l'oligonucléotide complémentaire à la séquence palindromique sur les matrices ARN

Afin d'étayer ces données, l'accessibilité de la séquence palindromique sur les matrices sauvages et DelG4 pour la fixation de l'ODN7 a été analysée par gel retard (Figure 94).

Il est important de noter que les profils de migration pour les molécules de 157 nt observables sur les Figures 73 et 83 sont caractérisés par trois bandes dont la moins rapide est vraisemblablement constituée d'un dimère. Au contraire, la Figure 94 ne montre qu'une seule bande révélant une homogénéité conformationnelle. Ces résultats discordants sont à mettre en



#### Figure 94 : Analyse de la fixation de l'ODN7 sur les matrices 157 WT et DelG4 par gel retard.

Les ARN WT (piste 1 à 3) et DelG4 (piste 4 à 8) sont marqués à l'ATP- $\gamma P^{32}$  à leur extrémité 5' par le biais d'une kinase. Les ARN sont ensuite pré-incubé avec l'ODN7 en NaCl à 30°C (piste 2 et 5) ou à 65°C (piste 6), en KCl à 30°C (piste 3 et 7) ou à 65°C (piste 8). La migration est réalisée avec 10 000 CPM dans un gel acrylamide natif 8% pendant 1h à 100V puis 3h à 200V. Le gel est représentatif 2 expériences indépendantes.

relation avec la méthode d'obtention des ARN radioactifs. L'hétérogénéité observable sur les gels est toujours corrélée à un marquage de l'ARN obtenu par transcription in vitro en présence d'UTP- $\alpha$ -P<sup>32</sup>; la conformation homogène de la matrice sauvage est retrouvée lorsque le marquage de l'ARN est réalisé par kinase et par l'ATP- $\gamma$ -P<sup>32</sup>. Cette dernière méthode de production inclut plusieurs étapes de chauffage qui, comme le montre la Figure 73, conduisent à une structure monomérique. Malheureusement ces conclusions ne sont apparues que tardivement au cours des travaux de thèse et toutes les expériences n'ont pu être renouvelées avec un ARN marqué lors de la transcription par de l'ATP- $\gamma$ -P<sup>32</sup>. Les expériences suivantes ont alors été réalisées avec des ARN marqués par de l'ATP- $\gamma$ -P<sup>32</sup>.

Après la pré-incubation de l'ODN7 avec les matrices ARN, les échantillons sont déposés sur un gel natif. En absence de l'oligonucléotide, la matrice sauvage présente une bande majoritaire de 157 nucléotides (Figure 94, piste 1) ; elle diffère donc des gels natifs préalablement présentés, probablement en raison du mode de préparation de l'échantillon. Néanmoins la migration de l'ARN est retardée en présence de l'ODN7, que ce dernier soit pré-incubé en présence de Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup> (piste 1 sans l'ODN7 versus pistes 2 et 3 avec l'ODN7). Lorsque la matrice DelG4 est déposée seule dans la piste 4, le profil de migration ne présente également qu'une conformation majoritaire. Lorsque l'ODN7 est pré-incubé avec l'ARN DelG4 un léger retard est observable, principalement pour les échantillons chauffés à 62°C (pistes 6 et 8). Dans ces conditions, l'ODN7 se fixe donc sur la matrice sauvage et, dans une moindre mesure, sur la matrice DelG4.

#### II-4-3- Conclusion – discussion

Les résultats obtenus précédemment et au sein de cette partie semblent indiquer qu'au même titre que pour le brin génomique, l'extrémité 3' du brin négatif est capable de dimériser.

Plusieurs conformations des 157 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du brin (-) sont observables en gel natif lorsque l'ARN est radio-marqué lors de la transcription *in vitro*. Bien que la forme moléculaire prépondérante soit vraisemblablement le monomère, une bande pouvant correspondre à un dimère est visible, et ce, principalement sur la matrice sauvage (Figure 83 et 90). La matrice mutée pour le G-quadruplex est tout aussi hétérogène au niveau structural mais les formes alternatives sont moins représentées. Cela qui pourrait indiquer que la mutation du G4 altère la dynamique de la molécule. Le fait que les différents cations (Na<sup>+</sup> et

 $K^+$ ) présents lors de l'incubation n'aient pas d'effets visibles sur la migration de l'ARN laisse présager que la dimérisation ne serait pas directement liée au G-quadruplex. La dimérisation serait plutôt liée à une interaction de type Watson-Crick, potentiellement conduite par la séquence palindromique de la région SL-B1. Ces données sont concordantes avec les analyses de SPR qui démontrent une interaction intermoléculaire entre deux molécules constituées des domaines SL-B1. La faible constante d'association entre les deux molécules (7.5x10<sup>-3</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) pourrait être la résultante d'une structure en tige-boucle qui doit d'abord s'ouvrir avant de permettre une interaction avec une autre molécule (Dausse et al. 2016). Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait muter la séquence palindromique afin d'analyser si la dimérisation est affectée.

Un autre argument démontrant l'importance de la séquence palindromique est l'effet de l'ODN7 complémentaire à cette région sur la réplication de l'ARN *in vitro*. Avec l'ARN de 366 nt, l'initiation de la synthèse par la RdRp est abolie lorsque l'ODN7 est fixé à sa matrice (Reigadas et al. 2003). Au contraire, dans les conditions expérimentées, aucun effet de l'oligonucléotide n'est observable pour la matrice sauvage de 157 nt alors qu'il permet une augmentation de deux fois de la synthèse de l'ARN DelG4 (Figure 93). Dans le but de vérifier que l'ODN se fixait correctement sur la matrice, des gels retard ont été réalisés. Les résultats obtenus indiquent que l'ODN7 se fixe plus efficacement sur la matrice sauvage que sur la matrice DelG4. Cependant, comme il est décrit dans les résultats, la méthode de marquage radioactif de l'ARN utilisée semble influencer sa structure. Il est nécessaire de reproduire ces expériences ; au moins trois approches sont envisageables. Des expériences de SPR devraient pouvoir répondre à cette problématique. Il est aussi possible de marquer les ARN lors de la transcription *in vitro*, ce qui maintient l'hétérogénéité conformationnelle, ou bien de marquer l'ODN7. Les retards entre les deux molécules (ARN et ODN), dont l'une marquée, seront analysés par gel natif.

Néanmoins, le fait que l'ODN7 fixe mieux l'ARN<sub>157</sub> sauvage plaide encore pour une dynamique structurale accrue comparée à la matrice où le G-quadruplex a été délétée. Comme décrit par SPR avec l'ARN SL-B1, les constantes d'association sont faibles, vraisemblablement du a la stabilité de la structure en tige-boucle de cette région. Cette structure doit s'ouvrir pour que l'ODN7 vienne s'y positionner. Cette « ouverture » semble plus aisée dans le cas de l'ARN sauvage, indiquant que la présence du G-quadruplex induirait un ARN dynamique avec un équilibre structural. Pourtant, un effet sur la synthèse n'est observable que sur la matrice mutée. En présence de l'ODN7, la matrice DelG4 retrouve un niveau de réplication similaire à la

matrice WT. D'un point de vu structural, l'ARN DelG4 semble être moins dynamique entre les différentes conformations que l'ARN sauvage. L'ODN7 pourrait ainsi augmenter la synthèse du DelG4 en forçant l'ouverture de la SL-B1 et donc en réintroduisant une dynamique entre différentes structures, nécessaire à la polymérase.

# CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

# **Conclusion générale -Perspectives**

Le génome du Virus de l'Hépatite C est constitué d'un ARN monocaténaire linéaire, de polarité positive et long de 9600 bases. Il est au centre de trois étapes qui assurent la réplication du virus : il doit être traduit pour produire les protéines permettant sa réplication et son encapsidation, il doit être répliqué puis il doit être encapsidé. Une commutation entre les différentes étapes du cycle doit donc se produire pour que l'infection virale soit productive. L'ARN du VHC est une molécule polyvalente qui porte des informations fonctionnelles dans sa séquence primaire et au sein de ses structures secondaires et tertiaires. C'est ainsi que la dynamique structurale de l'ARN viral permettra, par son changement de conformation et le recrutement de protéines, la régulation du cycle réplicatif.

Lors de la réplication de l'ARN génomique, la synthèse est réalisée par la RdRp codée par le virus. Cette enzyme polymérise un nouvel ARN en se déplaçant de 3' en 5' sur la matrice. Un ARN génomique complémentaire, de polarité négative, sera d'abord synthétisé comme intermédiaire de réplication. Il servira ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins positifs. Les mécanismes qui président au recrutement de la polymérase et à l'initiation de la synthèse d'ARN restent aujourd'hui mal connus. Les résultats obtenus au cours de cette thèse éclairent d'un jour nouveau certain de ces aspects. En effet, les structures prises par les extrémités 3' de l'ARN génomique et de l'ARN négatif sont vraisemblablement impliquées dans une régulation de la réplication.

Les travaux de cette thèse, d'abord réalisés sur le brin génomique, ont montré que ce dernier peut dimériser via une séquence palindromique située dans la tige-boucle SL2 du 3'UTR. Lorsque le rôle de cette interaction a été analysé sur le cycle viral, les résultats indiquent que l'étape de réplication de l'ARN nécessite la dimérisation de deux molécules. Cependant, la dimérisation (identifiée SL2 / SL2) est en compétition, sein de l'extrémité 3' du génome, avec d'autres interactions impliquant notamment le domaine 5BSL3.2. Des interactions ARN-ARN longues distances entre la 5BSL3.2 et l'IRES (5BSL3.2 / IIID), la région 9110 située en amont

(5BSL3.2 / seq9110) et la structure SL2 (5BSL3.2 / SL2) interviennent, elles aussi, au cours du cycle viral. Il est donc probable que le changement de conformation issu des différentes interactions et la structuration en dimères au niveau de l'extrémité 3' soit nécessaire pour une synthèse efficace de l'ARN.

Les travaux réalisés sur l'ARN négatif ont, eux aussi, décelé la capacité de l'extrémité 3' à dimériser. Comme pour le brin génomique, l'intégrité de ces structures est essentielle pour le bon fonctionnement de la polymérase. Une séquence palindromique ainsi que la présence de G-quadruplexes seraient impliqués dans une dynamique structurale complexe dont l'un des intermédiaires constituerait un dimère d'ARN.

Que le G-quadruplexe présent dans la SL-C1 soit stabilisé ou absent, la synthèse de l'ARN par la polymérase est affectée. Le G-quadruplexe est donc indispensable à une synthèse efficace mais ne doit pas être trop stable afin de permettre un potentiel remaniement structural vers la conformation en tige-boucle SL-C1. D'un point de vu mécanistique, la dimérisation de la molécule se produirait via la structure SL-B1 et possiblement grâce à la séquence palindromique. Les résultats obtenus lors de la thèse laissent à penser que la présence du G-quadruplexe introduit la dynamique adéquate pour un recrutement de la RdRp et / ou une initiation efficace de la synthèse de l'ARN. Au moins deux conformations exclusives ont donc été mises en évidence : l'une où la tige-boucle SL-C1 est fermée dans une interaction de type Watson-Crick, l'autre où une partie de la séquence se trouve dans une structure en quadruplex de type Hoogsteen. L'ouverture de la tige SL-C1 lors de la formation du G4 pourrait avoir un effet sur la dynamique de la tige-boucle SL-B1 et ainsi faciliter la dimérisation. Une partie de ce travail et actuellement soumis à publication.

La conclusion majeure de ces recherches est la suivante : une dynamique structurale de l'ARN pouvant conduire à la dimérisation au niveau des extrémités 3' du brin génomique et de l'intermédiaire de réplication semble requise pour une synthèse efficace de l'ARN par la polymérase virale.

De ce fait, de nouvelles hypothèses quant au fonctionnement de la polymérase virale doivent être envisagées. Par exemple, comment gère-t-elle un ARN qui a dimérisé ?

En effet, le mécanisme d'initiation de la RdRp du VHC reste à être précisé. La polymérase réplique la matrice en agissant de l'extrémité 3' vers 5'. Pour autant, le site de fixation de l'enzyme n'est pas consensuel ni sur le brin génomique, ni sur le brin négatif. Lorsque des

équipes ont essayé de mapper la polymérase sur sa matrice au niveau du brin génomique, chacune des régions analysées, de la séquence Cter de la NS5B à l'extrémité 3', semble impliquée (Cheng, Chang, and Chang 1999; Oh, Ito, and Lai 1999; Shim et al. 2002; Binder et al. 2007; Chinnaswamy et al. 2008). Il est donc vraisemblable que la NS5B n'ait pas de site de fixation défini sur les matrices étudiées. Par ailleurs, l'initiation de la synthèse *in vitro* ne se ferait pas toujours à l'extrémité 3' de l'ARN positif. En effet, les produits de synthèse obtenus lors de la thèse (Figure 48) et lors de résultats antérieurs du laboratoire démontrent la présence d'une initiation interne. En outre, il a été montré que la RdRp peut se fixer sur un ARN rendu circulaire (Ranjith-Kumar and Kao 2006).

La polymérase du VHC ne se fixant vraisemblablement pas à l'extrémité 3' des ARN, une autre mécanistique doit être envisagée.

Les structures issues d'interactions longue-distance pourraient être impliquées mais l'hypothèse d'une fixation aléatoire de la RdRp sur l'ARN suivie d'un déplacement de la polymérase à la recherche de l'extrémité 3' de la matrice pourrait également expliquer les résultats obtenus. Ce glissement de la RdRp du VHC a été suggéré (Chinnaswamy et al. 2008) puis démontré par des expériences de FRET en 2014 (Karam et al. 2014). Karam et al. proposent un modèle où la polymérase se déplace sur sa matrice de 5' en 3' jusqu'au bon positionnement de l'extrémité 3' de l'ARN dans son site actif. A ma connaissance, seul cet article décrit un tel processus pour la RdRp du VHC. En revanche, ce mécanisme a été suggéré et décrit pour d'autres enzymes. Par exemple, la RT du VIH-1 a été démontrée comme « glissant » sur sa matrice afin de faciliter son bon positionnement à l'extrémité de son amorce (Liu et al. 2008). Le basculement conformationnel de l'enzyme et son déplacement peuvent alors être combinés dans une série complexe de mouvements afin d'améliorer l'efficacité de la RT. Le génome du virus de la mosaïque jaune du navet est un ARN positif ; le site d'initiation de la RdRp sur sa matrice n'étant pas identifié, Singh et Dreher proposent que la polymérase virale scanne l'ARN structuré jusqu'à trouver son site d'initiation (Singh and Dreher 1998). La capacité de scanner pour les RdRp est aussi proposée au sein de plusieurs virus à ARN négatif tels que le Sandai Virus (Kolakofsky et al. 2004; Plattet et al. 2007) et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Tang, Bendjennat, and Saffarian 2014; Tang, Bendjennat, and Saffarian 2016). Ce mécanisme, dans le cadre du VHC, pourrait expliquer le fait que de nombreuses équipes, dont la mienne, ont échoué dans l'identification d'un site de fixation de la polymérase sur l'ARN.

Par ailleurs, la RdRp du VHC doit changer de conformation en passant d'une forme dite « fermée » à une forme « ouverte ». Cela permettrait un élargissement du site actif afin de laisser place à la matrice et son duplexe, l'ARN néo-synthétisé (Harrus et al. 2010). Ici encore, les mécanismes du basculement conformationnel restent à être caractérisés. Il a été suggéré que la liaison d'une molécule de GTP au sein de la NS5B pourrait induire ce changement structural (Bressanelli et al. 2002; Ranjith-Kumar et al. 2003). Cependant, un autre modèle est aussi proposé : la polymérase pourrait s'oligomériser afin de permettre son passage de la forme fermée à la forme ouverte (Wang et al. 2002; Labonté et al. 2002; Cramer, Jaeger, and Restle 2006). Il a aussi été suggéré que l'interaction entre les différents domaines de la RdRp promeut l'initiation *de novo* de la synthèse d'ARN (Chinnaswamy et al. 2010). De plus, l'oligomérisation entre les sous unités de la polymérase a été rapportée comme améliorant la synthèse d'ARN pour la RdRp du poliovirus (Lyle et al. 2002) et du norovirus (Högbom et al. 2009). L'oligomérisation de la NS5B est donc vraisemblablement nécessaire à son changement conformationnel et à la synthèse de l'ARN. Les mécanismes moléculaires qui permettent un rapprochement des polymérases induisant leur interaction restent à être identifiés.

En se basant sur les nouvelles données issues des travaux décrits dans ce mémoire et les recherches d'autres équipes, un nouveau modèle de fonctionnement de la polymérase du VHC peut être proposé. La RdRp, au cours de son glissement sur la matrice vers l'extrémité 3' rencontrera la structure dimérique. Ce phénomène se produisant sur chacun des deux brins d'ARN du dimère, deux polymérases se retrouveraient à proximité et pourraient ainsi s'oligomériser. Le changement de conformation, guidé par les autres interactions ARN-ARN des extrémités 3', entrainerait un dynamisme moléculaire qui permettrait aux molécules de retrouver leurs formes monomériques nécessaire à la synthèse de l'ARN. Cette dynamique pourrait ainsi se présenter comme un « contrôle qualité » qui permettrait à la polymérase de vérifier l'intégrité des extrémités 3' de l'ARN.

Afin de vérifier ces hypothèses, une approche par des pinces magnétiques permettant l'analyse de molécule unique pourrait aussi être développée (Manosas et al. 2010; Manosas et al. 2012; Salas, Gocheva, and Nöllmann 2015). Dans ce cas, une première molécule d'ARN marquée en 3' par la digoxigénine, serait fixée sur un support en verre activé par les anticorps correspondants. La seconde étape consisterait à incuber une seconde molécule du même ARN afin de conduire à une dimérisation. Ce second ARN serait marqué en 3' par de la biotine. Le complexe bimoléculaire pourrait ainsi être caractérisé avec des billes magnétiques où la streptavidine a été fixée. Ce système permettrait de visualiser chacune des billes en vidéo microscopie. L'application d'un champ magnétique contrôlé permettrait d'atteindre les

constantes physiques de l'association entre les deux ARN dans des conditions variables de tampons ( $K^+$ ,  $Li^+$  ou ligand de G4 par exemple), en présence ou en absence de la RdRp. Si un changement conformationnel de l'ARN vers une forme monomérique s'effectue après la fixation de la polymérase, la disruption du dimer pourrait ainsi être observable par disparition de la bille magnétique. Ces expériences seraient réalisées sur les extrémités 3' de l'ARN positif et négatif du VHC.

Dans le but de savoir si la dimérisation de l'ARN faciliterait l'interaction entre deux polymérases, des expériences de *pull down*, double hybride ou BiFC (*«bimolecular fluorescence complementation »*) par exemple pourraient être réalisées en présence des matrices dimérisants ou mutées pour la dimérisation.

# REFERENCES

## Références

Agarwala, Prachi, Satyaprakash Pandey, and Souvik Maiti 2015 The Tale of RNA G-Quadruplex. Organic & Biomolecular Chemistry 13(20): 5570– 5585.

Alatrakchi, Nadia, and Margaret Koziel 2009 Regulatory T Cells and Viral Liver Disease. Journal of Viral Hepatitis 16(4): 223–229.

Alter, HarveyJ., PaulV. Holland, RobertH. Purcell, and Hans Popper 1978 Originally Published as Volume 1, Issue 8062TRANSMISSIBLE AGENT IN NON-A, NON-B HEPATITIS. The Lancet 311(8062): 459–463.

Amako, Yutaka, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, et al. 2010 Pathogenesis of Hepatitis C Virus Infection in Tupaia Belangeri. Journal of Virology 84(1): 303–311.

André, Patrice, Gabriel Perlemuter, Agata Budkowska, Christian Bréchot, and Vincent Lotteau 2005 Hepatitis C Virus Particles and Lipoprotein Metabolism. Seminars in Liver Disease 25(1): 93–104.

Appel, Nicole, Margarita Zayas, Sven Miller, et al.
2008 Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. PLoS Pathogens 4(3): e1000035.

Artusi, Sara, Matteo Nadai, Rosalba Perrone, et al. 2015 The Herpes Simplex Virus-1 Genome Contains Multiple Clusters of Repeated G-Quadruplex: Implications for the Antiviral Activity of a G-Quadruplex Ligand. Antiviral Research 118: 123–131.

Ashworth Briggs, Esther L., Rafael G. B. Gomes, Malaz Elhussein, et al. 2015 Interaction between the NS4B Amphipathic Helix, AH2, and Charged Lipid Headgroups Alters Membrane Morphology and AH2 Oligomeric State--Implications for the Hepatitis C Virus Life Cycle. Biochimica Et Biophysica Acta 1848(8): 1671–1677.

Bartenschlager, Ralf 2004 Unexpected Host Range of Hepatitis C Virus Replicons. Hepatology (Baltimore, Md.) 39(3): 835–838.

Bartenschlager, Ralf, Francois Penin, Volker Lohmann, and Patrice André
2011 Assembly of Infectious Hepatitis C Virus Particles. Trends in Microbiology 19(2): 95–103.

Barth, Heidi, Christiane Schafer, Mohammed I. Adah, et al.

2003 Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. The Journal of Biological Chemistry 278(42): 41003–41012.

Bartosch, Birke, Jean Dubuisson, and François-Loïc Cosset 2003 Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-Particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. The Journal of Experimental Medicine 197(5): 633–642.

Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong, and T. J. Liang
1998 Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells.
Journal of Virology 72(5): 3827–3836.

Bedrat, Amina, Laurent Lacroix, and Jean-Louis Mergny 2016 Re-Evaluation of G-Quadruplex Propensity with G4Hunter. Nucleic Acids Research 44(4): 1746–1759.

Behrens, S. E., L. Tomei, and R. De Francesco 1996 Identification and Properties of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Hepatitis C Virus. EMBO Journal 15: 12–22.

Behrens, S E, L Tomei, and R De Francesco 1996 Identification and Properties of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Hepatitis C Virus. The EMBO Journal 15(1): 12–22.

Berger, Kristi L., Jacob D. Cooper, Nicholas S. Heaton, et al. 2009 Roles for Endocytic Trafficking and Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha in Hepatitis C Virus Replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(18): 7577–7582.

Billerbeck, Eva, Ype de Jong, Marcus Dorner, Cynthia de la Fuente, and Alexander Ploss 2013 Animal Models for Hepatitis C. Current Topics in Microbiology and Immunology 369: 49–86.

Binder, Marco, Doris Quinkert, Olga Bochkarova, et al. 2007 Identification of Determinants Involved in Initiation of Hepatitis C Virus RNA Synthesis by Using Intergenotypic Replicase Chimeras. Journal of Virology 81(10): 5270– 5283.

Blackard, Jason T., Nyingi Kemmer, and Kenneth E. Sherman 2006 Extrahepatic Replication of HCV: Insights into Clinical Manifestations and Biological Consequences. Hepatology (Baltimore, Md.) 44(1): 15–22.

Blackard, Jason T., M. Tarek Shata, Norah J. Shire, and Kenneth E. Sherman 2008 Acute Hepatitis C Virus Infection: A Chronic Problem. Hepatology (Baltimore, Md.) 47(1): 321–331.

Blanchard, Emmanuelle, Sandrine Belouzard, Lucie Goueslain, et al. 2006 Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. Journal of Virology 80(14): 6964–6972.

Blight, K J, and C M Rice

1997 Secondary Structure Determination of the Conserved 98-Base Sequence at the 3' Terminus of Hepatitis C Virus Genome RNA. Journal of Virology 71(10): 7345–7352.

Blight, Keril J., Jane A. McKeating, and Charles M. Rice 2002 Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. Journal of Virology 76(24): 13001–13014.

Boni, Sébastien, Jean-Pierre Lavergne, Steeve Boulant, and Annie Cahour 2005 Hepatitis C Virus Core Protein Acts as a Trans-Modulating Factor on Internal Translation Initiation of the Viral RNA. The Journal of Biological Chemistry 280(18): 17737–17748.

Boulant, Steeve, Roland Montserret, R. Graham Hope, et al. 2006 Structural Determinants That Target the Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets. The Journal of Biological Chemistry 281(31): 22236–22247.

Bressanelli, Stéphane, Licia Tomei, Félix A. Rey, and Raffaele De Francesco 2002 Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides. Journal of Virology 76(7): 3482–3492.

Brimacombe, Claire L., Joe Grove, Luke W. Meredith, et al. 2011 Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. Journal of Virology 85(1): 596–605.

Bugaut, Anthony, and Shankar Balasubramanian
2012 5'-UTR RNA G-Quadruplexes: Translation Regulation and Targeting. Nucleic Acids
Research 40(11): 4727–4741.

Bukong, Terence N., Fatemeh Momen-Heravi, Karen Kodys, Shashi Bala, and Gyongyi Szabo

2014 Exosomes from Hepatitis C Infected Patients Transmit HCV Infection and Contain Replication Competent Viral RNA in Complex with Ago2-miR122-HSP90. PLOS Pathog 10(10): e1004424.

Burge, Sarah, Gary N. Parkinson, Pascale Hazel, Alan K. Todd, and Stephen Neidle 2006 Quadruplex DNA: Sequence, Topology and Structure. Nucleic Acids Research 34(19): 5402–5415.

Butcher, Samuel E., and Anna Marie Pyle 2011 The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs,

Patterns, and Networks. Accounts of Chemical Research 44(12): 1302–1311.

Cannon, N. A., M. J. Donlin, L. M. Mayes, et al. 2009 Evidence for Action of Ribavirin through the Hepatitis C Virus RNA Polymerase.

Journal of Viral Hepatitis 16(8): 595–604.

Carrère-Kremer, Séverine, Claire Montpellier-Pala, Laurence Cocquerel, et al. 2002 Subcellular Localization and Topology of the p7 Polypeptide of Hepatitis C Virus. Journal of Virology 76(8): 3720–3730.

de Chassey, B., V. Navratil, L. Tafforeau, et al. 2008 Hepatitis C Virus Infection Protein Network. Molecular Systems Biology 4: 230.

Cheng, J. C., M. F. Chang, and S. C. Chang 1999 Specific Interaction between the Hepatitis C Virus NS5B RNA Polymerase and the 3' End of the Viral RNA. Journal of Virology 73(8): 7044–7049.

Chinnaswamy, S., A. Murali, P. Li, K. Fujisaki, and C. C. Kao 2010 Regulation of de Novo-Initiated RNA Synthesis in Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase by Intermolecular Interactions. Journal of Virology 84(12): 5923–5935.

Chinnaswamy, Sreedhar, Ian Yarbrough, Satheesh Palaninathan, et al. 2008 A Locking Mechanism Regulates RNA Synthesis and Host Protein Interaction by the Hepatitis C Virus Polymerase. Journal of Biological Chemistry 283(29): 20535–20546.

Cho, Nam-Joon, Edward A. Pham, Rachel J. Hagey, et al.
2016 Reconstitution and Functional Analysis of a Full-Length Hepatitis C Virus NS5B
Polymerase on a Supported Lipid Bilayer. ACS Central Science 2(7): 456–466.

Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, et al.

1989 Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. Science (New York, N.Y.) 244(4902): 359–362.

Collie, Gavin W., Shozeb M. Haider, Stephen Neidle, and Gary N. Parkinson 2010 A Crystallographic and Modelling Study of a Human Telomeric RNA (TERRA) Quadruplex. Nucleic Acids Research 38(16): 5569–5580.

Conrad, K. Dominik, Florian Giering, Corinna Erfurth, et al. 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(2): e56272.

Cramer, Janina, Joachim Jaeger, and Tobias Restle 2006 Biochemical and Pre-Steady-State Kinetic Characterization of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase (NS5BΔ21, HC-J4). Biochemistry 45(11): 3610–3619.

Cristofari, Gaël, Roland Ivanyi-Nagy, Caroline Gabus, et al. 2004 The Hepatitis C Virus Core Protein Is a Potent Nucleic Acid Chaperone That Directs Dimerization of the Viral (+) Strand RNA in Vitro. Nucleic Acids Research 32(8): 2623– 2631.

Dafa-Berger, Avis, Alona Kuzmina, Michael Fassler, et al. 2012 Modulation of Hepatitis C Virus Release by the Interferon-Induced Protein BST-2/tetherin. Virology 428(2): 98–111.

Dansako, Hiromichi, Daisuke Yamane, Christoph Welsch, et al. 2013 Class A Scavenger Receptor 1 (MSR1) Restricts Hepatitis C Virus Replication by Mediating Toll-like Receptor 3 Recognition of Viral RNAs Produced in Neighboring Cells. PLoS Pathogens 9(5): e1003345. Dausse, Eric, Aurélien Barré, Ahissan Aimé, et al.

2016 Aptamer Selection by Direct Microfluidic Recovery and Surface Plasmon Resonance Evaluation. Biosensors and Bioelectronics 80: 418–425.

De Cian, Anne, Elsa DeLemos, Jean-Louis Mergny, Marie-Paule Teulade-Fichou, and David Monchaud

2007 Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds. Journal of the American Chemical Society 129(7): 1856–1857.

De Nicola, Beatrice, Christopher J. Lech, Brahim Heddi, et al. 2016 Structure and Possible Function of a G-Quadruplex in the Long Terminal Repeat of the Proviral HIV-1 Genome. Nucleic Acids Research 44(13): 6442–6451.

Díaz-Toledano, Rosa, Ascensión Ariza-Mateos, Alex Birk, Belén Martínez-García, and Jordi Gómez

2009 In Vitro Characterization of a miR-122-Sensitive Double-Helical Switch Element in the 5' Region of Hepatitis C Virus RNA. Nucleic Acids Research 37(16): 5498–5510.

Diviney, Sinéad, Andrew Tuplin, Madeleine Struthers, et al. 2008 A Hepatitis C Virus Cis-Acting Replication Element Forms a Long-Range RNA-RNA Interaction with Upstream RNA Sequences in NS5B. Journal of Virology 82(18): 9008–9022.

Donahue, J. G., A. Muñoz, P. M. Ness, et al. 1992 The Declining Risk of Post-Transfusion Hepatitis C Virus Infection. The New England Journal of Medicine 327(6): 369–373.

Dorner, Marcus, Joshua A. Horwitz, Bridget M. Donovan, et al. 2013 Completion of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Genetically Humanized Mice. Nature 501(7466): 237–241.

Dorner, Marcus, Joshua A. Horwitz, Justin B. Robbins, et al. 2011 A Genetically Humanized Mouse Model for Hepatitis C Virus Infection. Nature 474(7350): 208–211.

Douam, Florian, Dimitri Lavillette, and François-Loïc Cosset 2015 The Mechanism of HCV Entry into Host Cells. Progress in Molecular Biology and Translational Science 129: 63–107.

Dreux, Marlène, Urtzi Garaigorta, Bryan Boyd, et al. 2012 Short Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity. Cell Host & Microbe 12(4): 558–570.

Dujardin, Marie, Vanesa Madan, Roland Montserret, et al.

2015 A Proline-Tryptophan Turn in the Intrinsically Disordered Domain 2 of NS5A Protein Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication. The Journal of Biological Chemistry 290(31): 19104–19120.

Dumas, E., C. Masante, T. Astier-Gin, D. Lapaillerie, and M. Ventura 2007 The Hepatitis C Virus Minigenome: A New Cellular Model for Studying Viral Replication. J Virol Methods 142: 59–66.

Dutkiewicz, Mariola, Agata Świątkowska, Marek Figlerowicz, and Jerzy Ciesiołka 2008 Structural Domains of the 3'-Terminal Sequence of the Hepatitis C Virus Replicative Strand<sup>†</sup>. Biochemistry 47(46): 12197–12207.

Echeverría, Natalia, Gonzalo Moratorio, Juan Cristina, and Pilar Moreno 2015 Hepatitis C Virus Genetic Variability and Evolution. World Journal of Hepatology 7(6): 831–845.

Egger, Denise, Benno Wölk, Rainer Gosert, et al. 2002 Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. Journal of Virology 76(12): 5974–5984.

Einav, Shirit, Menashe Elazar, Tsafi Danieli, and Jeffrey S. Glenn 2004 A Nucleotide Binding Motif in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates HCV RNA Replication. Journal of Virology 78(20): 11288–11295.

Einav, Shirit, Doron Gerber, Paul D. Bryson, et al. 2008 Discovery of a Hepatitis C Target and Its Pharmacological Inhibitors by Microfluidic Affinity Analysis. Nature Biotechnology 26(9): 1019–1027.

Eksioglu, Erika A., Haizhen Zhu, Lilly Bayouth, et al. 2011 Characterization of HCV Interactions with Toll-like Receptors and RIG-I in Liver Cells. PloS One 6(6): e21186.

El Omari, Kamel, Oleg Iourin, Jan Kadlec, et al. 2014 Unexpected Structure for the N-Terminal Domain of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1. Nature Communications 5: 4874.

Erdtmann, Lars, Nathalie Franck, Hervé Lerat, et al. 2003 The Hepatitis C Virus NS2 Protein Is an Inhibitor of CIDE-B-Induced Apoptosis. The Journal of Biological Chemistry 278(20): 18256–18264.

Evans, Matthew J., Thomas von Hahn, Donna M. Tscherne, et al. 2007 Claudin-1 Is a Hepatitis C Virus Co-Receptor Required for a Late Step in Entry. Nature 446(7137): 801–805.

Evans, Matthew J., Charles M. Rice, and Stephen P. Goff 2004 Phosphorylation of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates Its Protein Interactions and Viral RNA Replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(35): 13038–13043.

Falkowska, Emilia, Francis Kajumo, Edie Garcia, John Reinus, and Tatjana Dragic 2007 Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Glycans Modulate Entry, CD81 Binding, and Neutralization. Journal of Virology 81(15): 8072–8079. Farci, Patrizia, Atsushi Shimoda, Doris Wong, et al.

1996 Prevention of Hepatitis C Virus Infection in Chimpanzees by Hyperimmune Serum against the Hypervariable Region 1 of the Envelope 2 Protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(26): 15394–15399.

Farquhar, Michelle J., Ke Hu, Helen J. Harris, et al. 2012 Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. Journal of Virology 86(8): 4305–4316.

Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, and P. V. Holland 1975 Transfusion-Associated Hepatitis Not due to Viral Hepatitis Type A or B. The New England Journal of Medicine 292(15): 767–770.

Filipe, Ana, and John McLauchlan 2015 Hepatitis C Virus and Lipid Droplets: Finding a Niche. Trends in Molecular Medicine 21(1): 34–42.

Fleming, Aaron M., Yun Ding, Anton Alenko, and Cynthia J. Burrows 2016 Zika Virus Genomic RNA Possesses Conserved G-Quadruplexes Characteristic of the Flaviviridae Family. ACS Infectious Diseases. http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00109, accessed September 15, 2016.

Franck, Nathalie, Jacques Le Seyec, Christiane Guguen-Guillouzo, and Lars Erdtmann 2005 Hepatitis C Virus NS2 Protein Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 and Targeted for Degradation to the Proteasome. Journal of Virology 79(5): 2700–2708.

Frank, C., M. K. Mohamed, G. T. Strickland, et al.

2000 The Role of Parenteral Antischistosomal Therapy in the Spread of Hepatitis C Virus in Egypt. Lancet (London, England) 355(9207): 887–891.

Friebe, Peter, Julien Boudet, Jean-Pierre Simorre, and Ralf Bartenschlager 2005 Kissing-Loop Interaction in the 3' End of the Hepatitis C Virus Genome Essential for RNA Replication. Journal of Virology 79(1): 380–392.

Friebe, Peter, Volker Lohmann, Nicole Krieger, and Ralf Bartenschlager 2001 Sequences in the 5' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus Required for RNA Replication. Journal of Virology 75(24): 12047–12057.

Fried, Michael W., Mitchell L. Shiffman, K. Rajender Reddy, et al. 2002 Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. The New England Journal of Medicine 347(13): 975–982.

Funami, Kenji, Misako Matsumoto, Hiroyuki Oshiumi, et al. 2004 The Cytoplasmic "Linker Region" in Toll-like Receptor 3 Controls Receptor Localization and Signaling. International Immunology 16(8): 1143–1154.

Fung, James, Ching-Lung Lai, Ivan Hung, et al.

2008 Chronic Hepatitis C Virus Genotype 6 Infection: Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. The Journal of Infectious Diseases 198(6): 808–812.

Gale, M. J., M. J. Korth, N. M. Tang, et al.

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(2): 217–227.

Gallei, Andreas, Alexander Pankraz, Heinz-Jürgen Thiel, and Paul Becher 2004 RNA Recombination in Vivo in the Absence of Viral Replication. Journal of Virology 78(12): 6271–6281.

Galli, Andrea, and Jens Bukh

2014 Comparative Analysis of the Molecular Mechanisms of Recombination in Hepatitis C Virus. Trends in Microbiology 22(6): 354–364.

Gao, Fengxiang, Omana V. Nainan, Yuri Khudyakov, et al. 2007 Recombinant Hepatitis C Virus in Experimentally Infected Chimpanzees. The Journal of General Virology 88(Pt 1): 143–147.

Gellert, M., M. N. Lipsett, and D. R. Davies

1962 Helix Formation by Guanylic Acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 48: 2013–2018.

Gilmore, Jamie L, Hideki Aizaki, Katashi Deguchi, et al. 2014 Nanoimaging of ssRNA: Genome Architecture of the Hepatitis C Virus Revealed by Atomic Force Microscopy - ProQuest. http://search.proquest.com/openview/a1192df67d260774fa20caf0f7e55fa7/1?pqorigsite=gscholar, accessed September 21, 2016.

Gmyl, Anatoly P., Evgeny V. Belousov, Svetlana V. Maslova, et al.
1999 Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus. Journal of Virology 73(11): 8958– 8965.

Gosert, Rainer, Denise Egger, Volker Lohmann, et al. 2003 Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. Journal of Virology 77(9): 5487–5492.

Gottwein, Judith M., Troels K. H. Scheel, Benoit Callendret, et al. 2010 Novel Infectious cDNA Clones of Hepatitis C Virus Genotype 3a (Strain S52) and 4a (Strain ED43): Genetic Analyses and in Vivo Pathogenesis Studies. Journal of Virology 84(10): 5277–5293.

Gouttenoire, Jérôme, Valérie Castet, Roland Montserret, et al.

2009 Identification of a Novel Determinant for Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. Journal of Virology 83(12): 6257–6268.

Gouttenoire, Jérôme, Roland Montserret, David Paul, et al.

2014 Aminoterminal Amphipathic  $\alpha$ -Helix AH1 of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Possesses a Dual Role in RNA Replication and Virus Production. PLoS Pathogens 10(10): e1004501.

Grakoui, Arash, Naglaa H. Shoukry, David J. Woollard, et al. 2003 HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. Science (New York, N.Y.) 302(5645): 659–662.

Halder, Kangkan, Eric Largy, Martin Benzler, Marie-Paule Teulade-Fichou, and Jörg S. Hartig

2011 Efficient Suppression of Gene Expression by Targeting 5'-UTR-Based RNA Quadruplexes with Bisquinolinium Compounds. ChemBioChem 12(11): 1663–1668.

Han, J H, and M Houghton

1992 Group Specific Sequences and Conserved Secondary Structures at the 3' End of HCV Genome and Its Implication for Viral Replication. Nucleic Acids Research 20(13): 3520.

Hanoulle, Xavier, Aurelie Badillo, Dries Verdegem, François Penin, and Guy Lippens 2010 The Domain 2 of the HCV NS5A Protein Is Intrinsically Unstructured. Protein and Peptide Letters 17(8): 1012–1018.

Hanoulle, Xavier, Aurélie Badillo, Jean-Michel Wieruszeski, et al.
2009 Hepatitis C Virus NS5A Protein Is a Substrate for the Peptidyl-Prolyl Cis/trans
Isomerase Activity of Cyclophilins A and B. The Journal of Biological Chemistry 284(20):
13589–13601.

Hanoulle, Xavier, Dries Verdegem, Aurélie Badillo, et al.
2009 Domain 3 of Non-Structural Protein 5A from Hepatitis C Virus Is Natively Unfolded.
Biochemical and Biophysical Research Communications 381(4): 634–638.

Harrus, Déborah, Neveen Ahmed-El-Sayed, Philip C. Simister, et al.2010 Further Insights into the Roles of GTP and the C Terminus of theHepatitis C Virus Polymerase in the Initiation of RNA Synthesis. The Journal of BiologicalChemistry 285(43): 32906–32918.

He, Yupeng, Wei Yan, Carlos Coito, et al.

2003 The Regulation of Hepatitis C Virus (HCV) Internal Ribosome-Entry Site-Mediated Translation by HCV Replicons and Nonstructural Proteins. The Journal of General Virology 84(Pt 3): 535–543.

Heim, Markus H., and Robert Thimme 2014 Innate and Adaptive Immune Responses in HCV Infections. Journal of Hepatology 61(1, Supplement): S14–S25.

Helbig, Karla J., Nicholas S. Eyre, Evelyn Yip, et al. 2011 The Antiviral Protein Viperin Inhibits Hepatitis C Virus Replication via Interaction with Nonstructural Protein 5A. Hepatology (Baltimore, Md.) 54(5): 1506–1517.

Henke, Jura Inga, Dagmar Goergen, Junfeng Zheng, et al. 2008 microRNA-122 Stimulates Translation of Hepatitis C Virus RNA. The EMBO Journal 27(24): 3300–3310. Hoffman, Brett, Zhubing Li, and Qiang Liu

2015 Downregulation of Viral RNA Translation by Hepatitis C Virus Non-Structural Protein NS5A Requires the poly(U/UC) Sequence in the 3' UTR. The Journal of General Virology 96(8): 2114–2121.

Hoffman, Brett, Qing Shi, and Qiang Liu

2015a Arginine 112 Is Involved in HCV Translation Modulation by NS5A Domain I. Biochemical and Biophysical Research Communications 465(1): 95–100. 2015b K312 and E446 Are Involved in HCV RNA Translation Modulation by NS5A Domains II and III. Virus Research 208: 207–214.

Högbom, Martin, Katrin Jäger, Ivonne Robel, Torsten Unge, and Jacques Rohayem 2009 The Active Form of the Norovirus RNA-Dependent RNA Polymerase Is a Homodimer with Cooperative Activity. The Journal of General Virology 90(Pt 2): 281–291.

Honda, M., M. R. Beard, L. H. Ping, and S. M. Lemon

1999 A Phylogenetically Conserved Stem-Loop Structure at the 5' Border of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus Is Required for Cap-Independent Viral Translation. Journal of Virology 73(2): 1165–1174.

Hong, Z., C. E. Cameron, M. P. Walker, et al.

2001 A Novel Mechanism to Ensure Terminal Initiation by Hepatitis C Virus NS5B Polymerase. Virology 285(1): 6–11.

Horner, Stacy M., and Michael Gale

2009 Intracellular Innate Immune Cascades and Interferon Defenses That Control Hepatitis C Virus. Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 29(9): 489–498.

Hraber, Peter T., William Fischer, William J. Bruno, Thomas Leitner, and Carla Kuiken 2006 Comparative Analysis of Hepatitis C Virus Phylogenies from Coding and Non-Coding Regions: The 5' Untranslated Region (UTR) Fails to Classify Subtypes. Virology Journal 3: 103.

Huang, Luyun, Jungwook Hwang, Suresh D. Sharma, et al. 2005 Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A (NS5A) Is an RNA-Binding Protein. The Journal of Biological Chemistry 280(43): 36417–36428.

Hueging, Kathrin, Mandy Doepke, Gabrielle Vieyres, et al.

2014 Apolipoprotein E Codetermines Tissue Tropism of Hepatitis C Virus and Is Crucial for Viral Cell-to-Cell Transmission by Contributing to a Postenvelopment Step of Assembly. Journal of Virology 88(3): 1433–1446.

Isken, Olaf, Martina Baroth, Claus W. Grassmann, et al. 2007 Nuclear Factors Are Involved in Hepatitis C Virus RNA Replication. RNA (New York, N.Y.) 13(10): 1675–1692. Jangra, Rohit K., Minkyung Yi, and Stanley M. Lemon

2010 Regulation of Hepatitis C Virus Translation and Infectious Virus Production by the microRNA miR-122. Journal of Virology 84(13): 6615–6625.

Jennings, Thomas A., Yingfeng Chen, Deniz Sikora, et al.

2008 RNA Unwinding Activity of the Hepatitis C Virus NS3 Helicase Is Modulated by the NS5B Polymerase. Biochemistry 47(4): 1126–1135.

Jirasko, Vlastimil, Roland Montserret, Ji Young Lee, et al.

2010 Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. PLoS Pathogens 6(12): e1001233.

Jones, Daniel M., Ali M. Atoom, Xiaozhen Zhang, Shyamasundaran Kottilil, and Rodney S. Russell

2011 A Genetic Interaction between the Core and NS3 Proteins of Hepatitis C Virus Is Essential for Production of Infectious Virus. Journal of Virology 85(23): 12351–12361.

Jones, Daniel M., Arvind H. Patel, Paul Targett-Adams, and John McLauchlan 2009 The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can Trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. Journal of Virology 83(5): 2163–2177.

Jopling, Catherine L., Sylvia Schütz, and Peter Sarnow

2008 Position-Dependent Function for a Tandem microRNA miR-122-Binding Site Located in the Hepatitis C Virus RNA Genome. Cell Host & Microbe 4(1): 77–85.

Jopling, Catherine L., Minkyung Yi, Alissa M. Lancaster, Stanley M. Lemon, and Peter Sarnow

2005 Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. Science (New York, N.Y.) 309(5740): 1577–1581.

Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, et al.

1994 Hepatitis C Virus Particle Detected by Immunoelectron Microscopic Study. The Journal of General Virology 75 (Pt 7): 1755–1760.

Kalinina, Olga, Helene Norder, and Lars O. Magnius
2004 Full-Length Open Reading Frame of a Recombinant Hepatitis C Virus Strain from St
Petersburg: Proposed Mechanism for Its Formation. The Journal of General Virology 85(Pt
7): 1853–1857.

Kalinina, Olga, Helene Norder, Sergey Mukomolov, and Lars O. Magnius 2002 A Natural Intergenotypic Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St. Petersburg. Journal of Virology 76(8): 4034–4043.

Kapoor, D., R. Saxena, B. Sood, and S. K. Sarin

2000 Blood Transfusion Practices in India: Results of a National Survey. Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology 19(2): 64–67.

Karam, Pierre, Megan H. Powdrill, Hsiao-Wei Liu, et al.

2014 Dynamics of Hepatitis C Virus (HCV) RNA-Dependent RNA Polymerase NS5B in Complex with RNA. Journal of Biological Chemistry 289(20): 14399–14411.

Kasprowicz, Victoria, Julian Schulze zur Wiesch, Thomas Kuntzen, et al. 2008 High Level of PD-1 Expression on Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD8+ and CD4+ T Cells during Acute HCV Infection, Irrespective of Clinical Outcome. Journal of Virology 82(6): 3154–3160.

Kato, Jun, Naoya Kato, Hideo Yoshida, et al. 2002 Hepatitis C Virus NS4A and NS4B Proteins Suppress Translation in Vivo. Journal of Medical Virology 66(2): 187–199.

Kaul, Artur, Sarah Stauffer, Carola Berger, et al.
2009 Essential Role of Cyclophilin A for Hepatitis C Virus Replication and Virus Production and Possible Link to Polyprotein Cleavage Kinetics. PLoS Pathogens 5(8): e1000546.

Kell, Alison M., and Michael Gale 2015 RIG-I in RNA Virus Recognition. Virology 479–480: 110–121.

Khan, Abdul Ghafoor, Jillian Whidby, Matthew T. Miller, et al. 2014 Structure of the Core Ectodomain of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2. Nature 509(7500): 381–384.

Khawaja, Anas, Vaclav Vopalensky, and Martin Pospisek 2015 Understanding the Potential of Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site Domains to Modulate Translation Initiation via Their Structure and Function. Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA 6(2): 211–224.

Kim, J. L., K. A. Morgenstern, C. Lin, et al.

1996 Crystal Structure of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain Complexed with a Synthetic NS4A Cofactor Peptide. Cell 87(2): 343–355.

Kim, Yoon Ki, Chon Saeng Kim, Song Hee Lee, and Sung Key Jang 2002 Domains I and II in the 5' Nontranslated Region of the HCV Genome Are Required for RNA Replication. Biochemical and Biophysical Research Communications 290(1): 105– 112.

Kim, Yoon Ki, Song Hee Lee, Chon Saeng Kim, Su Kyoung Seol, and Sung Key Jang 2003 Long-Range RNA-RNA Interaction between the 5' Nontranslated Region and the Core-Coding Sequences of Hepatitis C Virus Modulates the IRES-Dependent Translation. RNA (New York, N.Y.) 9(5): 599–606.

Kohlway, Andrew, Nathan Pirakitikulr, Steve C. Ding, et al. 2014 The Linker Region of NS3 Plays a Critical Role in the Replication and Infectivity of Hepatitis C Virus. Journal of Virology 88(18): 10970–10974. Kolakofsky, Daniel, Philippe Le Mercier, Frédéric Iseni, and Dominique Garcin 2004 Viral RNA Polymerase Scanning and the Gymnastics of Sendai Virus RNA Synthesis. Virology 318(2): 463–473.

Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone, and C. M. Rice 2000 Hepatitis C Virus-Encoded Enzymatic Activities and Conserved RNA Elements in the 3' Nontranslated Region Are Essential for Virus Replication in Vivo. Journal of Virology 74(4): 2046–2051.

Kong, Leopold, Erick Giang, Travis Nieusma, et al. 2013 Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Core Structure. Science (New York, N.Y.) 342(6162): 1090–1094.

Krey, Thomas, Jacques d'Alayer, Carlos M. Kikuti, et al. 2010 The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal the Tertiary Organization of the Molecule. PLOS Pathog 6(2): e1000762.

Kunkel, M., M. Lorinczi, R. Rijnbrand, S. M. Lemon, and S. J. Watowich 2001 Self-Assembly of Nucleocapsid-like Particles from Recombinant Hepatitis C Virus Core Protein. Journal of Virology 75(5): 2119–2129.

Kuno, G., and G.-J. J. Chang

2007 Full-Length Sequencing and Genomic Characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika Viruses. Archives of Virology 152(4): 687–696.

Kwok, Chun Kit, and Shankar Balasubramanian 2015 Targeted Detection of G-Quadruplexes in Cellular RNAs. Angewandte Chemie 127(23): 6855–6858.

Labonté, Patrick, Vladimir Axelrod, Atul Agarwal, et al.

2002 Modulation of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Activity by Structure-Based Site-Directed Mutagenesis. The Journal of Biological Chemistry 277(41): 38838–38846.

Lagnado, John

2013 The Story of Quadruplex DNA – It Started with a Bang!.pdf - Marc Jacob Rings - Handbags Purses Documents Download (Pdf,doc,ppt,xls,swf). Biochemical Society. http://www.ihandbagspurses.com/download/55063264534/the-story-of-quadruplex-dna-it-started-with-a-bang-/, accessed July 6, 2016.

Lange, Christian M., Ira M. Jacobson, Charles M. Rice, and Stefan Zeuzem 2014 Emerging Therapies for the Treatment of Hepatitis C. EMBO Molecular Medicine 6(1): 4–15.

Latz, Eicke, T. Sam Xiao, and Andrea Stutz 2013 Activation and Regulation of the Inflammasomes. Nature Reviews. Immunology 13(6): 397–411. Li, Kui, Eileen Foy, Josephine C. Ferreon, et al.

2005 Immune Evasion by Hepatitis C Virus NS3/4A Protease-Mediated Cleavage of the Toll-like Receptor 3 Adaptor Protein TRIF. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(8): 2992–2997.

Li, Kui, Nan L. Li, Dahai Wei, et al.

2012 Activation of Chemokine and Inflammatory Cytokine Response in Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes Depends on Toll-like Receptor 3 Sensing of Hepatitis C Virus Double-Stranded RNA Intermediates. Hepatology (Baltimore, Md.) 55(3): 666–675.

Li, Qisheng, Abraham L. Brass, Aylwin Ng, et al.

2009 A Genome-Wide Genetic Screen for Host Factors Required for Hepatitis C Virus Propagation. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(38): 16410–16415.

Li, Shuo, Stefan Floess, Alf Hamann, et al.

2009 Analysis of FOXP3+ Regulatory T Cells That Display Apparent Viral Antigen Specificity during Chronic Hepatitis C Virus Infection. PLoS Pathogens 5(12): e1000707.

Li, Yi-Ping, Santseharay Ramirez, Judith M. Gottwein, et al.

2012 Robust Full-Length Hepatitis C Virus Genotype 2a and 2b Infectious Cultures Using Mutations Identified by a Systematic Approach Applicable to Patient Strains. Proceedings of the National Academy of Sciences 109(18): E1101–E1110.

Li, You, Takahiro Masaki, Daisuke Yamane, David R. McGivern, and Stanley M. Lemon 2013 Competing and Noncompeting Activities of miR-122 and the 5' Exonuclease Xrn1 in Regulation of Hepatitis C Virus Replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(5): 1881–1886.

Lin, Chun-Chieh, Peiju Tsai, Hung-Yu Sun, et al.

2014 Apolipoprotein J, a Glucose-Upregulated Molecular Chaperone, Stabilizes Core and NS5A to Promote Infectious Hepatitis C Virus Virion Production. Journal of Hepatology 61(5): 984–993.

Lindenbach, Brett D.

2013 Virion Assembly and Release. Current Topics in Microbiology and Immunology 369: 199–218.

Lindenbach, Brett D., Matthew J. Evans, Andrew J. Syder, et al. 2005 Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. Science (New York, N.Y.) 309(5734): 623–626.

Lindenbach, Brett D., Béla M. Prágai, Roland Montserret, et al. 2007 The C Terminus of Hepatitis C Virus NS4A Encodes an Electrostatic Switch That Regulates NS5A Hyperphosphorylation and Viral Replication. Journal of Virology 81(17): 8905–8918.

Lindenbach, Brett D., and Charles M. Rice 2013 The Ins and Outs of Hepatitis C Virus Entry and Assembly. Nature Reviews Microbiology 11(10): 688–700. Liu, Shixin, Elio A. Abbondanzieri, Jason W. Rausch, Stuart F. J. Le Grice, and Xiaowei Zhuang

2008 Slide into Action: Dynamic Shuttling of HIV Reverse Transcriptase on Nucleic Acid Substrates. Science (New York, N.Y.) 322(5904): 1092–1097.

Liu, Yong-Jun

2005 IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. Annual Review of Immunology 23: 275–306.

Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, et al.

1999 Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285: 110–3.

Lohmann, V., F. Körner, J. Koch, et al. 1999 Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science (New York, N.Y.) 285(5424): 110–113.

Lohmann, Volker 2013 Hepatitis C Virus RNA Replication. Current Topics in Microbiology and Immunology 369: 167–198.

Lorenz, Ivo C., Joseph Marcotrigiano, Thomas G. Dentzer, and Charles M. Rice 2006 Structure of the Catalytic Domain of the Hepatitis C Virus NS2-3 Protease. Nature 442(7104): 831–835.

Lourenço, Sofia, Fleur Costa, Béatrice Débarges, Thibault Andrieu, and Annie Cahour 2008 Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation Is Stimulated by Cis-Acting RNA Elements and Trans-Acting Viral Factors. The FEBS Journal 275(16): 4179–4197.

Lozano, Rafael, Mohsen Naghavi, Kyle Foreman, et al.

2012 Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet (London, England) 380(9859): 2095–2128.

Lyle, John M., Esther Bullitt, Kurt Bienz, and Karla Kirkegaard 2002 Visualization and Functional Analysis of RNA-Dependent RNA Polymerase Lattices. Science (New York, N.Y.) 296(5576): 2218–2222.

Lyonnais, Sébastien, Robert J. Gorelick, Jean-Louis Mergny, Eric Le Cam, and Gilles Mirambeau

2003 G-Quartets Direct Assembly of HIV-1 Nucleocapsid Protein along Single-Stranded DNA. Nucleic Acids Research 31(19): 5754–5763.

Ma, Yinghong, Jeremy Yates, Yuqiong Liang, Stanley M. Lemon, and MinKyung Yi 2008 NS3 Helicase Domains Involved in Infectious Intracellular Hepatitis C Virus Particle Assembly. Journal of Virology 82(15): 7624–7639. Mackintosh, Samuel G., Jeff Zhiqiang Lu, John B. Jordan, et al. 2006 Structural and Biological Identification of Residues on the Surface of NS3 Helicase Required for Optimal Replication of the Hepatitis C Virus. The Journal of Biological Chemistry 281(6): 3528–3535.

Madireddy, Advaitha, Pravinkumar Purushothaman, Christopher P. Loosbroock, et al. 2016 G-Quadruplex-Interacting Compounds Alter Latent DNA Replication and Episomal Persistence of KSHV. Nucleic Acids Research 44(8): 3675–3694.

Mahias, Kathleen, Neveen Ahmed-El-Sayed, Cyril Masante, et al. 2010 Identification of a Structural Element of the Hepatitis C Virus Minus Strand RNA Involved in the Initiation of RNA Synthesis. Nucleic Acids Research 38(12): 4079–4091.

Major, M. E., K. Mihalik, J. Fernandez, et al. 1999 Long-Term Follow-up of Chimpanzees Inoculated with the First Infectious Clone for Hepatitis C Virus. Journal of Virology 73(4): 3317–3325.

Manosas, Maria, Adrien Meglio, Michelle M Spiering, et al. 2010 Magnetic Tweezers for the Study of DNA Tracking Motors. Methods in Enzymology 475: 297–320.

Manosas, Maria, Michelle M. Spiering, Fangyuan Ding, et al. 2012 Mechanism of Strand Displacement Synthesis by DNA Replicative Polymerases. Nucleic Acids Research 40(13): 6174–6186.

Masaki, Takahiro, Satoko Matsunaga, Hirotaka Takahashi, et al. 2014 Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- $\alpha$  in Infectious Virus Production. Journal of Virology 88(13): 7541–7555.

Masaki, Takahiro, Ryosuke Suzuki, Kyoko Murakami, et al. 2008 Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. Journal of Virology 82(16): 7964–7976.

Masante, Cyril, Chloé Jaubert, William Palau, et al. 2015 Mutations of the SL2 Dimerization Sequence of the Henatiti

2015 Mutations of the SL2 Dimerization Sequence of the Hepatitis C Genome Abrogate Viral Replication. Cellular and Molecular Life Sciences 72(17): 3375–3385.

McCauley, John A., and Michael T. Rudd 2016 Hepatitis C Virus NS3/4a Protease Inhibitors. Current Opinion in Pharmacology 30: 84–92.

McLauchlan, J.

2000 Properties of the Hepatitis C Virus Core Protein: A Structural Protein That Modulates Cellular Processes. Journal of Viral Hepatitis 7(1): 2–14.

McMullan, Laura K., Arash Grakoui, Matthew J. Evans, et al.
2007 Evidence for a Functional RNA Element in the Hepatitis C Virus Core Gene.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(8):
2879–2884.

Mercer, D. F., D. E. Schiller, J. F. Elliott, et al.

2001 Hepatitis C Virus Replication in Mice with Chimeric Human Livers. Nature Medicine 7(8): 927–933.

Mergny, Jean-Louis, and Laurent Lacroix 2009 UV Melting of G-Quadruplexes. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry / Edited by Serge L. Beaucage ... [et Al.] Chapter 17: Unit 17.1.

Merz, Andreas, Gang Long, Marie-Sophie Hiet, et al. 2011 Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome. The Journal of Biological Chemistry 286(4): 3018–3032.

Messina, Jane P., Isla Humphreys, Abraham Flaxman, et al. 2015 Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. Hepatology (Baltimore, Md.) 61(1): 77–87.

Métifiot, Mathieu, Samir Amrane, Simon Litvak, and Marie-Line Andreola 2014 G-Quadruplexes in Viruses: Function and Potential Therapeutic Applications. Nucleic Acids Research 42(20): 12352–12366.

Miyanari, Yusuke, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, et al. 2007 The Lipid Droplet Is an Important Organelle for Hepatitis C Virus Production. Nature Cell Biology 9(9): 1089–1097.

Molina, Sonia, Valérie Castet, Chantal Fournier-Wirth, et al. 2007 The Low-Density Lipoprotein Receptor Plays a Role in the Infection of Primary Human Hepatocytes by Hepatitis C Virus. Journal of Hepatology 46(3): 411–419.

Moradpour, Darius, Matthew J. Evans, Rainer Gosert, et al.

2004 Insertion of Green Fluorescent Protein into Nonstructural Protein 5A Allows Direct Visualization of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. Journal of Virology 78(14): 7400–7409.

Moradpour, Darius, and Beat Müllhaupt

2015 [Hepatitis C: epidemiology natural course and diagnosis]. Revue Médicale Suisse 11(471): 896–901.

Moradpour, Darius, François Penin, and Charles M. Rice 2007 Replication of Hepatitis C Virus. Nature Reviews. Microbiology 5(6): 453–463.

Morel, V., C. Fournier, C. François, et al.

2011 Genetic Recombination of the Hepatitis C Virus: Clinical Implications. Journal of Viral Hepatitis 18(2): 77–83.

Murat, Pierre, Jie Zhong, Lea Lekieffre, et al. 2014 G-Quadruplexes Regulate Epstein-Barr Virus-Encoded Nuclear Antigen 1 mRNA Translation. Nature Chemical Biology 10(5): 358–364. Murray, Catherine L., and Charles M. Rice

2011 Turning Hepatitis C into a Real Virus. Annual Review of Microbiology 65: 307–327.

Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato 1982 Growth of Human Hepatoma Cells Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. Cancer Research 42(9): 3858–3863.

Nakai, Kousuke, Toru Okamoto, Tomomi Kimura-Someya, et al. 2006 Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with the Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. Journal of Virology 80(22): 11265–11273.

Narayana, Sumudu K., Karla J. Helbig, Erin M. McCartney, et al. 2015 The Interferon-Induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry. The Journal of Biological Chemistry 290(43): 25946–25959.

Neddermann, Petra, Manuela Quintavalle, Chiara Di Pietro, et al. 2004 Reduction of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation by Selective Inhibition of Cellular Kinases Activates Viral RNA Replication in Cell Culture. Journal of Virology 78(23): 13306–13314.

Negash, Amina A., Hilario J. Ramos, Nanette Crochet, et al. 2013 IL-1 $\beta$  Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. PLoS Pathogens 9(4): e1003330.

Neumann-Haefelin, Christoph, and Robert Thimme 2013 Adaptive Immune Responses in Hepatitis C Virus Infection. Current Topics in Microbiology and Immunology 369: 243–262.

Noguchi, T., S. Satoh, T. Noshi, et al.

2001 Effects of Mutation in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A on Interferon Resistance Mediated by Inhibition of PKR Kinase Activity in Mammalian Cells. Microbiology and Immunology 45(12): 829–840.

Noppornpanth, Suwanna, Truong Xuan Lien, Yong Poovorawan, et al. 2006 Identification of a Naturally Occurring Recombinant Genotype 2/6 Hepatitis C Virus. Journal of Virology 80(15): 7569–7577.

Norseen, Julie, F. Brad Johnson, and Paul M. Lieberman 2009 Role for G-Quadruplex RNA Binding by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in DNA Replication and Metaphase Chromosome Attachment. Journal of Virology 83(20): 10336–10346.

O'Brien, Scott

N.d. The Clinical Importance of Hepatitis C Genotyping in the United States | MLO. http://www.mlo-online.com/the-clinical-importance-of-hepatitis-c-genotyping-in-the-united-states.php, accessed September 14, 2016.
Oh, J. W., T. Ito, and M. M. Lai

1999 A Recombinant Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Capable of Copying the Full-Length Viral RNA. Journal of Virology 73(9): 7694–7702.

Op De Beeck, A., L. Cocquerel, and J. Dubuisson

2001 Biogenesis of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. The Journal of General Virology 82(Pt 11): 2589–2595.

Pacheco, Almudena, Sonia López de Quinto, Jorge Ramajo, Noemí Fernández, and Encarnación Martínez-Salas

2009 A Novel Role for Gemin5 in mRNA Translation. Nucleic Acids Research 37(2): 582–590.

Paek, Ki Young, Chon Saeng Kim, Sung Mi Park, Jong Heon Kim, and Sung Key Jang 2008 RNA-Binding Protein hnRNP D Modulates Internal Ribosome Entry Site-Dependent Translation of Hepatitis C Virus RNA. Journal of Virology 82(24): 12082–12093.

Palau, William, Cyril Masante, Michel Ventura, and Carmelo Di Primo 2013 Direct Evidence for RNA–RNA Interactions at the 3' End of the Hepatitis C Virus Genome Using Surface Plasmon Resonance. RNA 19(7): 982–991.

Paredes, Anne M., and Keril J. Blight

2008 A Genetic Interaction between Hepatitis C Virus NS4B and NS3 Is Important for RNA Replication. Journal of Virology 82(21): 10671–10683.

Park, Sung Mi, Ki Young Paek, Ka Young Hong, et al. 2011 Translation-Competent 48S Complex Formation on HCV IRES Requires the RNA-Binding Protein NSAP1. Nucleic Acids Research 39(17): 7791–7802.

Pasloske, BL, and William Wu 2004 METHOD AND REAGENTS FOR INACTIVATING RIBONUCLEASES RNASE A, RNASE I AND RNASE T1. https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US6777210.p df, accessed September 20, 2016.

Patel, P. K., N. S. Bhavesh, and R. V. Hosur 2000 NMR Observation of a Novel C-Tetrad in the Structure of the SV40 Repeat Sequence GGGCGG. Biochemical and Biophysical Research Communications 270(3): 967–971.

Paul, David, Vanesa Madan, and Ralf Bartenschlager2014 Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land. CellHost & Microbe 16(5): 569–579.

Penin, F., C. Combet, G. Germanidis, et al.

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. Journal of Virology 75(12): 5703–5710. Perrone, Rosalba, Matteo Nadai, Jerrod A. Poe, et al.

2013 Formation of a Unique Cluster of G-Quadruplex Structures in the HIV-1 Nef Coding Region: Implications for Antiviral Activity. PloS One 8(8): e73121.

Pestka, Jan M., Mirjam B. Zeisel, Edith Bläser, et al.

2007 Rapid Induction of Virus-Neutralizing Antibodies and Viral Clearance in a Single-Source Outbreak of Hepatitis C. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(14): 6025–6030.

Phan, Tung, Andrew Kohlway, Peniel Dimberu, Anna Marie Pyle, and Brett D. Lindenbach 2011 The Acidic Domain of Hepatitis C Virus NS4A Contributes to RNA Replication and Virus Particle Assembly. Journal of Virology 85(3): 1193–1204.

Piccininni, Sabina, Agoritsa Varaklioti, Maria Nardelli, et al. 2002 Modulation of the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Activity by the Non-Structural (NS) 3 Helicase and the NS4B Membrane Protein. The Journal of Biological Chemistry 277(47): 45670–45679.

Piekna-Przybylska, Dorota, Mark A. Sullivan, Gaurav Sharma, and Robert A. Bambara 2014 U3 Region in the HIV-1 Genome Adopts a G-Quadruplex Structure in Its RNA and DNA Sequence. Biochemistry 53(16): 2581–2593.

Pietschmann, Thomas, Artur Kaul, George Koutsoudakis, 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(19): 7408–7413.

Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, et al.1998 Binding of Hepatitis C Virus to CD81. Science (New York, N.Y.) 282(5390): 938–941.

Pillonel, Legrand, Sommen, and Laperche

2012 Surveillance Épidémiologique Des Donneurs de Sang et Risque Résiduel de Transmission Du VIH, de l'HTLV, Du VHC et Du VHB Par Transfusion En France Entre 2008 et 2010. BEH. http://opac.invs.sante.fr/doc\_num.php?explnum\_id=8540, accessed July 8, 2016.

Plattet, Philippe, Laura Strahle, Philippe le Mercier, et al. 2007 Sendai Virus RNA Polymerase Scanning for mRNA Start Sites at Gene Junctions. Virology 362(2): 411–420.

Ploss, Alexander, Matthew J. Evans, Valeriya A. Gaysinskaya, et al.
2009 Human Occludin Is a Hepatitis C Virus Entry Factor Required for Infection of Mouse
Cells. Nature 457(7231): 882–886.

Pudi, Renuka, Saraswathi Abhiman, Narayanaswamy Srinivasan, and Saumitra Das 2003 Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation Is Stimulated by Specific Interaction of Independent Regions of Human La Autoantigen. The Journal of Biological Chemistry 278(14): 12231–12240. Quezada, Elizabeth M, and Caroline M Kane

2009 The Hepatitis C Virus NS5A Stimulates NS5B During In Vitro RNA Synthesis in a Template Specific Manner. The Open Biochemistry Journal 3: 39–48.

Ramakrishnaiah, Vedashree, Christine Thumann, Isabel Fofana, et al. 2013 Exosome-Mediated Transmission of Hepatitis C Virus between Human Hepatoma Huh7.5 Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(32): 13109–13113.

Ranjith-Kumar, C. T., Les Gutshall, Robert T. Sarisky, and C. Cheng Kao 2003 Multiple Interactions within the Hepatitis C Virus RNA Polymerase Repress Primer-Dependent RNA Synthesis. Journal of Molecular Biology 330(4): 675–685.

Ranjith-Kumar, C. T., and C. C. Kao 2006 Recombinant Viral RdRps Can Initiate RNA Synthesis from Circular Templates. RNA (New York, N.Y.) 12(2): 303–312.

Ranjith-Kumar, C. T., Young-Chan Kim, Les Gutshall, et al.
2002 Mechanism of de Novo Initiation by the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA
Polymerase: Role of Divalent Metals. Journal of Virology 76(24): 12513–12525.

Ranjith-Kumar, C. T., Yahong Wen, Nielson Baxter, Kanchan Bhardwaj, and C. Cheng Kao 2011 A Cell-Based Assay for RNA Synthesis by the HCV Polymerase Reveals New Insights on Mechanism of Polymerase Inhibitors and Modulation by NS5A. PloS One 6(7): e22575.

Ray, R. B., and R. Ray2001 Hepatitis C Virus Core Protein: Intriguing Properties and Functional Relevance.FEMS Microbiology Letters 202(2): 149–156.

Read, M., R. J. Harrison, B. Romagnoli, et al.

2001 Structure-Based Design of Selective and Potent G Quadruplex-Mediated Telomerase Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(9): 4844–4849.

Reigadas, Sandrine, Michel Ventura, Marie-Line Andreola, et al.

2003 An Oligonucleotide Complementary to the SL-B1 Domain in the 3'-end of the Minus-Strand RNA of the Hepatitis C Virus Inhibits in Vitro Initiation of RNA Synthesis by the Viral Polymerase. Virology 314(1): 206–220.

Reigadas, S., M. Ventura, L. Sarih-Cottin, et al.

2001 HCV RNA-Dependent RNA Polymerase Replicates in Vitro the 3' Terminal Region of the Minus-Strand Viral RNA More Efficiently than the 3' Terminal Region of the plus RNA. European Journal of Biochemistry / FEBS 268(22): 5857–5867.

Rhodes, Daniela, and Hans J. Lipps

2015 G-Quadruplexes and Their Regulatory Roles in Biology. Nucleic Acids Research: gkv862.

Ridpath, Julia F., and John D. Neill

2000 Detection and Characterization of Genetic Recombination in Cytopathic Type 2 Bovine Viral Diarrhea Viruses. Journal of Virology 74(18): 8771–8774.

Romero-Brey, Inés, Carola Berger, Stephanie Kallis, et al.

2015 NS5A Domain 1 and Polyprotein Cleavage Kinetics Are Critical for Induction of Double-Membrane Vesicles Associated with Hepatitis C Virus Replication. mBio 6(4): e00759.

Romero-Brey, Inés, Andreas Merz, Abhilash Chiramel, et al.

2012 Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. PLoS Pathogens 8(12): e1003056.

Romero-Lopez, Cristina, Alicia Barroso-delJesus, Ana Garcia-Sacristan, Carlos Briones, and Alfredo Berzal-Herranz

2014 End-to-End Crosstalk within the Hepatitis C Virus Genome Mediates the Conformational Switch of the 3?X-Tail Region. Nucleic Acids Research 42(1): 567–582.

Romero-López, Cristina, and Alfredo Berzal-Herranz

2009 A Long-Range RNA–RNA Interaction between the 5' and 3' Ends of the HCV Genome. RNA 15(9): 1740–1752.

2012 The Functional RNA Domain 5BSL3.2 within the NS5B Coding Sequence Influences Hepatitis C Virus IRES-Mediated Translation. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 69(1): 103–113.

Ross-Thriepland, Douglas, Yutaka Amako, and Mark Harris 2013 The C Terminus of NS5A Domain II Is a Key Determinant of Hepatitis C Virus Genome Replication, but Is Not Required for Virion Assembly and Release. The Journal of General Virology 94(Pt 5): 1009–1018.

Sabo, Michelle C., Vincent C. Luca, Jannick Prentoe, et al.

2011 Neutralizing Monoclonal Antibodies against Hepatitis C Virus E2 Protein Bind Discontinuous Epitopes and Inhibit Infection at a Postattachment Step v. Journal of Virology 85(14): 7005–7019.

Salas, Desiree, Veronika Gocheva, and Marcelo Nöllmann 2015 Constructing a Magnetic Tweezers to Monitor RNA Translocation at the Single-

Molecule Level. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) 1259: 257–273.

Salloum, Shadi, Hongliang Wang, Charles Ferguson, Robert G. Parton, and Andrew W. Tai 2013 Rab18 Binds to Hepatitis C Virus NS5A and Promotes Interaction between Sites of Viral Replication and Lipid Droplets. PLOS Pathog 9(8): e1003513.

Sánchez-Quijano, A., J. Andreu, F. Gavilán, et al.

1995 Influence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection on the Natural Course of Chronic Parenterally Acquired Hepatitis C. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology 14(11): 949–953.

Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica

1994 Biosynthesis and Biochemical Properties of the Hepatitis C Virus Core Protein. Journal of Virology 68(6): 3631–3641.

Scarselli, Elisa, Helenia Ansuini, Raffaele Cerino, et al. 2002 The Human Scavenger Receptor Class B Type I Is a Novel Candidate Receptor for the Hepatitis C Virus. The EMBO Journal 21(19): 5017–5025.

Scheller, Nicoletta, Leonardo Bruno Mina, Rui Pedro Galão, et al. 2009 Translation and Replication of Hepatitis C Virus Genomic RNA Depends on Ancient Cellular Proteins That Control mRNA Fates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(32): 13517–13522.

Schmidt, Julia, Robert Thimme, and Christoph Neumann-Haefelin 2011 Host Genetics in Immune-Mediated Hepatitis C Virus Clearance. Biomarkers in Medicine 5(2): 155–169.

Schmitt, Melanie, Nathalie Scrima, Danijela Radujkovic, et al.
2011 A Comprehensive Structure-Function Comparison of Hepatitis C Virus Strain JFH1 and J6 Polymerases Reveals a Key Residue Stimulating Replication in Cell Culture across Genotypes. Journal of Virology 85(6): 2565–2581.

Schoggins, John W., Sam J. Wilson, Maryline Panis, et al.2011 A Diverse Range of Gene Products Are Effectors of the Type I Interferon Antiviral Response. Nature 472(7344): 481–485.

Schregel, V., S. Jacobi, F. Penin, and N. Tautz
2009 Hepatitis C Virus NS2 Is a Protease Stimulated by Cofactor Domains in NS3.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(13): 5342–5347.

Schuster, Catherine, Catherine Isel, Isabelle Imbert, et al. 2002 Secondary Structure of the 3' Terminus of Hepatitis C Virus Minus-Strand RNA. Journal of Virology 76(16): 8058–8068.

Scrima, Nathalie, Célia Caillet-Saguy, Michel Ventura, et al. 2012 Two Crucial Early Steps in RNA Synthesis by the Hepatitis C Virus Polymerase Involve a Dual Role of Residue 405. Journal of Virology 86(13): 7107–7117.

Sedano, Cecilia D., and Peter Sarnow 2014 Hepatitis C Virus Subverts Liver-Specific miR-122 to Protect the Viral Genome from Exoribonuclease Xrn2. Cell Host & Microbe 16(2): 257–264.

Sesmero, Ester, and Ian F. Thorpe

2015 Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. Viruses 7(7): 3974–3994.

Sharma, Kamal Kant, Hugues de Rocquigny, Jean Luc Darlix, et al.

2012 Analysis of the RNA Chaperoning Activity of the Hepatitis C Virus Core Protein on the Conserved 3'X Region of the Viral Genome. Nucleic Acids Research 40(6): 2540–2553.

Shen, Wen, Robert J. Gorelick, and Robert A. Bambara

2011 HIV-1 Nucleocapsid Protein Increases Strand Transfer Recombination by Promoting Dimeric G-Quartet Formation. The Journal of Biological Chemistry 286(34): 29838–29847.

Shepard, Colin W., Lyn Finelli, and Miriam J. Alter

2005 Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection. The Lancet. Infectious Diseases 5(9): 558–567.

Shetty, Sumangala, Seungtaek Kim, Tetsuro Shimakami, Stanley M. Lemon, and Mihaela-Rita Mihailescu

2010 Hepatitis C Virus Genomic RNA Dimerization Is Mediated via a Kissing Complex Intermediate. RNA (New York, N.Y.) 16(5): 913–925.

Shetty, Sumangala, Snezana Stefanovic, and Mihaela Rita Mihailescu 2013 Hepatitis C Virus RNA: Molecular Switches Mediated by Long-Range RNA-RNA Interactions? Nucleic Acids Research 41(4): 2526–2540.

Shim, Jae Hoon, Gary Larson, Jim Zhen Wu, and Zhi Hong 2002 Selection of 3'-template Bases and Initiating Nucleotides by Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase. Journal of Virology 76(14): 7030–7039.

Shimizu, Y. K., H. Igarashi, T. Kiyohara, et al.

1996 A Hyperimmune Serum against a Synthetic Peptide Corresponding to the Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Can Prevent Viral Infection in Cell Cultures. Virology 223(2): 409–412.

Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura, and T. Miyamura 1999 Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein with Viral Sense RNA and Suppression of Its Translation. Journal of Virology 73(12): 9718–9725.

Shirota, Yukihiro, Hong Luo, Weiping Qin, et al. 2002 Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-Dependent RNA Polymerase Activity. The Journal of Biological Chemistry 277(13): 11149–11155.

Shoukry, Naglaa H., Arash Grakoui, Michael Houghton, et al.
2003 Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. The Journal of Experimental Medicine 197(12): 1645–1655.

Silverman, Robert H.

2007 Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. Journal of Virology 81(23): 12720–12729.

Simonsson, T.

2001 G-Quadruplex DNA Structures--Variations on a Theme. Biological Chemistry 382(4): 621–628.

Singh, R. N., and T. W. Dreher
1998 Specific Site Selection in RNA Resulting from a Combination of Nonspecific
Secondary Structure and -CCR- Boxes: Initiation of Minus Strand Synthesis by Turnip
Yellow Mosaic Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. RNA 4(9): 1083–1095.

Sklan, Ella H., and Jeffrey S. Glenn

2006 HCV NS4B: From Obscurity to Central Stage. *In* Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Seng-Lai Tan, ed. Norfolk (UK): Horizon Bioscience. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1633/, accessed June 28, 2016.

Smith, D. B., S. Pathirana, F. Davidson, et al. 1997 The Origin of Hepatitis C Virus Genotypes. The Journal of General Virology 78 (Pt 2): 321–328.

Smith, Donald B, Jens Bukh, Carla Kuiken, et al.

2014 Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. Hepatology (Baltimore, Md.) 59(1): 318–327.

Smith, Robert M., Cherie M. Walton, Catherine H. Wu, and George Y. Wu 2002 Secondary Structure and Hybridization Accessibility of Hepatitis C Virus 3'-Terminal Sequences. Journal of Virology 76(19): 9563–9574.

Stapleford, Kenneth A., and Brett D. Lindenbach

2011 Hepatitis C Virus NS2 Coordinates Virus Particle Assembly through Physical Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. Journal of Virology 85(4): 1706–1717.

Steinmann, Eike, Francois Penin, Stephanie Kallis, et al.2007 Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of InfectiousVirions. PLoS Pathogens 3(7): e103.

Stewart, H., R. J. Bingham, S. J. White, et al.

2016 Identification of Novel RNA Secondary Structures within the Hepatitis C Virus Genome Reveals a Cooperative Involvement in Genome Packaging. Scientific Reports 6: 22952.

Sundquist, W. I., and S. Heaphy

1993 Evidence for Interstrand Quadruplex Formation in the Dimerization of Human Immunodeficiency Virus 1 Genomic RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 90(8): 3393–3397.

Suzuki, Tetsuro, Koji Ishii, Hideki Aizaki, and Takaji Wakita 2007 Hepatitis C Viral Life Cycle. Advanced Drug Delivery Reviews 59(12): 1200–1212. Syed, Gulam H., Yutaka Amako, and Aleem Siddiqui 2010 Hepatitis C Virus Hijacks Host Lipid Metabolism. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM 21(1): 33–40.

Tai, Andrew W., Yair Benita, Lee F. Peng, et al.
2009 A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication. Cell Host & Microbe 5(3): 298–307.

Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, and K. Shimotohno1995 A Novel Sequence Found at the 3' Terminus of Hepatitis C Virus Genome.Biochemical and Biophysical Research Communications 215(2): 744–749.

Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno 1996 Structure of the 3' Terminus of the Hepatitis C Virus Genome. Journal of Virology 70(5): 3307–3312.

Tang, Xiaolin, Mourad Bendjennat, and Saveez Saffarian
2014 Vesicular Stomatitis Virus Polymerase's Strong Affinity to Its Template Suggests
Exotic Transcription Models. PLoS Computational Biology 10(12): e1004004.
2016 Rapid Long Range Sliding of RNA Dependent RNA Polymerases on Viral Genome
Templates Visualized by Photoactivatable Localization Microscopy. Biophysical Journal
110(3): 232a.

Taylor, D. R., S. T. Shi, P. R. Romano, G. N. Barber, and M. M. Lai 1999 Inhibition of the Interferon-Inducible Protein Kinase PKR by HCV E2 Protein. Science (New York, N.Y.) 285(5424): 107–110.

Tellinghuisen, Timothy L., Katie L. Foss, and Jason Treadaway 2008 Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. PLoS Pathogens 4(3). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265800/, accessed September 15, 2016.

Tellinghuisen, Timothy L., Joseph Marcotrigiano, and Charles M. Rice 2005 Structure of the Zinc-Binding Domain of an Essential Component of the Hepatitis C Virus Replicase. Nature 435(7040): 374–379.

Tlučková, Katarína, Maja Marušič, Petra Tóthová, et al. 2013 Human Papillomavirus G-Quadruplexes. Biochemistry 52(41): 7207–7216.

Tolou, H. J., P. Couissinier-Paris, J. P. Durand, et al.
2001 Evidence for Recombination in Natural Populations of Dengue Virus Type 1 Based on the Analysis of Complete Genome Sequences. The Journal of General Virology 82(Pt 6): 1283–1290.

Troesch, Myriam, Isabelle Meunier, Pascal Lapierre, et al. 2006 Study of a Novel Hypervariable Region in Hepatitis C Virus (HCV) E2 Envelope Glycoprotein. Virology 352(2): 357–367. Tscherne, Donna M., Christopher T. Jones, Matthew J. Evans, et al. 2006 Time- and Temperature-Dependent Activation of Hepatitis C Virus for Low-pH-Triggered Entry. Journal of Virology 80(4): 1734–1741.

Tuesuwan, Bodin, Jonathan T. Kern, Pei Wang Thomas, et al. 2008 Simian Virus 40 Large T-Antigen G-Quadruplex DNA Helicase Inhibition by G-Quadruplex DNA-Interactive Agents. Biochemistry 47(7): 1896–1909.

Tuplin, A., D. J. Evans, and P. Simmonds

2004 Detailed Mapping of RNA Secondary Structures in Core and NS5B-Encoding Region Sequences of Hepatitis C Virus by RNase Cleavage and Novel Bioinformatic Prediction Methods. The Journal of General Virology 85(Pt 10): 3037–3047.

Tuplin, Andrew, Madeleine Struthers, Peter Simmonds, and David J. Evans 2012 A Twist in the Tail: SHAPE Mapping of Long-Range Interactions and Structural Rearrangements of RNA Elements Involved in HCV Replication. Nucleic Acids Research 40(14): 6908–6921.

Tuplin, Andrew, Jonny Wood, David J. Evans, Arvind H. Patel, and Peter Simmonds 2002 Thermodynamic and Phylogenetic Prediction of RNA Secondary Structures in the Coding Region of Hepatitis C Virus. RNA (New York, N.Y.) 8(6): 824–841.

Vassilaki, Niki, and Penelope Mavromara 2009 The HCV ARFP/F/core+1 Protein: Production and Functional Analysis of an Unconventional Viral Product. IUBMB Life 61(7): 739–752.

Verdegem, Dries, Aurélie Badillo, Jean-Michel Wieruszeski, et al. 2011 Domain 3 of NS5A Protein from the Hepatitis C Virus Has Intrinsic Alpha-Helical Propensity and Is a Substrate of Cyclophilin A. The Journal of Biological Chemistry 286(23): 20441–20454.

Vieyres, Gabrielle, Xavier Thomas, Véronique Descamps, et al. 2010 Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. Journal of Virology 84(19): 10159–10168.

Voisset, Cécile, and Jean Dubuisson

2004 Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization 96(6): 413–420.

Wakita, Takaji, Thomas Pietschmann, Takanobu Kato, et al. 2005 Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. Nature Medicine 11(7): 791–796.

Wang, Hongliang, and Andrew W. Tai

2016 Mechanisms of Cellular Membrane Reorganization to Support Hepatitis C Virus Replication. Viruses 8(5). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885097/, accessed July 14, 2016.

Wang, Linya, King-Song Jeng, and Michael M. C. Lai

2011 Poly(C)-Binding Protein 2 Interacts with Sequences Required for Viral Replication in the Hepatitis C Virus (HCV) 5' Untranslated Region and Directs HCV RNA Replication through Circularizing the Viral Genome. Journal of Virology 85(16): 7954–7964.

Wang, Q. May, Michelle A. Hockman, Kirk Staschke, et al.

2002 Oligomerization and Cooperative RNA Synthesis Activity of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. Journal of Virology 76(8): 3865–3872.

Watashi, Koichi, Naoto Ishii, Makoto Hijikata, et al. 2005 Cyclophilin B Is a Functional Regulator of Hepatitis C Virus RNA Polymerase. Molecular Cell 19(1): 111–122.

Weinlich, Susan, Stefan Hüttelmaier, Angelika Schierhorn, et al. 2009 IGF2BP1 Enhances HCV IRES-Mediated Translation Initiation via the 3'UTR. RNA (New York, N.Y.) 15(8): 1528–1542.

Wilkins, Courtney, Jessica Woodward, Daryl T.-Y. Lau, et al. 2013 IFITM1 Is a Tight Junction Protein That Inhibits Hepatitis C Virus Entry. Hepatology (Baltimore, Md.) 57(2): 461–469.

Wölk, B., D. Sansonno, H. G. Kräusslich, et al.
2000 Subcellular Localization, Stability, and Trans-Cleavage Competence of the Hepatitis C
Virus NS3-NS4A Complex Expressed in Tetracycline-Regulated Cell Lines. Journal of
Virology 74(5): 2293–2304.

Worobey, M., and E. C. Holmes 1999 Evolutionary Aspects of Recombination in RNA Viruses. The Journal of General Virology 80 (Pt 10): 2535–2543.

Wozniak, Ann L., Stephen Griffin, David Rowlands, et al.2010 Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and ItsContribution to Infectious Virus Production. PLoS Pathogens 6(9): e1001087.

Wyles, D. L., and J. A. Gutierrez 2014 Importance of HCV Genotype 1 Subtypes for Drug Resistance and Response to Therapy. Journal of Viral Hepatitis 21(4): 229–240.

Xie, Z. C., J. I. Riezu-Boj, J. J. Lasarte, et al. 1998 Transmission of Hepatitis C Virus Infection to Tree Shrews. Virology 244(2): 513– 520.

Xu, Yongfen, and Jin Zhong 2016 Innate Immunity against Hepatitis C Virus. Current Opinion in Immunology 42: 98– 104.

Yanagi, Masayuki, Marisa St. Claire, Suzanne U. Emerson, Robert H. Purcell, and Jens Bukh 1999 In Vivo Analysis of the 3' Untranslated Region of the Hepatitis C Virus after in Vitro Mutagenesis of an Infectious cDNA Clone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(5): 2291–2295.

Yao, L., H. Dong, H. Zhu, et al.

2011 Identification of the IFITM3 Gene as an Inhibitor of Hepatitis C Viral Translation in a Stable STAT1 Cell Line. Journal of Viral Hepatitis 18(10): e523-529.

Yao, Zhi Qiang, Audrey Eisen-Vandervelde, Stephen N. Waggoner, Evan M. Cale, and Young S. Hahn

2004 Direct Binding of Hepatitis C Virus Core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T Cells Leads to Impaired Activation of Lck and Akt. Journal of Virology 78(12): 6409–6419.

Yisraeli, Joel K.

2005 VICKZ Proteins: A Multi-Talented Family of Regulatory RNA-Binding Proteins. Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization 97(1): 87–96.

You, Shihyun, Decherd D. Stump, Andrea D. Branch, and Charles M. Rice 2004 A Cis-Acting Replication Element in the Sequence Encoding the NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase Is Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. Journal of Virology 78(3): 1352–1366.

Yu, Guann-Yi, Ki-Jeong Lee, Lu Gao, and Michael M. C. Lai 2006 Palmitoylation and Polymerization of Hepatitis C Virus NS4B Protein. Journal of Virology 80(12): 6013–6023.

Zein, N. N. 2000 Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. Clinical Microbiology Reviews 13(2): 223–235.

Zhao, Hong, Wenyu Lin, Kattareeya Kumthip, et al. 2012 A Functional Genomic Screen Reveals Novel Host Genes That Mediate Interferon-Alpha's Effects against Hepatitis C Virus. Journal of Hepatology 56(2): 326–333.

Zhong, Jin, Pablo Gastaminza, Guofeng Cheng, et al. 2005 Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(26): 9294–9299.

Zhong, W., A. S. Uss, E. Ferrari, J. Y. Lau, and Z. Hong 2000 De Novo Initiation of RNA Synthesis by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5B Polymerase. Journal of Virology 74(4): 2017–2022.

Zignego, A. L., C. Giannini, M. Monti, and L. Gragnani

2007 Hepatitis C Virus Lymphotropism: Lessons from a Decade of Studies. Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver 39 Suppl 1: S38-45.