



HAL
open science

Identification systématique des microARNs impliqués dans les relations virus-hôte au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C

Sophie Pernot

► **To cite this version:**

Sophie Pernot. Identification systématique des microARNs impliqués dans les relations virus-hôte au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C. Virologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ073 . tel-01693504

HAL Id: tel-01693504

<https://theses.hal.science/tel-01693504v1>

Submitted on 26 Jan 2018

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.

ÉCOLE DOCTORALE 414

UMR_S 1110 Institut de Recherche sur Les Maladies Virales et Hépatiques

Thèse présentée par :

Sophie PERNOT

Soutenue le : **30 Novembre 2015**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Identification systématique des microARNs impliqués dans les relations virus-hôte au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C

THÈSE dirigée par :

Dr. ZEISEL Mirjam B.

Chargée de recherche, PhD, PharmD, Inserm U1110,
Université de Strasbourg

Pr. BAUMERT Thomas F.

PU-PH, Directeur de l'unité Inserm U1110,
Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. DUONG François

Chargé de recherche, PhD, Département de biomédecine,
Hôpital Universitaire de Bâle

Pr. ASSELAH Tarik

PU-PH, Inserm U1149
Université Paris Diderot

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. BLANCHARD Emmanuelle

MCU-PH, Inserm U966,
Université François Rabelais, Tours

Pr. GEORGEL Philippe

PU, Inserm U1109,
Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au Pr. Farik Asselah et au Dr. François Duong d'avoir accepté d'être rapporteurs externes de mon travail, au Dr. Emmanuelle Blanchard d'avoir accepté de participer à la discussion autour de ce travail. Enfin, je tiens à remercier le Pr. Philippe Georgel, qui était déjà présent et plein de bons conseils lors de mon mi-parcours de thèse, d'avoir accepté une nouvelle fois de discuter de ce projet.

Je souhaite remercier le Pr. Thomas Baumert pour m'avoir permis de travailler trois ans au sein de son équipe. Merci Thomas de m'avoir appris à être persévérante et motivée, à ne jamais me décourager. Merci pour ton dynamisme et ton soutien, et de m'avoir appris beaucoup sur la gestion d'un projet scientifique et d'une grande équipe.

Un très grand merci au Dr. Mirjam Zeisel. Ces trois années n'ont pas toujours été faciles mais malgré tout il y a toujours un sourire sur ton visage et tu as toujours eu les bon mots pleins de réconfort dans les moments de doute. Merci pour ta disponibilité et pour le temps que tu as consacré à analyser avec moi les nombreux criblages, j'en garde malgré la difficulté de très bons souvenirs. Merci pour toutes les choses que tu m'as données et apprises, et pour m'avoir guidée et aidé à évoluer vers une voie plus lumineuse. Enfin, merci de m'avoir toujours soutenue dans mes projets et dans les choix que j'ai pu faire pour la poursuite de ma carrière.

J'ai une pensée particulière pour mon équipe, la RNA team ! Merci à toi Simonetta !! A ton arrivée tu as été comme un soleil pour moi, avec ta lumière : tes idées et tes nombreux conseils et solutions ; mais aussi ta chaleur : ta gentillesse, ta bienveillance, ta simplicité. Merci d'avoir été là, de m'avoir soutenue et stimulée pendant de nombreux mois. Je n'oublie pas notre challenge d'Août 2015, avoir écrit notre papier en 5 jours. J'en suis fière et je garde un excellent souvenir de cette semaine épuisante au côté de Mirjam et toi. Merci à Sarah pour ton soutien dans les manipes, pour nos nombreuses conversations et pour tous tes conseils pour être une super future maman ! Je te souhaite de continuer à t'épanouir dans ta vie professionnelle et surtout personnelle.

Un grand merci aux amis que j'ai rencontrés au laboratoire. Merci à Emilie, Aram et Mathieu pour nos conversations, débats et soirées film d'horreur. Ces souvenirs sont juste.... Inoubliables !

Merci à Catherine Corbel, je ne pensais pas trouver une amie aussi précieuse. Merci d'avoir toujours trouvé le temps pour un thé ou un café, et d'avoir égayé ma thèse avec tes histoires et anecdotes.

Je tiens à remercier ceux qui ont vécu la thèse à mes côtés, Nicolaas et Emilie, vous êtes encore dedans et je pense beaucoup à vous et souhaite vous témoigner tout mon soutien pour la suite. Merci pour les conversations qu'on a eues, les délires, les bonnes histoires et anecdotes...

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe du laboratoire pour leur disponibilité et leur aide dans les manipes, mais aussi pour leurs idées. On a passé de très bons moments que je garderai toujours avec moi. Je pense à toute l'équipe technique : Christine, Catherine F., Marie, Marine, Charlotte, Laura, Nelly. A ceux qui sont toujours là : Joachim, Hussein, Nourdine, Che, Antonina, Seung-Ae, Eloi, Laurent, Eric, Andres, et les nombreux collègues qui ont poursuivi ailleurs, Rajiv, Dan, Fei, Tao.... Et j'en oublie probablement.

Je souhaite remercier ceux qui font fonctionner le labo au quotidien et sans qui on ne pourrait pas travailler. Merci à vous Sigis, Dom, Anne, Olga et Patricia. Un grand merci aussi à Catherine S., pour ton écoute et ta bonne humeur permanente.

Je souhaite également remercier les nombreux collaborateurs qui ont contribué à ce travail. Merci à Sébastien, Ali, Erika, Wolfgang, Laurent et Amélie.

Merci à tous ceux qui m'ont soutenue pendant ces trois années. Je pense à mon équipe de M2, merci à toi JC pour tes conseils et ton écoute, mais aussi à Red, Melo, Valérie, Sérena, Catherine, Santi, Julien et Roland.

Merci à mes amis pour leur présence, merci de m'avoir changé les idées, merci pour les délires, les soirées jeux, les soirées LOST, Hobbit, Star Wars, Cocktail (Hélène), et j'en passe.... Merci à Morgane, Hélène, Sarah, Maissam, Eric, Kevin, et toute la bande...

Merci aux JPII0 !!!! Merci pour votre soutien pour les dernières semaines !!!! JPI peut pourra !!!!

Merci à -M-, les Beatles, Walt Disney, TBBT, Mylène Farmer, Indochine, Patrick Bruel, Queen, Michael Jackson pour leurs soutiens et leur disponibilités durant les longues heures d'analyse et d'écriture.

Enfin je souhaite remercier ma famille sans qui tout ce travail n'aurait pas pu exister... Merci à mes grands-parents et à mes oncles et tantes pour m'avoir accueillie il y a 15 ans et m'avoir permis d'aller dans une bonne école. Et d'avoir tout fait pour qu'on parte chaque année et qu'on ne manque jamais de rien.

Merci à Eve, Dani, Laura et Manu pour votre bonne humeur, et les bons moments partagés.

Merci à Lorène et Pierre Alix pour votre soutien sans faille, votre présence, de vous endormir à chaque fois que j'évoque ma thèse (ce qui me fait vite arrêter), et de m'aider à relativiser et apprécier mon quotidien.

Je souhaite remercier mes parents qui ont toujours cru en moi. Merci de m'avoir soutenue, de m'avoir poussée à aller toujours plus loin. Merci d'être fière comme vous l'êtes, merci pour vos sacrifices et pour votre amour inconditionnel.

Je souhaite garder le mot de la fin pour remercier Lucas. Merci mon cœur d'être là à mes côtés. De me suivre dans mes délires, de m'avoir supportée pendant une grande partie de la thèse (et ce n'était pas facile) et de continuer à me supporter (c'est toujours pas facile). Merci de m'avoir aidée pour le manuscrit, ton savoir-faire m'a été très précieux. Tu restes à mes yeux ma plus belle expérience.

A mes parents,

“La seule chose que l'on puisse décider est quoi faire du temps qui nous est imparti.”

J.R.R Tolkien

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. L'HÉPATITE C	1
1. IL ETAIT UNE FOIS : DE LA DESCRIPTION DE LA JAUNISSE A LA DECOUVERTE DES VIRUS DES HEPATITES	1
2. PREVALENCE	3
3. MODE DE TRANSMISSION	4
4. PHYSIOPATHOLOGIE	5
A. DESCRIPTION DU FOIE	5
B. LES HEPATOCYTES : CIBLE DES VIRUS DES HEPATITES	7
C. PHASE AIGUË	7
D. PHASE CHRONIQUE	8
5. TRAITEMENTS	10
A. LES PREMIERS TRAITEMENTS A BASE D'INTERFERON	10
B. LE DEVELOPPEMENT DES MOLECULES CIBLANT LE VIRUS	11
C. LE DEVELOPPEMENT DES MOLECULES CIBLANT L'HOTE	14
II. LE VIRUS DE L'HÉPATITE C	16
1. CLASSIFICATION	16
2. DESCRIPTION	16
A. LE GENOME	18
B. LES PROTEINES VIRALES	20
C. LES PROTEINES STRUCTURALES.....	20
D. LES PROTEINES NON STRUCTURALES.....	21
3. LE CYCLE DE REPLICATION DU HCV	24
A. L'ENTREE	24
B. TRADUCTION ET REPLICATION DE L'ARN VIRAL	27
C. L'ASSEMBLAGE ET LA SECRETION	29
4. LES MODELES D'ETUDE	32
A. LES MODELES <i>IN VIVO</i>	32
B. LES MODELES <i>IN VITRO</i>	35
i. LES HEPATOCYTES ET LIGNEES HEPATOCYTAIRES.....	35
ii. GLYCOPROTEINES D'ENVELOPPE RECOMBINANTES, PARTICULES VIRUS-LIKE ET REPLICONS.....	36
iii. LES PSEUDOS PARTICULES DU HCV (HCVPP).....	37
iv. LE HVC DERIVE DE LA CULTURE CELLULAIRE (HCVCC).....	37
III. LES MICRO-ARNS	39
1. DECOUVERTE DES MICRO-ARNS	39
2. BIOGENESE DES MICRO-ARNS	40
3. MECANISME D'ACTION DES MIRs	45
A. APPARIEMENT DU MIR A SA CIBLE	45

B.	INHIBITION DE LA TRADUCTION	46
C.	DEGRADATION DE L'ARNM.....	48
4.	OUTILS COMPUTATIONNELS PERMETTANT L'ANALYSE DES MIRs ET DE LEURS CIBLES.....	51
5.	MIRs ET INFECTIONS VIRALES	53
A.	LES MIRs VIRAUX.....	54
B.	LES MIRs DE L'HOTE.....	55
i.	REGULATION POSITIVE DU HCV PAR LE MIR-122.....	55
ii.	REGULATION NEGATIVE DE L'INFECTION VIRALE.....	59
C.	MODULATION DES MIRs CELLULAIRES PAR L'INFECTION VIRALE	60
6.	MIRs DANS LES PATHOLOGIES: CIBLES THERAPEUTIQUES	62
OBJECTIFS		65
RESULTATS.....		66
PREMIERE PARTIE: IDENTIFICATION DES MIRs IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DU CYCLE RÉPLICATIF DU HCV		
1. MATERIEL ET METHODES		66
2. MISE EN PLACE DU CRIBLAGE PERMETTANT L'IDENTIFICATION SYSTEMATIQUE DES MIRs IMPLIQUES DANS LE CYCLE REPLICATIF DU HCV.....		69
3. LES MIR-619 ET MIR-501-3P JOUENT UN ROLE DANS L'ASSEMBLAGE ET LA LIBERATION DES NOUVEAUX VIRIONS.		74
4. IDENTIFICATION DES CIBLES DES MIR-619 ET MIR-501-3P EN LIEN AVEC LES PHASES TARDIVES DU CYCLE VIRAL DU HCV.....		76
DEUXIEME PARTIE: MODULATION DE L'EXPRESSION DES MIRs LORS DE L'INFECTION PAR LE HCV CONDUISANT À LA PATHOGÉNÈSE HÉPATIQUE.....		
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		131
1. ROLE DES MIRs DANS LE CYCLE VIRAL DU HCV.....		131
2. IMPACT DE L'INFECTION PAR LE HCV SUR L'EXPRESSION DES MIRs DANS LES HEPATOCYTES.		136
3. CONCLUSION		141
BIBLIOGRAPHIE		142

Table des figures

FIGURE 1 : PREVALENCE MONDIALE DE CHACUN DES GENOTYPES DU HCV.....	4
FIGURE 2 : EVOLUTION DES LESIONS TISSULAIRES LORS D'UNE INFECTION CHRONIQUE PAR LE HCV ABOUTISSANT AU DEVELOPPEMENT DU HCC.....	6
FIGURE 3 : EVOLUTION DE L'INFECTION PAR LE HCV.	9
FIGURE 4 : TRAITEMENTS UTILISES POUR LUTTER CONTRE LE HCV.....	10
FIGURE 5 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA FAMILLE DES FLAVIVIRIDAE ET DU HCV.	17
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU HCV.....	17
FIGURE 7 : DESCRIPTION DU GENOME VIRAL.....	19
FIGURE 8 : CYCLE VIRAL DU HCV.....	25
FIGURE 9 : ENTREE DU HCV DANS LES HEPATOCYTES	26
FIGURE 10 : TRADUCTION ET MATURATION DE LA POLY-PROTEINE VIRALE.....	29
FIGURE 11 : DESCRIPTION DE L'ASSEMBLAGE ET DE LA MATURATION DES PARTICULES VIRALES... ..	31
FIGURE 12 : LES DIFFERENTS MODELES MURINS UTILISES DANS L'ETUDE DU HCV.....	34
FIGURE 13: LOCALISATION GENIQUE DES MIRS.....	41
FIGURE 14 : RECONNAISSANCE ET EXPORTATION DU PRE-MIR PAR L'EXPORTINE 5	42
FIGURE 15: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BIOGENESE CANONIQUE DES MIRS.....	44
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE UN MIR ET SA CIBLE	45
FIGURE 17 INHIBITION DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR UN MIR.	51
FIGURE 18 : REPRESENTATION DE L'HYBRIDATION DU MIR-122 AVEC L'ARN VIRAL DU HCV ET DE SA FONCTION DANS LE CYCLE VIRAL.	58
FIGURE 19 : MODULATION DE L'EXPRESSION DES MIRS DANS LE DEVELOPPEMENT DE PATHOLOGIES.....	64
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CONSTRUCTION DE JCR2A	67
FIGURE 21 : SCHEMA EXPERIMENTAL SUIVIT LORS DU CRIBLAGE FONCTIONNEL.....	68
FIGURE 22 : ANALYSE DES CONTROLES UTILISES LORS DU CRIBLAGE.....	71
FIGURE 23 : ANALYSE DE L'EFFET DE LA SUREXPRESSION DES MIRS SUR LES PHASES PRECOCES (A) ET LES PHASES TARDIVES (B) DU CYCLE VIRAL.....	73
FIGURE 24 : ANALYSE DES MIRS QUI MODULENT L'EFFICACITE DE L'INFECTION PAR LE HCV	74
FIGURE 25 : VALIDATION DE L'EFFET DES 4 MIRS SELECTIONNES SUR LES PHASES TARDIVES DU CYCLE REPLICATIF DU HCV	75
FIGURE 26 :LES ETAPES D'ANALYSES PAR IPA	81
FIGURE 27 :EFFET DE L'INFECTION PAR LE HCV SUR LA GENERATION DE STRESS OXYDANT DANS LES HEPATOCYTES CONDUISANT AU DEVELOPPEMENT DU HCC.....	140

Table des Tableaux

TABLEAU 1 : LE SCORE METAVIR PERMET DE DETERMINER L'ETAT D'AVANCEMENT DE LA FIBROSE CHEZ LE PATIENT	9
TABLEAU 2 : TRAITEMENT DES PATIENTS INFECTES CHRONIQUEMENT PAR LE HCV.	12
TABLEAU 3 : LISTE NON EXHAUSTIVE DES LOGICIELS ET BASES DE DONNEES PERMETTANT L'ANALYSE DES MIRS, DE LEURS CIBLES ET DE LEUR ROLE AU SEIN D'UNE CELLULE	53
TABLEAU 4 : MIRS ACTUELLEMENT ETUDIES DANS LE DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES THERAPIES.	64
TABLEAU 5 : VOIE DE SIGNALISATION ET RESEAU DANS LESQUELS SONT IMPLIQUES LES GENES PREDITS DES MIR-501 ET MIR-619.....	81
TABLEAU 6 : ROLE DES GENES PREDITS DU MIR-501 DANS LE DEVELOPPEMENT DE MALADIES D'APRES LE LOGICIEL IPA.	83
TABLEAU 7 : ROLE DES GENES PREDITS DU MIR-619 DANS LE DEVELOPPEMENT DE MALADIES D'APRES LE LOGICIEL IPA.	84
TABLEAU 8 : TABLEAU REPRESENTANT LES GENES RETROUVE EN COMMUN DANS LES DEUX ETUDES DE LI ET AL, 2014 ET POENISCH ET AL, 2015.....	133

ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago	Argonaute
ALAT	Alanine aminotransferase
ANGPTL3	Angiopoietin-like protein 3
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
AP-1	Activator protein 1
apoC	Apolipoprotéine C
apoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARNti	ARN de transfert initiateur
ATP	Adenosine tri-phosphate
ASAT	Aspartate aminotransférase
CAF1	Chromatin assembly factor
CCR4	C-C chemokine receptor type 4
CD81	Cluster of differentiation 81
CHMP1B	Charged multivesicular body protein 1B
CHV	Hépacivirus canin
CLDN1	Claudine 1
CsA	Cyclosporine A
CypA/B	Cyclophiline A/B
DAA	Direct-acting antiviral
DCP1/2	mRNA-decapping enzyme 1/2
DFR	Dihydroflavonol reductase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EGFR	Epidermal growth factor receptor

eIF3/4F/5	Facteur d'initiation eukaryote
EphA2	Ephrin receptor A2
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
exp5	Exportine 5
FMDV	Foot-and-mouth disease virus (Virus fièvre aphteuse)
GFP	Green fluorescent protein
GL	Gouttelettes lipidiques
HAV	Virus de l'hépatite A
HBV	Virus de l'hépatite B
HCC	Carcinome hépatocellulaire
HCMV	Cytomégalovirus humain
HCV	Virus de l'hépatite C
HCVcc	HCV produit en culture cellulaire
HCVpp	HCV pseudo particule
HDV	Virus de l'hépatite D
HEK293-T	Human embryonic kidney 293 T
HEV	Virus de l'hépatite E
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1
hnRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
Huh7 – 7.5 – 7.5.1	Cellules d'hépatome humain et dérivées
hVAP	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1
IFN	Interféron
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IPA	Ingenuity pathway analysis
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRES	Site d'entrée interne du ribosome
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LDL	Lipoprotéine de faible densité

LEFTs	Liver-enriched transcription factors
LVP	Lipo-viro-particule
MAV5	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MEK	MAPK kinase
miR	micro-ARN
BART1	Binder of ARL2 protein 1
MLV	Virus de la leucémie murine
MRE	miRNA response element
MST	Maladie sexuellement transmissible
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NK	Natural killer
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1
NS2/3/4A/4B/5A/5B	Protéine non-structurale
Nt / nts	Nucléotides
OCLN	Occludine
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase
OMS	Organisation mondiale de la Santé
ORF	Cadre de lecture ouvert
PACT	Protein activator of PKR
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille
P-Bodies	Processing bodies
PCBP2	Poly(rC) binding protein 1
PHH	Hepatocytes primaires humain
PIWI	P-element induced wimpy
PKC	Protein kinase C
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
Rag2	Recombination activating gene 2
Ran-GTP	RAs-related Nuclear protein
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1
RISC	RNA-induced silencing complex

RT qPCR	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne quantitative
SCID	Severe combined immunodeficiency
siARN	ARN interférant
SR-BI	Scavenger receptor class B type 1
SRF	Serum response factor
SVR	Sustained virologic response
TEM	Tetraspanin-enriched microdomains
TfR1	Transferrin receptor 1
TLR	Toll-like receptor
TRBP	HIV-1 transactivating response RNA-binding protein
UTR	Région non traduite
VAPA	Vesicle-associated membrane protein
VEMC	Virus de l'encephalomyocardite
VLDL	Lipide de très petite densité
VLPs	Virus-like particles

Introduction

I. L'hépatite C

1. Il était une fois : de la description de la jaunisse à la découverte des virus des hépatites

La jaunisse est un mal facilement identifiable par le changement de couleur de la peau et des yeux. Depuis des milliers d'années, l'Homme a cherché à déterminer les causes de ces modifications physiologiques qui peuvent être soignées chez l'adulte mais qui sont souvent fatales chez le nouveau-né et l'homme âgé. Ainsi on retrouve des descriptions de la coloration jaune de la peau et des yeux, provenant de l'accumulation dans les tissus de bilirubine, sur des tablettes d'argile écrites par des médecins sumériens et datant de 3000 ans avant J-C (Payen, 2009). Le Professeur Labat traduisit difficilement les textes de ces tablettes et parvint à retrouver la description de plusieurs maladies : « La jaunisse : si son corps est jaune, son visage jaune, ses yeux jaunes, si ses chairs deviennent flasques, c'est la jaunisse » (Thorwald, 1962). En ce temps-là, l'homme malade était considéré comme soumis aux forces occultes d'un démon. Dans le cas de la jaunisse, le démon en cause était Ahhâzu. En 400 avant J-C, Hyppocrate révolutionna la médecine moderne en excluant l'origine divine des maladies. Il décrivit la théorie des quatre humeurs, le sang, la bile (bile jaune), l'atrabile (bile noire) et la pituite (ou phlegme). Les humeurs circulaient dans le corps et le déséquilibre de ces humeurs provoquerait la maladie.

C'est au XIX^{ème} siècle que deux types d'hépatites furent différenciés. L'hépatite épidémique, ou hépatite des camps, qui fut décrite pour la première fois par le Dr Martin Lang en 1791, était attribuée aux mauvaises conditions d'hygiène, à la malnutrition, ainsi qu'à la tristesse. L'hépatite sérique quant à elle fut décrite en 1883 et faisait suite à des vaccinations contre la variole. En effet, un lot particulier de vaccin composé de lymphes humaine glycélinée provoquait la jaunisse chez les patients vaccinés. Avec le recul, nous savons aujourd'hui que les virus responsables des hépatites pouvaient se trouver dans le vaccin ou dans le sang pendant la vaccination bras à bras. En 1947, l'existence d'un virus était supposée. Le Dr Mac Callum proposa alors de différencier l'hépatite A, hépatite épidémique à incubation courte transmise par voie oro-fécale, de l'hépatite B qui se caractérise par une incubation longue transmise par le sang (hépatite des 100 jours) (Payen, 2002).

C'est en 1966 que le premier virus causant des hépatites fut décrit. En effet, l'équipe du Dr Baruch Blumberg découvrit un antigène spécifique dans le sérum d'un aborigène australien, également retrouvé chez les patients souffrant d'hépatite ayant reçu un grand nombre de transfusions ou sous dialyse (Alter and Blumberg, 1966). Cet antigène, appelé antigène australien, fut décrit quelques années plus tard comme l'antigène HBs correspondant à la protéine de surface du virus de l'hépatite B (HBV). Par la suite, d'autres antigènes furent déterminés par microscopie électronique sur des échantillons de sang de malades. Ainsi, des particules « en cocarde » de 42 nm de diamètre (les particules de Dane) furent observées avec une région plus dense de 28 nm de diamètre correspondant à la capsid, l'antigène HBc (Almeida *et al.*, 1971). Enfin, en 1972, le 3ème antigène (HBe) fut décrit par les Drs Mac Magnius et Epsmark (Magnius and Epsmark, 1972).

L'étude approfondie du virus de l'hépatite B par le Dr Mario Rizzetto permit de mettre en évidence un tout nouvel antigène observé dans les noyaux des hépatocytes de certains patients, l'antigène delta. En fait, il s'agit de l'antigène d'un petit virus défectif qui utilise l'enveloppe du HBV. Il fut appelé virus de l'hépatite D (Rizzetto, 1983).

Suite à la découverte d'un virus responsable des hépatites, d'autres équipes se sont focalisées sur l'identification d'autres virus qui ciblent le foie. Ainsi, en 1973, le Dr Stephen Feinstone observa le virus de l'hépatite A par microscopie électronique en présence d'anticorps de malades. Il observa quelque chose de semblable à un virus détecté dans la matière fécale de patients en phase aiguë d'hépatite. En 1975, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) reconnut l'appellation HAV (Hepatitis A virus, HAV) pour ces particules virales (Payen, 2003a).

- De l'hépatite non A non B à la découverte de l'hépatite C et E

Durant la deuxième partie du XX^{ème} siècle, avec le développement des transfusions sanguines et de la toxicomanie par voie intraveineuse, une nouvelle épidémie d'hépatite fit son apparition. Aucun des marqueurs viraux connus à ce moment-là ne permettait de déterminer le virus responsable de ces épidémies d'où son appellation jusqu'en 1989 d'hépatite non A non B. C'est seulement à la fin des années 1980 que les Drs Houghton, Choo et Kuo en collaboration avec le Dr Bradley développèrent une nouvelle technique de clonage moléculaire pour identifier le pathogène inconnu. L'existence du virus fut confirmée en 1988 par le Dr Alter dans le sérum de patients atteints d'hépatite non A non B (Choo *et al.*, 1989) et le virus fut appelé virus de l'hépatite C (HCV).

L'hépatite E quant à elle fut étudiée à partir d'échantillons de sérum prélevés sur des patients durant une épidémie d'hépatite aiguë en Inde en 1955. En effet, des inondations dues à la saison des pluies ont fait déborder les égouts de New Delhi, ce qui contamina l'eau potable de la ville. L'épidémie ressemblait aux épidémies d'hépatite A, mais semblait plus dangereuse chez les femmes enceintes qui développaient des hépatites fulminantes. Cependant, la prévalence des anticorps anti-HA étant très élevée, il paraissait peu probable que l'épidémie soit due au HAV. Le virus ne fut identifié qu'en 1989, grâce au développement de modèle animal. L'hépatite non A non B endémique fut attribuée à un nouveau virus, le virus de l'hépatite E (HEV) (Payen, 2003b).

2. Prévalence

Le HCV possède une grande diversité génétique, caractérisée par une variation de la prévalence génotypique dans les différentes régions du monde. Aujourd'hui, on compte plus de 185 millions de personnes infectées par le HCV. Le génotype 1 est le plus répandu dans le monde avec 83,4 millions de personnes infectées représentant 46,2 % du nombre total de patients diagnostiqués. Le tiers de ces infections se situe en Asie de l'Est. Le génotype 3 est le deuxième génotype le plus répandu au monde avec 54,3 millions de personnes diagnostiquées ce qui représente 30,1 % du nombre total de patients infectés. Les génotypes 2, 4 et 6 sont responsables de 22,8 % des cas alors que le génotype 5 représente moins de 1 % de la population infectée (**Figure 1**) (Messina *et al.*, 2015).

On retrouve les génotypes 1 et 3 dans les pays du Nord économique, alors que les génotypes 4 et 5 sont plus répandus dans les pays en voie de développement. Plus précisément, deux types de virus sont différenciés : les sous-types épidémiques, qui sont présents partout dans le monde en grande proportion tels que les génotypes 1a, 1b, 2a, et 3a ; et des sous-types endémiques qui sont plus rares et circulent pendant une longue période dans des régions restreintes. On retrouve ainsi les génotypes 1 et 2 en Afrique de l'Ouest ; le génotype 3 en Asie du Sud ; le génotype 4 en Centre-Afrique et Moyen-Orient ; le génotype 5 en Afrique du Sud ; et le

Introduction

génotype 6 au Sud-Est de l'Asie. A ce jour, le génotype 7 n'a été observé qu'au Canada chez un immigrant d'origine Centre-Africaine (**Figure 1**) (Messina *et al.*, 2015).

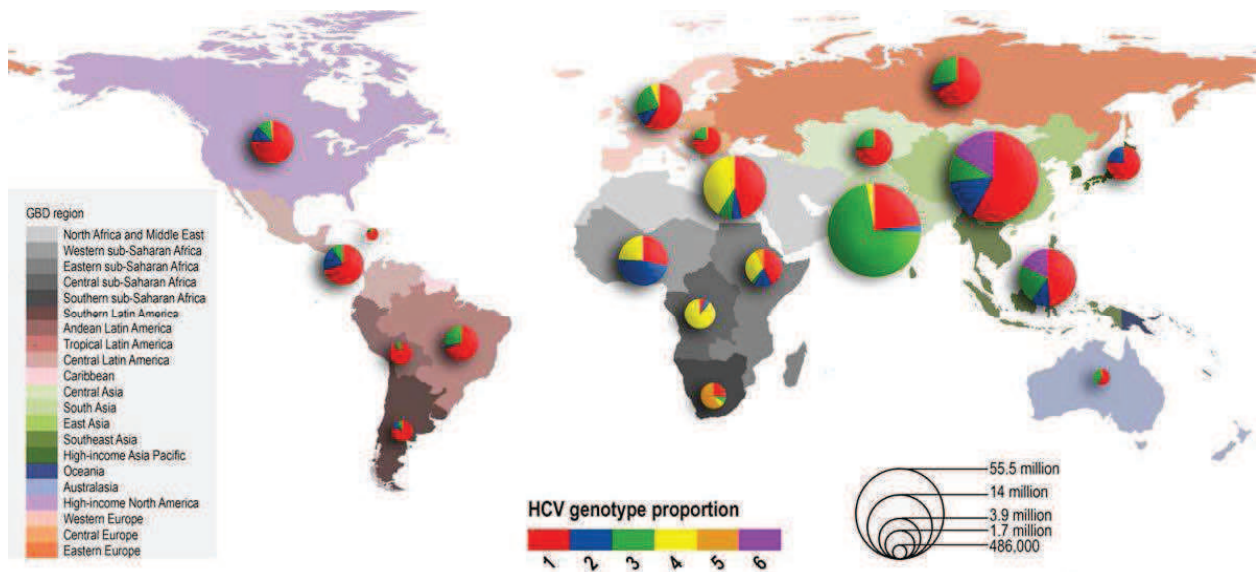


Figure 1 : Prévalence mondiale de chacun des génotypes du HCV. La taille des cercles est proportionnelles au nombre de personnes séropositives au HCV dans la région d'intérêt. (d'après (Messina *et al.*, 2015))

Il est important d'évoquer le cas de l'Egypte pour laquelle la prévalence du génotype 4a a très fortement augmenté au cours du XX^{ème} siècle. En effet, le taux de la population infectée est de 20 %, avec plus de 90 % des patients atteints par le génotype 4, surpassant toutes les données des autres pays. Ce taux de patients touchés par le HCV est dû à une campagne de vaccination contre la bilharziose, un parasite endémique très présent dans les régions autour du Nil. En effet, entre 1960 et 1970, tous les enfants de 5 à 20 ans furent traités systématiquement avec 16 injections intraveineuses de sel d'antimoine, espacées d'une semaine. Les aiguilles et seringues n'ont pas été suffisamment stérilisées et de nombreux enfants furent contaminés par le HCV (Frank *et al.*, 2000).

3. Mode de transmission

Le HCV se transmet essentiellement par voie parentérale. Il ne se transmet ni par le lait maternel, ni le partage de nourriture, ni la salive (OMS, Avril 2014). Avant les années 1980, la majorité des contaminations étaient dues à des transfusions sanguines avec un sang contaminé

ou à du matériel médical souillé ou mal stérilisé. En effet, avant le dépistage systématique des poches de sang, le risque de transmettre le virus par transfusion était de 0,45 % par acte (Donahue *et al.*, 1992). Le risque de contamination par transfusion sanguine reste aujourd'hui de 1 pour 7,7 millions de dons (www.hepatites-info-service.org). La transmission du virus par voie sexuelle est possible mais reste minoritaire. Elle peut être favorisée lors de co-infection par le HIV (Virus d'Immunodéficience Humaine) ou des MST (Maladies Sexuellement Transmissibles).

Aujourd'hui, la majorité des nouvelles contaminations dans les pays occidentaux est due au partage de matériel lors de l'utilisation de drogues par voie intraveineuse (partage de seringue, cuillères, filtre, eau, coton, tampon) ou par voie nasale (partage de la paille) (www.hepatites-info-service.org). Cependant, les moyens de prévention contre le HIV, la meilleure prise en charge des toxicomanes ainsi que l'ouverture de « salles de consommation à moindre risque » permettent de limiter la propagation du HCV ainsi que de nombreux autres virus.

La contamination de la mère à l'enfant est de 5 % en France. Elle dépend de la charge virale de la mère et le risque est accru en cas de co-infection HIV-HCV. Les nouveau-nés contaminés arrivent à éliminer le virus dans 40 % des cas (www.hepatites-info-service.org).

4. Physiopathologie

a. Description du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain et fait partie du système digestif. Il est composé à 80 % d'hépatocytes qui se regroupent en lobules. Les lobules de forme hexagonale sont limités par des septa de tissu collagénique. Les hépatocytes sont des cellules polarisées qui ont une face exposée au sang, séparées par un endothélium, et forment le canal biliaire sur leur face opposée par accollement entre leurs membranes. Le foie est également composé de canaux biliaires (qui transportent la bile produite par les hépatocytes) et sont composés des cholangiocytes (des cellules stellaires responsables de la matrice extracellulaire) et des cellules de Küpffer, les macrophages circulant dans le foie (**Figure2**) (Si-Tayeb *et al.*, 2010).

Le foie assure trois fonctions : épuration, synthèse et stockage. La majeure partie des fonctions hépatiques est assurée par les hépatocytes. En effet, cet organe est capable de stocker de nombreuses substances telles que la vitamine B12, le fer et le cuivre. De plus, il a un rôle

Introduction

important dans la régulation de la glycémie. En effet, le foie intervient dans le métabolisme des glucides en dégradant l'insuline, en produisant du glucose via les voies de néoglucogenèse, de glycogénolyse ou en stockant le glucose via la glycogénogenèse. Il intervient également dans la métabolisation (le métabolisme) des lipides en les produisant via les voies de synthèse du cholestérol, des triglycérides et des lipoprotéines, et de dégradation du cholestérol en acide biliaire. Le foie a également un rôle dans l'homéostasie sanguine en dégradant les hématies et leucocytes trop vieux, par la synthèse de tous les facteurs de coagulation (sauf le facteur VIII), mais également la transformation de la bilirubine (produite par la destruction des globules rouges dans la rate et qui est toxique) en bilirubine conjuguée (qui est non toxique). Enfin, le foie a une fonction détoxifiante. En effet, il va éliminer les toxines présentes dans le sang ainsi que les médicaments. Il convertit également l'ammoniac en urée.

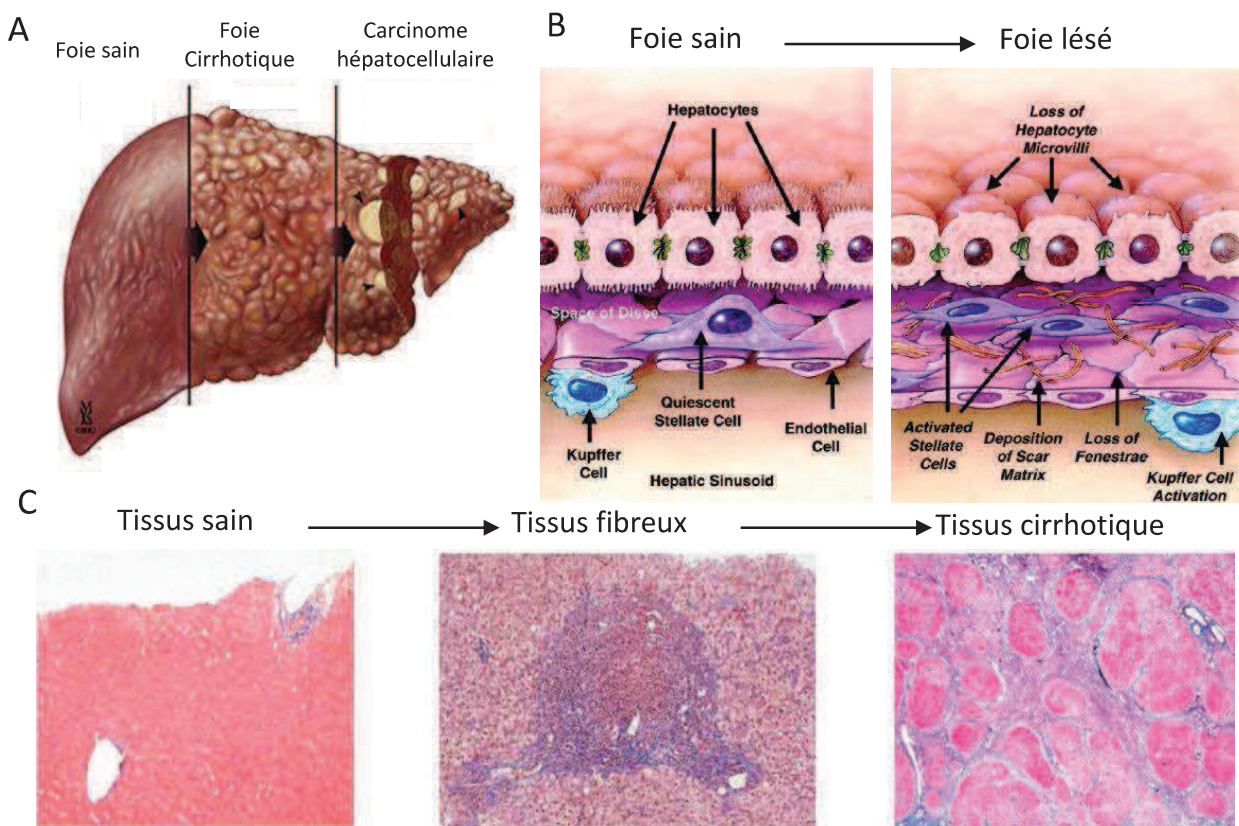


Figure 2 : Evolution des lésions tissulaires lors d'une infection chronique par le HCV aboutissant au développement du HCC. A) Dessin représentant la comparaison du foie lors des stades sain, cirrrose et HCC (d'après <http://medicscientist.com>). B) Schéma représentant l'évolution de l'organisation des cellules

au sein du tissu hépatique lors du développement de la fibrose sévère (d'après (Friedman, 2000)). C) Observation microscopique de l'évolution du tissu hépatique lors du développement de la fibrose et de la cirrhose (d'après <http://hepcbc.ca>).

b. Les hépatocytes : cible des virus des hépatites

Les hépatocytes sont les cellules-cibles des virus HAV, HBV, HCV, HDV et HEV. L'hépatite C est une maladie à évolution lente. La phase aiguë de la maladie est le plus souvent asymptomatique. Au bout de 6 mois on parle d'hépatite chronique qui peut durer plus de 25 ans. La chronicité de l'hépatite virale peut conduire dans 10 à 20 % des cas à une fibrose qui peut évoluer en cirrhose hépatique, puis dans 5 % des cas en carcinome hépatocellulaire (HCC) (**Figure 3**).

c. Phase aiguë

La phase aiguë correspond aux premiers mois suivant l'infection du patient par le HCV. Etant souvent une phase d'incubation virale asymptomatique, l'infection par le HCV reste aujourd'hui difficile à diagnostiquer. Cependant, les premières semaines suivant l'infection sont caractérisées par un taux élevé de transaminases hépatiques (ALAT ASAT). Lorsque la phase aiguë est symptomatique, on retrouve 2 à 12 semaines après l'infection des symptômes partagés avec les autres hépatites virales comme une anorexie, des urines sombres, une dyspepsie, et l'augmentation de la taille du foie (hépatomégalie), pouvant dans de rares cas aller jusqu'au développement d'une jaunisse (Orland *et al.*, 2001). Ces symptômes peuvent également être dus à la réactivation d'une hépatite C chronique. Des cas très rares d'hépatite C fulminante ont été décrits. Elle est mortelle dans 80 % des cas, si le patient n'est pas transplanté rapidement.

Comme évoqué précédemment, l'hépatite C peut guérir spontanément dans 50 % des cas pour les hépatites symptomatiques et 10 % pour les hépatites asymptomatiques dans les 6 mois suivant l'infection virale. En effet, une réponse immunitaire efficace permet de lutter contre le HCV. Cependant, dans la majorité des cas, le HCV est capable d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et l'hépatite C évolue vers la chronicité (Zeisel *et al.*, 2008).

d. Phase chronique

L'hépatite C devient chronique dans 80 % des cas (**Figure 3**). Elle fait suite à la phase aiguë et est définie par la présence d'ARN viral détectable dans le sang 6 mois après l'initiation de l'infection. L'évolution de l'hépatite aiguë en hépatite chronique dépend de nombreux facteurs génétiques et environnementaux (Westbrook and Dusheiko, 2014). Par exemple, l'hépatite chronique progresse de façon plus rapide chez l'homme de plus de 40 ans et chez les patients qui consomment de l'alcool. L'hépatite chronique reste asymptomatique dans la majeure partie des cas mais peut également s'accompagner de symptômes extra-hépatiques tels qu'une néphropathie, des pathologies liées à la thyroïde ou encore une cryoglobulinémie.

L'inflammation du foie due à l'infection chronique par le HCV entraîne la formation de tissus cicatriciels constitués de matrice extracellulaire et conduit à l'apparition de la fibrose (**Figure 2**). Différentes techniques permettent d'évaluer l'atteinte hépatique, telles que le fibroscan ou la biopsie hépatique. Ces techniques permettent de déterminer le score METAVIR qui associe un score qui caractérise les lésions de la fibrose (de F0 pour le foie sain à F4 pour le foie gravement atteint) à un score d'Activité (de A0 à A3) qui permet d'évaluer la gravité de l'atteinte hépatique (**Tableau 1**) (Halfon *et al.*, 2004). Le score METAVIR est utilisé pour déterminer la stratégie thérapeutique à adopter en fonction de l'état du foie, et de l'évolution de la pathologie.

L'hépatite chronique évolue vers une cirrhose du foie chez 16 % des patients 20 ans après l'infection et chez 41 % des patients 30 ans après l'infection. Enfin, 30 ans après l'infection, 5 % des patients développent un HCC (Westbrook and Dusheiko, 2014). En effet, 25 % des HCC dans le monde sont dus à l'infection par le HCV. Ce taux est de 50 % en Europe et en Amérique du Nord et atteint 80 % au Japon. Le nombre important de HCC ainsi que de cirrhoses fait de l'hépatite C la cause majeure de transplantation hépatique dans le monde (Perz *et al.*, 2006). Enfin, 3 à 6 % des patients ont un risque de développer une décompensation hépatique (hémorragie viscérale, encéphalopathie). En cas de décompensation, le risque de décès du patient dans l'année est de 15 à 20 % (Westbrook and Dusheiko, 2014).

	Activité (Nécrose et inflammation)	Fibrose
Absente	A0	F0
Minime	A1	F1
Modérée	A2	F2
Sévère	A3	F3
Cirrhose		F4

Tableau 1 : Le score METAVIR permet de déterminer l'état d'avancement de la fibrose chez le patient (adapté de <http://www.soshepatites.org>).

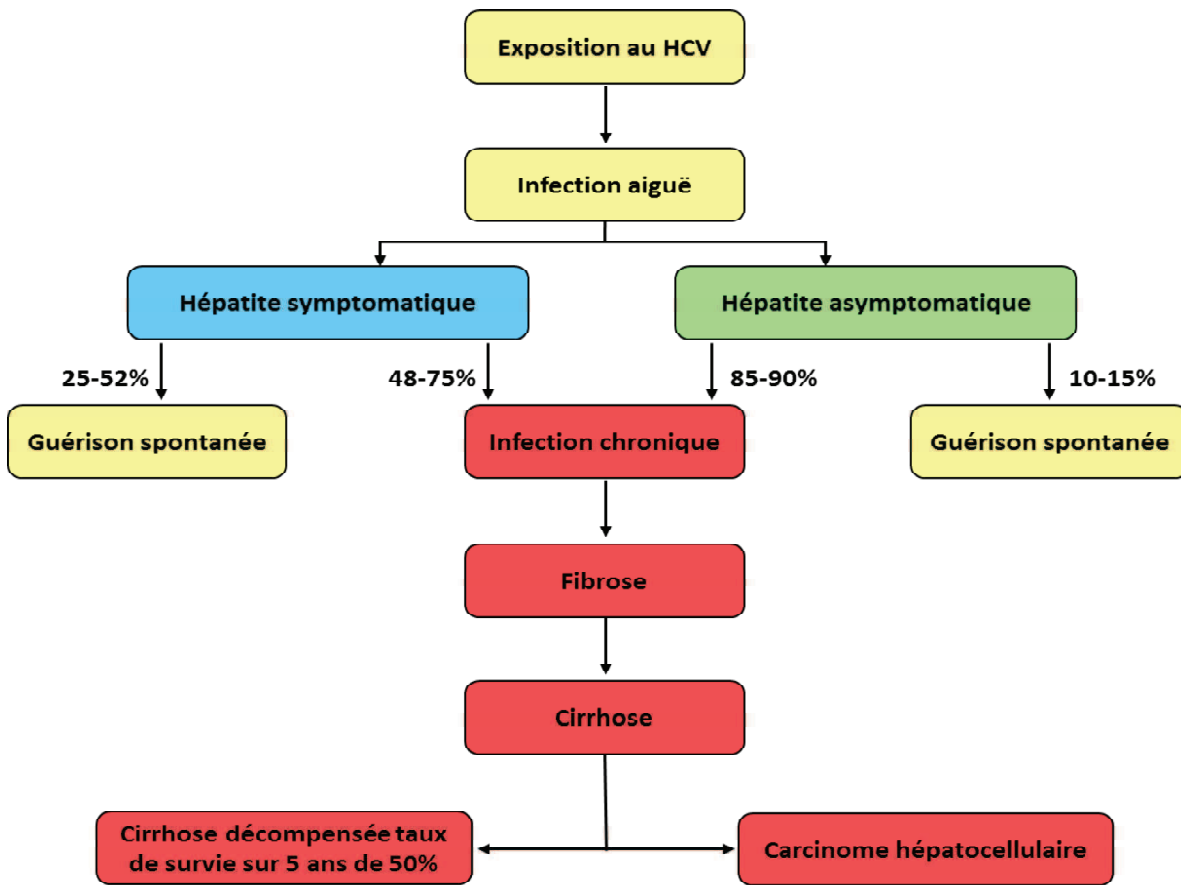


Figure 3 : Evolution de l'infection par le HCV (adapté de (Gupta *et al.*, 2014)).

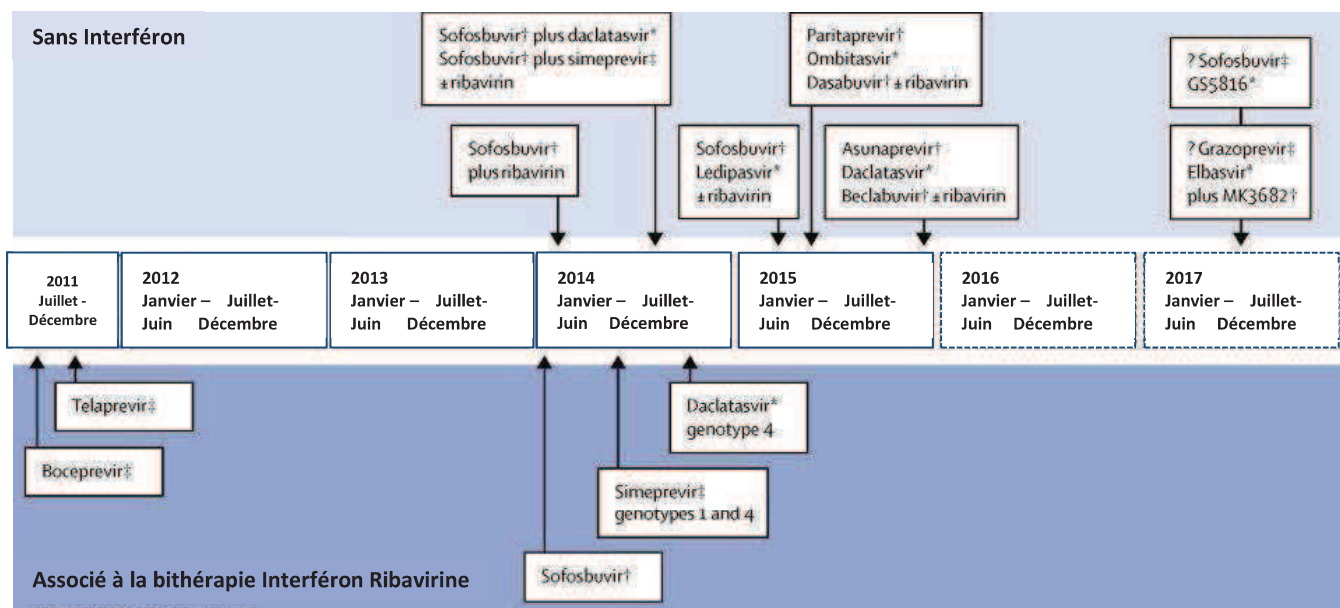


Figure 4 : Traitements utilisés pour lutter contre le HCV en 2015 et prévisions jusqu'en 2017 pour les traitements en voie d'être approuvés. *Inhibiteur de NS5A †Inhibiteur de NS5B ‡Inhibiteur de protéase (d'après (Webster *et al.*, 2015).

5. Traitements

Différents traitements ont été développés au cours des dix dernières années. Il est à noter que les patients atteints de cirrhose développent plus souvent des complications associées aux lésions du foie, et répondent globalement moins bien à tous les traitements mis en place (pour revue (Webster *et al.*, 2015). Depuis 5 ans, de nombreuses nouvelles molécules permettent de lutter efficacement contre tous les génotypes chez la majorité des patients traités (**Figure 4**).

a. Les premiers traitements à base d'interféron

Le premier traitement mis en place pour lutter contre l'infection par le HCV était l'interféron (IFN) pegylé (interféron associé une molécule de polyéthylène glycol) associé à la ribavirine. L'interféron permet de stimuler la réponse immunitaire antivirale du patient. La ribavirine quant à elle est un analogue nucléosidique de la guanosine, qui porte en 3' un

groupement OH qui bloque la réplication virale. La ribavirine est utilisée pour lutter contre de nombreux virus à ARN ou ADN tels que le HIV, le HBV ou encore le virus de Lassa. L'usage de l'interféron associé à la ribavirine permet d'atteindre un taux de SVR (réponse virologique soutenue) de 55 %. La SVR permet de caractériser l'efficacité du traitement et correspond à la non détection de l'ARN viral pendant 6 mois après la fin du traitement (Fried *et al.*, 2002; McHutchison *et al.*, 1998). Cependant, le traitement par l'interféron cause de nombreux effets secondaires très contraignants pour le patient. En effet, l'interféron cause nausées, migraines, maux de tête, anorexies, dépressions et symptômes grippaux. D'autre part, la bithérapie basée sur l'interféron et la ribavirine n'est pas très efficace sur les génotypes 1, 4, 5 et 6 ; alors qu'elle guérit dans 80 % des cas les hépatites chroniques liées aux génotypes 2 et 3.

b. Le développement des molécules ciblant le virus

D'autres molécules antivirales contre le HCV ont été développées ces dernières années. Les DAA (direct-acting antiviral) ciblent les protéines essentielles à la réplication virale telles que la polymérase NS5B, la protéase virale NS3/NS4A, ou encore la protéine NS5A. L'ensemble des traitements disponibles est décrit dans le **Tableau2**.

Génotype	Etat du patient	Traitement	Durée du traitement (semaines)
1		Siméprévir + IFNαPEG + Ribavirine	24 - 48
		Sofosbuvir + IFNαPEG + Ribavirine	12
		Faldaprévir + IFNαPEG + Ribavirine	24 - 48
		Daclatasvir + IFNαPEG + Ribavirine	24
		Daclatasvir + Asunaprevir + IFNαPEG + Ribavirine	24
	Intolérant à l'IFN ou pré-transplantation	Sofosbuvir + Ribavirine	24
		ABT-450/r + Ombitasvir + Dasabuvir +/- Ribavirine	12
		Sofosbuvir + Siméprévir +/- Ribavirine	12
		Sofosbuvir + Fladaprévir +/- Ribavirine	12
		Sofosbuvir + Daclatasvir +/- Ribavirine	12-24
		Sofosbuvir + Lédipasvir +/- Ribavirine	12-24
2		Sofosbuvir + Ribavirine	12-24
3		Sofosbuvir + IFNαPEG + Ribavirine	12
		Sofosbuvir + Ribavirine	24
		Sofosbuvir + Daclatasvir +/- Ribavirine	12
4		Sofosbuvir + IFNαPEG + Ribavirine	12
	Intolérant à l'IFN ou pré-transplantation	Sofosbuvir + Ribavirine	24
		Siméprévir + IFNαPEG + Ribavirine	24 - 48
		Sofosbuvir + Siméprévir +/- Ribavirine	12
		Sofosbuvir + Daclatasvir +/- Ribavirine	12-24
		Sofosbuvir + Lédipasvir +/- Ribavirine	12-24
5-6		Sofosbuvir + IFNαPEG + Ribavirine	12
	Intolérant à l'IFN ou pré-transplantation	Sofosbuvir + Ribavirine	24

Tableau 2 : Traitement des patients infectés chroniquement par le HCV. Les inhibiteurs de protéases sont en bleu, les inhibiteurs de la polymérase virale sont en rose et les inhibiteurs de NS5A sont en orange. /r : traitement accompagné de retinavir qui inhibe les inhibiteurs de protéases (d'après (Pawlotsky *et al.*, 2015)).

Inhibiteurs de la protéase virale

Afin de lutter contre le génotype 1, des inhibiteurs de la protéase virale NS3/NS4A ont été développés. En 2011, le télaprévir et le bocéprévir sont arrivés sur le marché. Ces deux molécules ont permis d'augmenter de 75 % le taux de SVR. Ces molécules inhibent la maturation de la polyprotéine virale en interagissant directement dans le site actif de la protéase virale (Pawlotsky *et al.*, 2015). Cependant, de nouveaux virus résistants sont rapidement apparus. Ces molécules sont aujourd'hui utilisées dans le cadre de trithérapies en association avec l'interféron pegylé et la ribavirine. En 2014, un nouvel inhibiteur a été approuvé par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) ; le simepévir, qui agit efficacement contre les génotypes 1, 2 et 4 (Rosenquist *et al.*, 2014).

Inhibiteurs de la polymérase virale

Les premiers inhibiteurs développés ont été des analogues nucléosidiques. Ils fonctionnent comme la Ribavirine, et sont incorporés par la polymérase virale dans l'ARN néosynthétisé. L'incorporation de cet analogue va abroger la réplication virale et conduire à la production d'ARN abortifs. Ainsi en 2014 a été développé le sofosbuvir. Cette molécule permet d'atteindre un taux de SVR de 90 % pour la plupart des génotypes et chez les patients ayant développé des fibroses sévères et des cirrhoses (Pawlotsky *et al.*, 2015).

Les analogues non-nucléosidiques sont des molécules qui vont interagir dans un site autre que le site actif de l'enzyme et induisent des changements conformationnels de l'enzyme (Haudecoeur *et al.*, 2013). Ils sont actuellement en phases d'essai clinique II et III.

Inhibiteurs de NS5A

Les inhibiteurs de NS5A interagissent avec la protéine virale et inhibent son activité dans la réplication, l'assemblage et la sécrétion des nouveaux virions (Pawlotsky *et al.*, 2015). Récemment, le daclatasvir a reçu son autorisation temporaire d'utilisation (ATU) de cohorte. Il permet de lutter efficacement contre les génotypes 1 et 4. Cependant, de nombreux virus résistants apparaissent (Everson *et al.*, 2014).

Les autres cibles virales

D'autres cibles virales existent tels que les glycoprotéines E1 et E2. Ainsi, des anticorps neutralisants ont été développés. Cependant, la grande variabilité des glycoprotéines d'enveloppe permettant un échappement viral les rend trop inefficaces pour une potentielle application clinique pour le moment (Zeisel *et al.*, 2011).

c. Le développement des molécules ciblant l'hôte

Le HCV est un virus soumis à un tropisme strict. En effet, il infecte principalement les hépatocytes humains. Ce tropisme est dû à des facteurs présents dans les cellules qui sont essentielles aux différentes étapes du cycle viral. Ces facteurs de l'hôte représentent des cibles thérapeutiques intéressantes (Zeisel *et al.*, 2013a).

Des anticorps spécifiques dirigés contre CD81 (Fofana *et al.*, 2013; Meuleman *et al.*, 2008), claudine-1 (CLDN) (Fofana *et al.*, 2010; Mailly *et al.*, 2015) ou le scavenger receptor BI (SR-BI) (Meuleman *et al.*, 2012; Zahid *et al.*, 2013) ont été développés pour bloquer ces récepteurs cellulaires et inhiber l'entrée du HCV. Ces molécules sont efficaces *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris avec un foie chimérique, et pourraient avoir un intérêt dans l'inhibition de la réinfection du greffon qui est systématique. D'autres inhibiteurs dont l'efficacité *in vitro* et *in vivo* a été prouvée récemment et qui pourraient être intéressants pour lutter contre le HCV sont des inhibiteurs de kinases (*Epithelial Growth Factor-Receptor* (EGFR) (Lupberger *et al.*, 2011)). Suite à l'étude *in vitro*, l'erlotinib, un inhibiteur de l'EGFR déjà approuvé pour lutter contre le cancer et caractérisé comme non-nocif pour l'homme, est actuellement en essai clinique de phase I pour la lutte contre l'infection chronique par le HCV (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01835938>).

Une autre cible cellulaire essentielle à la réplication virale est le micro-ARN (miR) cellulaire miR-122. En effet, un antagoniste du miR-122, le miravirsén, est actuellement en phase II d'essai clinique. Les premiers résultats ont montré une diminution dose-dépendante du taux d'ARN viral allant jusqu'à 3 log IU /ml. Les essais actuels testent l'efficacité du miravirsén associé à la bithérapie interféron / ribavirine (Janssen *et al.*, 2013; Ottosen *et al.*, 2015).

Introduction

Participant également à la réplication de l'ARN viral, la cyclophiline A (CypA) est également la cible de nouvelles thérapies. L'alisporivir est un agent capable d'interagir avec la poche enzymatique hydrophobe de la CypA essentielle à la réplication virale (voir partie II.3.e). En effet, l'alisporivir inhibe de façon dose-répondante l'interaction entre la protéine virale NS5A (de tous les génotypes) et le facteur cellulaire CypA. L'alisporivir est actuellement en essai clinique de phase II et présente une efficacité prometteuse chez les patients difficile à traiter pour un profil de sécurité acceptable (www.debiopharm.com).

De nombreux autres facteurs de l'hôte impliqués dans le cycle viral constituent des cibles thérapeutiques potentielles et sont à différents stades de développement préclinique ou clinique (pour revue (Zeisel *et al.*, 2011, 2013b)).

II. Le virus de l'hépatite C

1. Classification

La famille des *Flaviviridae* se décompose en quatre genres (**Figure 5**). Les Flavivirus tels que le virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune ou encore le virus du Nil occidental ; les Pestivirus, dont les seuls spécimens décrits à ce jour infectent les mammifères, comme le pestivirus de l'antilope, de la girafe, le virus de la diarrhée virale bovine et les Pegivirus; et enfin les Hepacivirus dont le représentant le plus connu est le HCV. Récemment d'autres virus appartenant au genre des Hepacivirus ont été décrits tel que l'hépacivirus canin (CHV) et le virus GB-B (GBV-B) (Burbelo *et al.*, 2012). Les membres de la famille des *Flaviviridae* ont un génome à ARN simple brin de polarité positive non-segmenté d'une taille allant de 9 à 12 Kb. Ils possèdent une enveloppe sphérique de 40 à 60 nm de diamètre.

La diversité du HCV est due à sa polymérase qui ne possède pas d'activité correctrice et qui a une probabilité d'incorporer une erreur par nucléotide et par réplication de 10^{-4} . D'autre part, des recombinaisons intra- et inter-génotypiques sont décrites comme favorisant la variabilité des virus (**Figure 5b**). De plus, le virus se présente sous forme de quasi-espèces (Jackowiak *et al.*, 2014). Une quasi-espèce est un ensemble de variant viraux qui sont étroitement apparentés mais génétiquement divergents au sein d'un même hôte. Cette population de virus contient généralement un variant principal ou majoritaire qui est entouré par de nombreux mutants ou variants minoritaires (Jackowiak *et al.*, 2014).

2. Description

Le HCV est un virus enveloppé de 40 nm de diamètre. Son génome est constitué d'une molécule d'ARN de polarité positive (**Figure 6**). L'ARN génomique interagit au sein de la particule virale avec la protéine core. Cette protéine virale est située dans la nucléocapside qui est elle-même enveloppée au sein d'une membrane lipidique appelée l'enveloppe. On retrouve les glycoprotéines virales E1 et E2 ancrées dans l'enveloppe. D'autre part, des protéines de l'hôte sont associées aux virions telles que les apolipoprotéines E, B, A1, C1, C2, ou encore C3. La composition lipidique des virions ressemble à celle des VLDL et LDL (pour revue Dubuisson and Cosset, 2014).

Introduction

Dans le sang, les particules virales sont retrouvées associées à des lipoprotéines. Cette association permet au virus d'échapper au système immunitaire, mais a également un rôle dans l'entrée du virus dans les hépatocytes.

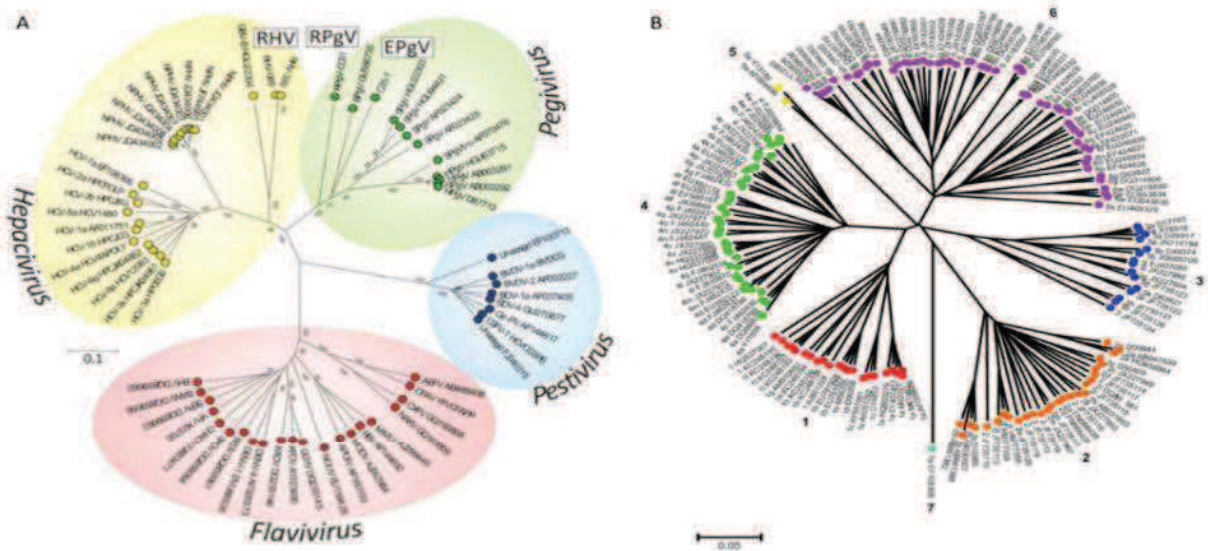


Figure 5 : Arbre phylogénétique de la famille des Flaviviridae et du HCV. A) Arbre phylogénétique de la famille des Flaviviridae. L'analyse a été faite à partir de la comparaison des séquences codant l'hélicase virale (Kapoor *et al.*, 2013). B) Arbre phylogénétique des sept génotypes du HCV. Chaque génotype est divisé en sous-types. Aujourd'hui il existe 67 sous-types épidémiologiques.

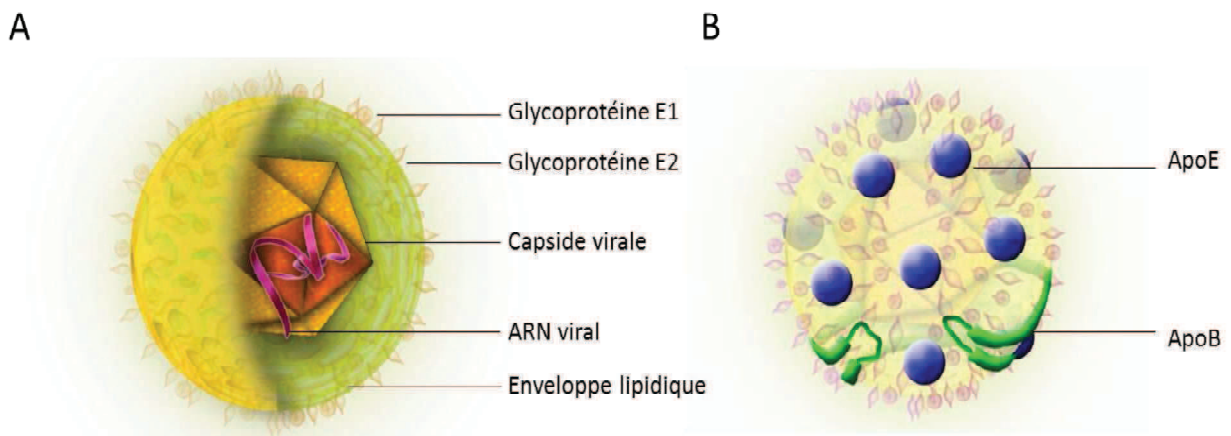


Figure 6: Représentation schématique du HCV. A) L'ARN du HCV est inséré au sein de la capside virale composé d'une association de protéines core. La capside virale est insérée au sein d'une enveloppe lipidique qui exprime à sa surface les glycoprotéines E1 et E2. B) Les particules virales circulantes dans le sang sont associées à des lipoprotéines de l'hôte et sont appelées lipo-viro-particules (LVP).

a. Le génome

Le génome du HCV est un ARN simple brin de polarité positive. L'ARN génomique a une taille de 9,6 Kb (Choo *et al.*, 1989) et contient une ORF (*open reading frame* ou région codante) codant une poly-protéine d'environ 3010 aa, encadrée par deux régions non-codantes, la région 5'UTR et la région 3'UTR.

Les régions 5' et 3' UTR du génome viral contiennent les signaux qui permettent la réplication et la traduction de l'ARN du HCV (**Figure 7**). La région 5'UTR contient une structure secondaire particulière IRES (*internal ribosome entry site*) qui permet d'initier la traduction avec la machinerie cellulaire et indépendamment de la coiffe. La région 5'UTR contient 6 structures tiges boucles particulièrement conservées chez tous les génotypes du HCV. Les tiges boucles SLI et SLII sont impliquées dans la réplication virale (Friebe *et al.*, 2001), alors que les tiges boucles SLII à SLIV ainsi que quelques nucléotides de la région codant la protéine core constituent l'IRES nécessaire à l'initiation de la traduction de l'ARN viral (Brown *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993).

D'autre part, certains miRs cellulaires peuvent interagir avec l'ARN viral. Ainsi, miR-122 est capable d'interagir avec la région 5'UTR de l'ARN génomique mais aussi la région codante NS5B et la région 3'UTR. Deux sites de fixation de miR-122 ont été identifiés dans la région 5'UTR. Le premier site se situe à la base de la première tige boucle et le deuxième site est situé juste en aval, avant la deuxième tige boucle. En effet, deux séquences complémentaires à la séquence seed du miR-122 respectivement de 6 nts (nucléotides) (CACUCC) et de 7 nts (ACACUCC) sont présentes sur le génome viral et fortement conservées chez les différents génotypes (Conrad and Niepmann, 2014). L'interaction du miR-122 dans cette région est essentielle à la réplication et la traduction virale. En effet, Henkel *et al.* ont montré que la traduction de l'ARN viral était stimulée par la présence de miR-122 indépendamment de la réplication de l'ARN viral (Henke *et al.*, 2008). Les interactions miR:ARNm étaient alors peu décrites. D'autre part, ce fût la première description de la stimulation de la traduction d'un ARN par la fixation d'un miR. L'interaction de miR-122 induit le changement conformationnel de l'IRES, mais aussi de la sous-unité 40S du ribosome le plaçant ainsi directement sur le codon START AUG (Spahn *et al.*, 2001). L'interaction de miR-122 permet également de stabiliser la structure de l'IRES et d'inhiber la dégradation de l'ARN viral, qui n'est pas coiffé, par les exonucléases cellulaires (Li *et al.*, 2013).

La région 3'UTR est également importante pour la réplication virale. Elle se compose de 3 structures: une séquence uracile/pyrimidine (U/UC) de 80 nts en moyenne équivalente à la queue poly-A des ARNm, une région variable, et une région appelée région X comprenant 3 tiges boucles (3'SLII, 3'SLII et 3'SLIII). Cette région est importante pour l'initiation de la synthèse du brin négatif de l'ARN viral (Kolykhalov *et al.*, 2000). D'autre part, la région polyU/UC ainsi que la 3'SLI peuvent interagir avec l'IRES viral augmentant ainsi l'efficacité de la traduction virale (Song *et al.*, 2006). L'interaction avec miR-122 dans la région 3' UTR permet également de stabiliser l'ARN viral et de diminuer la dégradation par les exonucléases cellulaires.

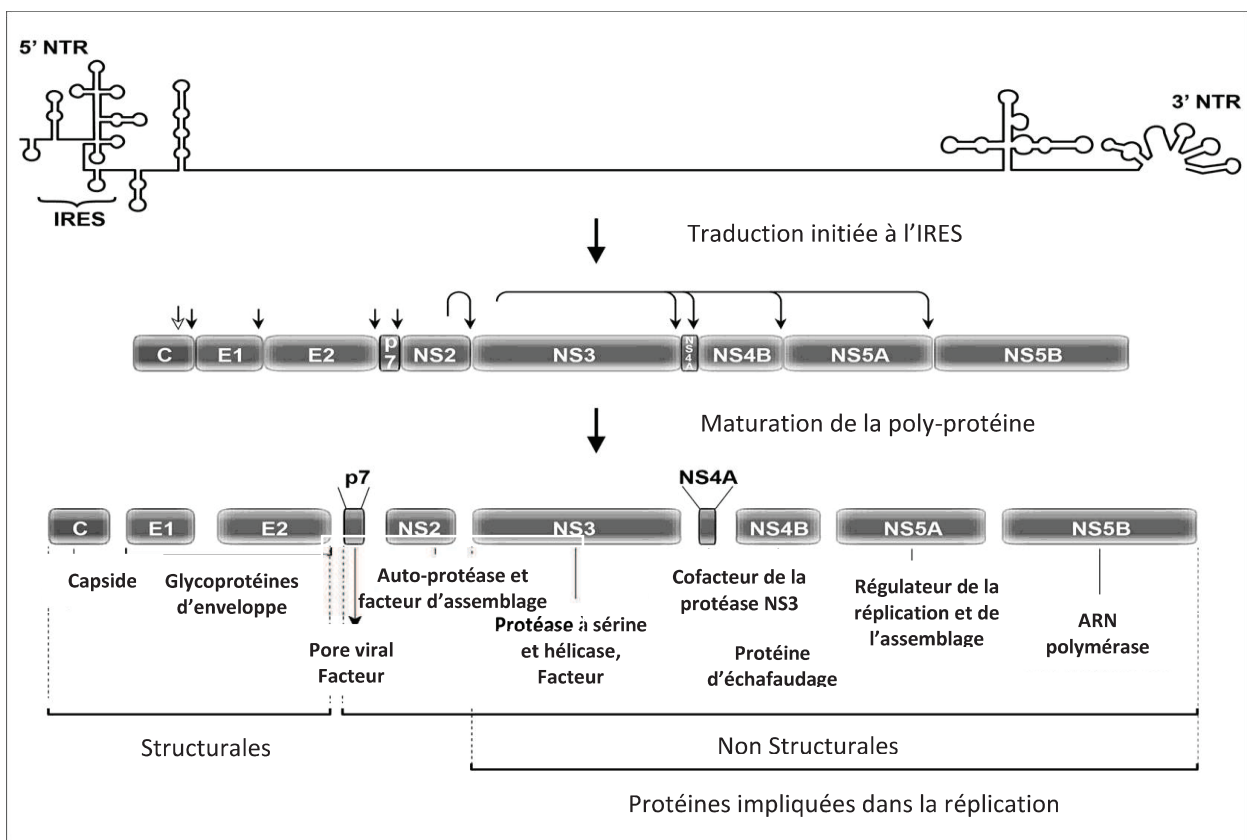


Figure 7 : Description du génome viral. A) Détail des structures secondaires présentes dans les régions 5' et 3' UTR du génome viral. B) Description de la polyprotéine virale suite à la traduction IRES- dépendante avec la machinerie cellulaire. Les flèches décrivent la localisation des sites de clivages par les protéases virales. C) Description des protéines virales et de leur fonction suite à leurs maturation par les protéases virales et cellulaires (adapté de (Dubuisson and Cosset, 2014))

b. Les protéines virales

Une fois l'ARN génomique traduit par la machinerie cellulaire, la poly-protéine virale va être clivée en 10 protéines par les protéases virales NS2/3 et NS3/4A et des enzymes cellulaires (**Figure 7**). Le clivage du polypeptide va permettre la libération de 3 protéines structurales situées en N-terminal du polypeptide : la protéine de capsid core et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ; et de 7 protéines non structurales : p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. La majeure partie de ces protéines a une activité enzymatique qui permet le bon déroulement du cycle viral (Moradpour and Penin, 2013). De façon intéressante, les protéines du HCV sont multifonctionnelles telles que le complexe NS3-NS4A qui a un rôle de protéase et d'hélicase. Ces différentes fonctions enzymatiques sont permises grâce à des changements conformationnels ou encore par l'interaction avec différents partenaires cellulaires ou viraux (de Chassey *et al.*, 2008). D'autre part, les protéines non-structurales ont tout de même une fonction structurale en créant des microenvironnements nécessaires au bon déroulement de l'assemblage viral (pour revue (Moradpour and Penin, 2013)).

c. Les protéines structurales

La protéine core

La première protéine structurale codée par l'ORF du HCV est la protéine core. Core est une protéine de 177 aa et de 21 kDa. Elle est le constituant principal de la nucléocapside virale.

La forme non mature de core possède en C-terminal un signal qui permet son adressage dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Cette séquence sera clivée par une *peptide signal peptidase* (SPP) cellulaire lors de la maturation (McLauchlan *et al.*, 2002). La forme mature de core se présente sous forme dimérique stabilisée par un pont disulfure entre les deux cystéines 128 au niveau de la membrane du RE (Kushima *et al.*, 2010).

Le domaine N-terminal de core est riche en acides aminés basiques et peut interagir avec la région 5'UTR de l'ARN génomique permettant ainsi de former la nucléocapside (McLauchlan *et al.*, 2002).

Les glycoprotéines E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1-E2 ont des rôles cruciaux tout le long du cycle répliatif du HCV tels que l'entrée, la fusion mais aussi dans l'assemblage. Afin de répondre à ces différentes fonctions, E1 et E2 vont adopter différentes conformations.

E1 et E2 sont des protéines transmembranaires de type I avec un ectodomaine en N-terminal et un domaine transmembranaire en C-terminal. Durant la traduction, les ectodomains de E1 et E2 sont relocalisés dans le lumen du RE, et également insérés dans la membrane du RE via le domaine C-terminal (pour revue (Moradpour and Penin, 2013)).

Le domaine transmembranaire est important pour la fonction des glycoprotéines. En effet, ce domaine permet l'ancrage des protéines dans la membrane du RE, la rétention dans le RE, mais aussi la formation de l'hétérodimère E1-E2 qui est la base de l'assemblage de l'enveloppe virale (Voisset and Dubuisson, 2004) et joue un rôle important dans l'entrée du virus. Les domaines N-terminaux contiennent jusqu'à 6 et 11 sites de glycosylation très conservés pour E1 et E2 respectivement. La protéine E1 est impliquée dans la fusion du virus (Lavillette *et al.*, 2007). La protéine E2 quant à elle est la cible préférentielle du système immunitaire. De nombreuses régions variables ont été identifiées sur E2 qui peuvent varier de 80 % en fonction des géotypes.

d. Les protéines non structurales

Le canal ionique p7

P7 est une petite protéine membranaire de 63 aa. Elle est composée de deux hélices alpha connectées par une boucle cytosolique et des extrémités N- et C-terminal orientées vers le lumen du RE. Des hexamères ou heptamères de p7 forment un canal ionique. P7 serait donc une viroporine et est essentielle pour l'assemblage viral ainsi que la libération des nouveaux virions (Steinmann and Pietschmann, 2010). Son rôle précis n'est pas encore bien défini. Cependant, l'hypothèse la plus probable est que ces canaux supprimeraient l'acidification des organelles cellulaires et protégeraient les nouveaux virions des changements conformationnels prématurés liés à l'acidification du milieu (Wozniak *et al.*, 2010).

La protéase NS2

Le premier clivage de la poly-protéine virale précurseur se réalise à la jonction NS2-NS3 par la protéase à cystéine de NS2. L'activité catalytique de NS2 est portée par la moitié C-terminal des acides aminés 94 à 217, avec l'histidine 143, l'acide glutamique 163 et la cystéine 184 représentant le trio catalytique. La partie N-terminal quant à elle comporte trois domaines transmembranaires qui lui permettent de rester dans la membrane du RE. NS2 peut interagir avec les glycoprotéines virales mais aussi avec les protéines p7 et NS3, afin de rassembler ces protéines à proximité des gouttelettes lipidiques. Ainsi, NS2 joue un rôle important dans l'assemblage de la particule virale (Bentham *et al.*, 2014; Popescu *et al.*, 2011).

Le complexe protéase – hélicase NS3/NS4A

Le complexe NS3-4A est non-covalent et est constitué de la protéine NS3 et du cofacteur NS4A. NS3 est une enzyme de 631 aa et 70 kDa, avec une activité protéase à serine située dans la région N-terminal (aa 1-181) et une activité NTPase-hélicase située dans la partie C-terminal (aa 181-631) (Morikawa *et al.*, 2011). NS4A est une protéine de 54 aa.

L'activité protéase de NS3 permet de cliver la poly-protéine virale au niveau des jonctions de NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Penin *et al.*, 2004). La protéase virale a également des substrats cellulaires tels que les protéines MAV5 et TRIF impliquées dans la voie de signalisation de l'interféron, qui a une fonction importante dans l'immunité innée (Morikawa *et al.*, 2011). De plus, elle est la cible de certains antiviraux directs (DAA).

L'activité hélicase de NS3 permet de séparer les ARN double brins mais aussi de dérouler les structures secondaires d'un ARN simple brin grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Pang *et al.*, 2002). L'activité hélicase est nécessaire à la réplication de l'ARN viral ainsi que dans l'assemblage. En effet, NS3 intervient dans la formation des particules virales de façon précoce. Ainsi, elle intervient dans le recrutement de NS5A avec les gouttelettes lipidiques et dans l'assemblage des nouvelles particules. Le mécanisme d'action de l'hélicase n'est pas encore bien déterminé. Cependant, il est suggéré que l'hélicase dissocie les structures secondaires de l'ARN viral favorisant ainsi la réplication, mais sépare aussi les deux brins d'ARN suite à la réplication (Lohmann, 2013).

La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 261 aa et 27 kDa associée intégralement à la membrane du RE. La fonction de NS4B n'est pas bien caractérisée. Elle serait impliquée dans la réplication virale en interagissant avec NS5B et l'ARN viral. Cette protéine possède également une activité NTPase via l'hydrolyse du GTP, dont l'activité est essentielle à la réplication virale. NS4B a aussi un rôle dans l'assemblage de la particule virale. En effet, elle permet la formation d'un réseau membranaire (ou « *membranous web* »), à partir des membranes du RE dans lesquelles on retrouve les complexes de réplication virale (Gouttenoire *et al.*, 2010).

La protéine régulatrice NS5A

NS5A est une phosphoprotéine de 447 aa et de 49 kDa qui joue un rôle important dans la modulation de la réplication de l'ARN viral ainsi que dans la formation des nouveaux virions.

L'état de phosphorylation de NS5A module la réplication virale en régulant les interactions avec les différents partenaires. En effet, NS5A possède trois domaines DI, DII et DIII. DI permet la liaison à l'ARN viral et module la réplication virale (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Le domaine DIII est impliqué dans l'assemblage viral (Tellinghuisen *et al.*, 2008). NS5A peut également interagir avec des partenaires cellulaires tels que la cyclophiline A et affecter la réponse immunitaire de l'hôte (Ciesek *et al.*, 2009). De plus, elle est la cible de certains DAA.

La polymérase virale NS5B

NS5B est l'ARN polymérase ARN-dépendante. Elle a une taille de 591 aa et de 66 kDa. NS5A est capable de synthétiser le brin négatif à partir de l'ARN génomique viral qui sert de matrice à la synthèse des brins positifs également réalisée par NS5B (Moradpour and Penin, 2013).

NS5B ne possède pas d'activité correctrice, ce qui favorise la diversification du HCV. Elle est évidemment essentielle à la réplication de l'ARN viral. Elle est donc une des cibles idéales dans le développement de molécules antivirales (Asselah and Marcellin, 2011).

3. Le cycle de réplication du HCV

a. L'entrée

Interaction avec les récepteurs et facteurs d'entrée cellulaire

Après avoir passé la barrière endothéliale des sinusoides hépatiques, les virions se retrouvent dans l'espace de Disse et ont un contact direct avec la paroi basolatérale des hépatocytes. Le HCV interagit avec les protéines d'attachement présentes à la surface des hépatocytes telles que les héparanes sulfates syndécane-1 et syndécane-4 (Lefèvre *et al.*, 2014), ou SR-BI (Dao Thi *et al.*, 2012). Des études récentes ont montré que l'apolipoprotéine E (apoE) jouerait un rôle essentiel dans l'attachement de la particule virale (Jiang *et al.*, 2013).

Suite à l'attachement, le virus entre dans la cellule hôte grâce à l'action coordonnée de 4 facteurs cellulaires essentiels : SR-BI (Scarselli *et al.*, 2002), CD81 (Pileri *et al.*, 1998), et les protéines de jonctions CLDN1 (Evans *et al.*, 2007) et occludine (OCLN) (Ploss *et al.*, 2009). Cependant, le rôle de chacun des récepteurs et la chronologie du mécanisme d'entrée n'est pas encore bien déterminé (**Figure 8 et 9**) (pour revue (Zeisel *et al.*, 2013c)).

CD81 est un facteur essentiel dans l'entrée du HCV dans la cellule hôte grâce à son interaction avec la glycoprotéine virale E2. CD81 interagit avec de nombreux partenaires cellulaires qui peuvent faire partie de la famille des tétraspanines. Ces interactions multiples vont donner naissance à des complexes multi-protéiques qui formeront sur la membrane cellulaire des plateformes stables ou micro-domaines enrichis en tétraspanines (TEM) (Hemler, 2005). Ainsi, CD81 interagit avec la protéine membranaire CLDN1, également impliquée comme co-facteur dans l'entrée virale (Harris *et al.*, 2008), et SR-BI (Zona *et al.*, 2013). L'association de CD81 et CLDN1 semble être régulée par EGFR, mais aussi la protéine kinase A (Farquhar *et al.*, 2008). L'activation d'EGFR induit l'activation des voies de signalisation Ras/MEK/ERK, ce qui permet la diffusion de CD81 ainsi que l'internalisation de CD81-CLDN1 associés à la particule virale (Lupberger *et al.*, 2011; Zona *et al.*, 2013). CD81 est l'un des deux facteurs qui sont responsables du tropisme strict du HCV pour les hépatocytes humains.

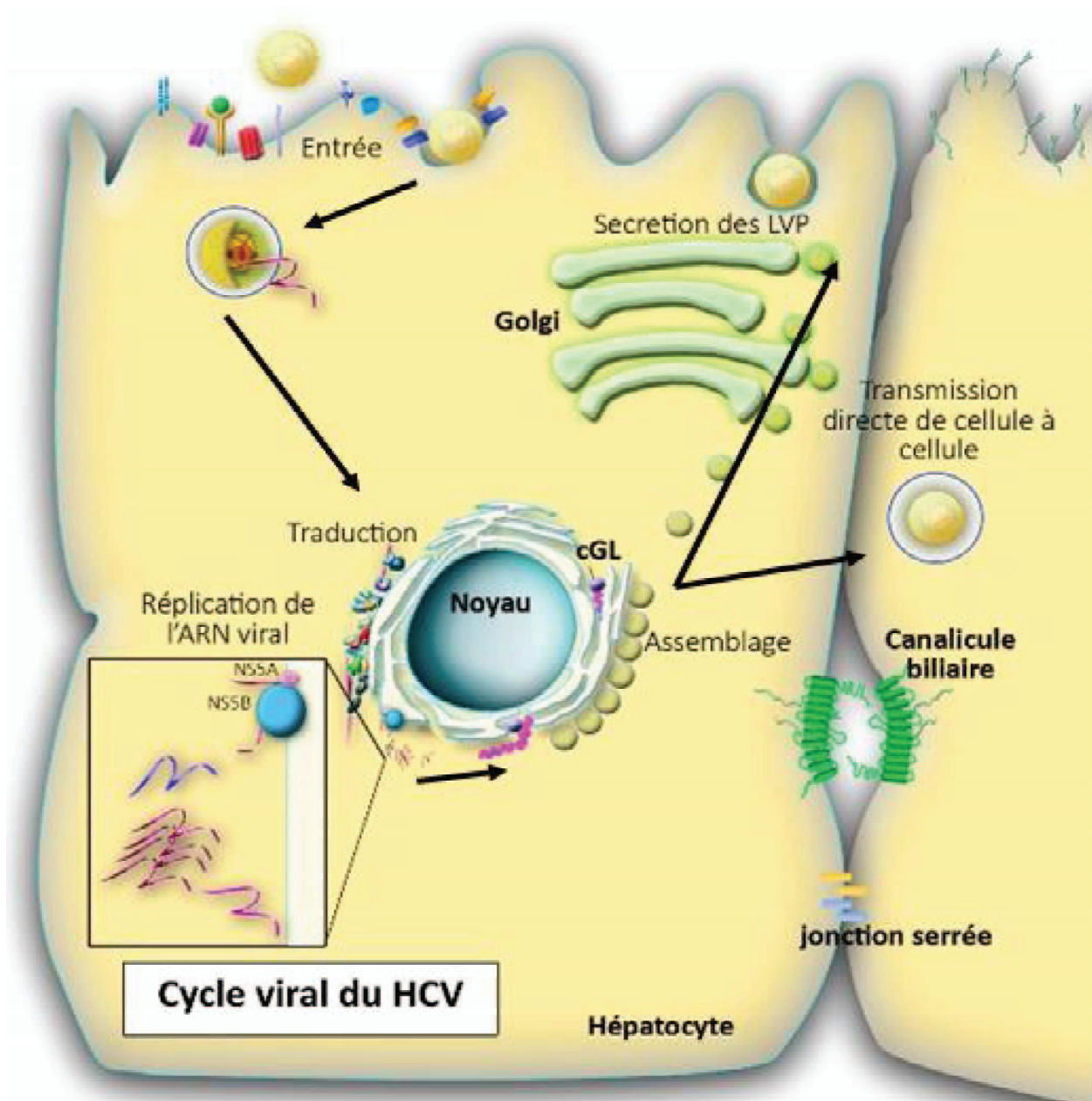


Figure 8 : Cycle viral du HCV. Le HCV cible les hépatocytes. Dans un premier temps, il va interagir avec les facteurs d'entrée présents à la surface de la cellule. Suite à l'entrée et la fusion, l'ARN génomique viral est libéré et traduit par la machinerie moléculaire. Suite à la traduction, le complexe de réplication virale se forme et synthétise un ARN (-) matrice et plusieurs ARN (+). Enfin, les protéines virales ainsi que l'ARN génomique sont assemblés dans le RE et maturés puis libérés par exocytose.

Le facteur OCLN est également essentiel à l'entrée virale (Ploss *et al.*, 2009). Cependant, son rôle précis dans l'internalisation du virus reste encore mal connu. Il semblerait avoir un rôle

dans la phase tardive de l'entrée (Sourisseau *et al.*, 2013). Etant donné que CLDN1 et OCLN sont des protéines trouvées principalement dans les jonctions serrées, il a été pendant longtemps suggéré que la particule virale migrerait vers cette zone avant son internalisation. Des études complémentaires ont montré que CLDN1 associé à CD81 migrerait dans TEM, alors que ce complexe est rare dans les jonctions serrées (Harris *et al.*, 2008; Mailly *et al.*, 2015). Un échange dynamique entre les TEM et le reste de la membrane est essentiel à l'entrée du HCV dans la cellule (Harris *et al.*, 2013). D'autre part, des expériences d'imagerie sur cellules vivantes ont pu confirmer que le virus ne migre pas au niveau des jonctions serrées pour son internalisation (Coller *et al.*, 2009).

D'autres facteurs cellulaires, que nous ne décrivons pas ici, sont essentiels à l'entrée du virus tels que le transporteur de cholestérol Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (Sainz *et al.*, 2012), CD63 ou encore le récepteur de transferrine 1 (TfR1) (Martin and Uprichard, 2013; Zeisel *et al.*, 2011, 2013c; Zhu, 2014).

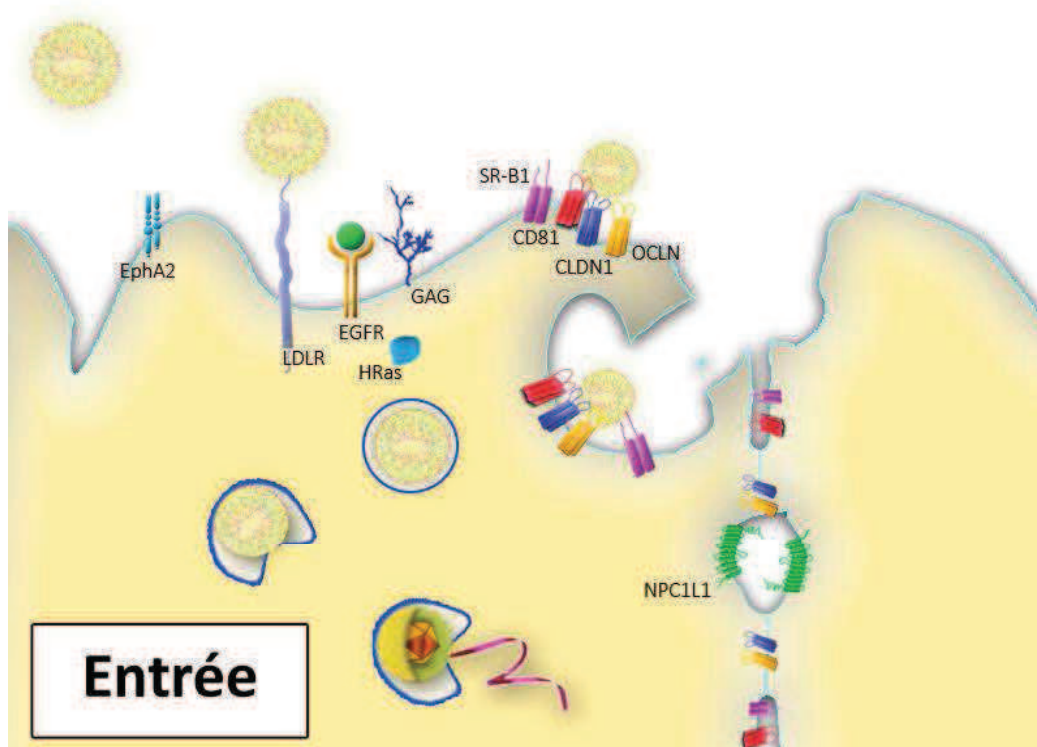


Figure 9 : Entrée du HCV dans les hépatocytes. L'étape d'entrée fait appel à de nombreux récepteurs cellulaires, tels que CD81, CLDN, OCLN et SRB1, et active les voies de signalisation cellulaire telles que la voie EGF/EGFR via HRas.

Internalisation de la particule virale

Suite à l'interaction du virus avec les facteurs d'entrée cellulaire, la particule virale est internalisée par endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard *et al.*, 2006). En effet, les complexes CD81-CLDN sont internalisés dépendamment de la clathrine et de la dynamine (Farquhar *et al.*, 2012). L'association de la particule virale avec ces complexes permet son internalisation dans la cellule hôte (Coller *et al.*, 2009). La fusion est réalisée dans les endosomes précoces et dépend des glycoprotéines E1 et E2, qui possèdent plusieurs domaines de fusion (Lavillette *et al.*, 2007), de la présence des facteurs cellulaires CD81, CLDN1, OCLN, EGFR et EphA2, ainsi que d'un environnement acide (Blanchard *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2007; Lupberger *et al.*, 2011). Le virus est ensuite décapsidé et l'ARN est rendu disponible pour être traduit par la machinerie cellulaire et transcrit par la polymérase virale.

En plus de l'entrée via la membrane basolatérale des hépatocytes, un autre mode d'entrée a été déterminé : la transmission de cellule à cellule (Timpe *et al.*, 2008; Witteveldt *et al.*, 2009). Le virus peut ainsi passer directement d'une cellule à l'autre en présence des récepteurs cellulaires CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN et EGFR (Brimacombe *et al.*, 2011; Lupberger *et al.*, 2011; Timpe *et al.*, 2008). Ce mode de transmission du virus lui permet d'échapper à la majorité des anticorps neutralisant mais aussi aux DAAs (Xiao *et al.*, 2014). Chez les patients, ce mode de transmission du virus apparaît comme étant le principal (Brimacombe *et al.*, 2011; Wieland *et al.*, 2014).

b. Traduction et réplication de l'ARN viral

Suite à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme, ce dernier va être pris en charge par les facteurs cellulaires (Niepmann, 2013). Comme évoqué précédemment, le génome du HCV contient une seule ORF entourée par deux régions UTRs. L'initiation de la traduction commence avec le recrutement de la sous-unité 40S au niveau de l'IRES virale. L'interaction de la sous-unité ribosomique se fait de telle sorte que le site P se trouve directement à proximité du codon START AUG échappant ainsi à l'étape du scan (Hellen and Pestova, 1999; Pestova *et al.*, 1998). Suite à l'interaction du 40S à l'IRES, le complexe cellulaire eIF2-GTP-Met-ARNti et le facteur eIF3 sont recrutés par la SLIII et rejoignent la sous-unité 40S formant ainsi le complexe 48S (Pestova *et al.*,

1998). Ainsi, le complexe eIF2 se positionne de façon à former la première interaction codon-anticodon entre l'ARN^{ti} et l'AUG virale. Le facteur eIF3 quant à lui va stabiliser le complexe ternaire et augmente l'efficacité d'initiation de la traduction. Une fois le 48S bien placé et stabilisé, une molécule de GTP va être hydrolysée en GDP par le facteur cellulaire eIF5 (aidé par la présence de la SLII virale), et libérer le facteur eIF2-GDP. Une autre hydrolyse du GTP en GDP par eIF5 sera nécessaire pour libérer eIF3 au moment du recrutement de la sous-unité 60S (pour revue (Niepmann, 2013)). Le ribosome 80S complet peut ainsi procéder à la traduction de l'ARN viral selon le même schéma que pour un ARNm cellulaire avec les étapes d'élongation et de terminaison de la traduction (Hoffman and Liu, 2011).

La traduction du peptide signal en C-terminal de la polyprotéine virale permet d'adresser cette dernière vers le RE. La poly-protéine ainsi relocalisée est maturée par les protéases virales (NS2 et NS3/4A) et cellulaires, permettant ainsi la libération des 10 protéines virales (**Figure 10**). Les protéines virales se retrouvent alors associées à la membrane du RE (Morikawa *et al.*, 2011).

Les protéines NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B ainsi maturées forment le complexe de réplication viral et synthétisent le brin d'ARN génomique (+) en ARN matrice (-) mais sont également capable de réaliser la réaction inverse. Cependant, ce mécanisme produit 10 fois plus d'ARN (+) que d'ARN (-) (Lohmann, 2013). Les néo-ARN génomiques transcrits à partir de l'ARN matrice sont à leur tour traduits, et produisent de nouvelles protéines virales qui en s'accumulant au niveau du RE initient la formation de nouveau virion.

De nombreux facteurs cellulaires interviennent dans les étapes de traduction mais surtout de réplication virale. Dans un premier temps, le miR-122 interagit dans la région 5'UTR du génome du HCV. Cette interaction, permet de stabiliser la structure secondaire de l'IRES, favorisant l'initiation de la traduction. La fixation du miR-122 permet également de protéger l'ARN viral contre les exonucléases cellulaires. Le rôle du miR-122 dans le cycle viral du HCV est décrit dans le paragraphe III.4.b. D'autre part, de nombreux facteurs cellulaires sont recrutés lors de la réplication virale. En effet, la « *vesicle-associated membrane protein-associated protein A* » hVAP (Gao *et al.*, 2004), hnRNPA1 (Kim *et al.*, 2007), la CypA et la cyclophiline B (CypB) favorisent la réplication de l'ARN viral. L'utilisation de la cyclosporine A (CsA) inhibe l'infection par le HCV de façon indépendante du système immunitaire et de la voie de l'interféron. La CsA est connue pour s'associer à la CypA et inhiber l'activité phosphatase de la calcineurine connue pour son rôle dans

Introduction

l'activation des cellules Lymphocytes T (LT). De façon intéressante, l'inhibition de CypA par ARN interférant résulte en une diminution de l'infection du HCV. CypA fut alors identifiée comme étant un facteur interagissant avec la polymérase virale NS5B. Le recrutement de CypA dans le complexe de réplication est essentiel à la synthèse des ARN viraux. De plus, le domaine catalytique protyl-peptidyl isomérase, est important pour la réplication du HCV (Liu *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2006). Le facteur cellulaire VAPA, qui interagit avec NS5A et NS5B, est important pour la formation du complexe de réplication et sa localisation au sein de radeau lipidique présent dans la membrane du RE (Gao *et al.*, 2004) (**Figure 8 et 10**).

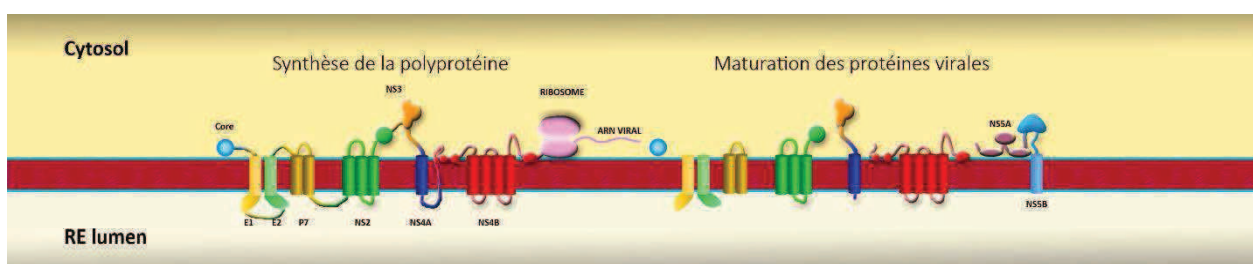


Figure 10 : Traduction et maturation de la polyprotéine virale. La polyprotéine virale est traduite au sein de la membrane du RE par la machinerie de traduction cellulaire. Suite à la traduction, la polyprotéine est clivée par les protéases virale et cellulaire en 10 protéines virales.

c. L'assemblage et la sécrétion

Les étapes d'assemblage et de sécrétion des nouveaux virions sont les étapes les moins décrites du cycle réplicatif. L'assemblage de la particule virale nécessite l'accumulation de protéines virales au sein de la membrane du RE avec une organisation spatio-temporelle stricte (Lindenbach, 2013). D'autre part, l'assemblage et la sécrétion des particules virales sont intimement liés au métabolisme des lipides (**Figure 8 et 11**).

Un des composants principaux de la protéine virale est la protéine core. La capsid est composée d'homodimères de la protéine core qui peuvent interagir avec l'ARN viral et avec la membrane du RE grâce à son domaine hydrophobe. Ces homodimères de core sont rapidement transférés sur les gouttelettes lipidiques cytosoliques (Boulant *et al.*, 2007).

Les glycoprotéines E1 et E2 forment un hétérodimère non-covalent qui est maintenu au niveau de la membrane du RE. Cependant, ce complexe va tout de même migrer près des

Introduction

gouttelettes lipidiques où l'assemblage a lieu grâce à l'interaction avec NS2 et p7 (Lindenbach, 2013). D'autre part, il est important de noter que toutes les protéines non-structurales ont un rôle dans l'assemblage. Ainsi, NS5A possède un domaine d'interaction avec la protéine core associée aux gouttelettes lipidiques qui amènerait l'ARN viral à proximité de core (Bartenschlager *et al.*, 2011). NS5A interagit également avec la protéine cellulaire apoE, qui est un facteur essentiel intervenant dans l'attachement et l'entrée, mais aussi l'assemblage et la sécrétion (Benga *et al.*, 2010).

La biogenèse virale est liée à la biogenèse des VLDL. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie de synthèse des VLDL inhibe également la production de nouveaux virions (Gastaminza *et al.*, 2008). D'autre part, apoE, apoB, apoA1, apoC1, apoC2 et apoC3 sont également retrouvées associées à la particule virale. La composition lipidique ressemble à la composition lipidique des VLDL et des LDL avec des esters de cholestérol qui représentent plus de la moitié des lipides présents dans la particule virale (Gastaminza *et al.*, 2008; Lindenbach, 2013) **(Figure 11)**.

La libération des virions requiert la voie de transport des endosomes ESC-RT (*endosome sorting complex required for transport*). La libération des virions formés dans le RE se fait via la voie de sécrétion cellulaire. Durant cette étape, les virions acquièrent leur caractéristique biophysique de faible densité. C'est également durant cette étape que les glycanes présents sur les glycoprotéines d'enveloppe sont modifiés (pour revue (Lindenbach, 2013)).

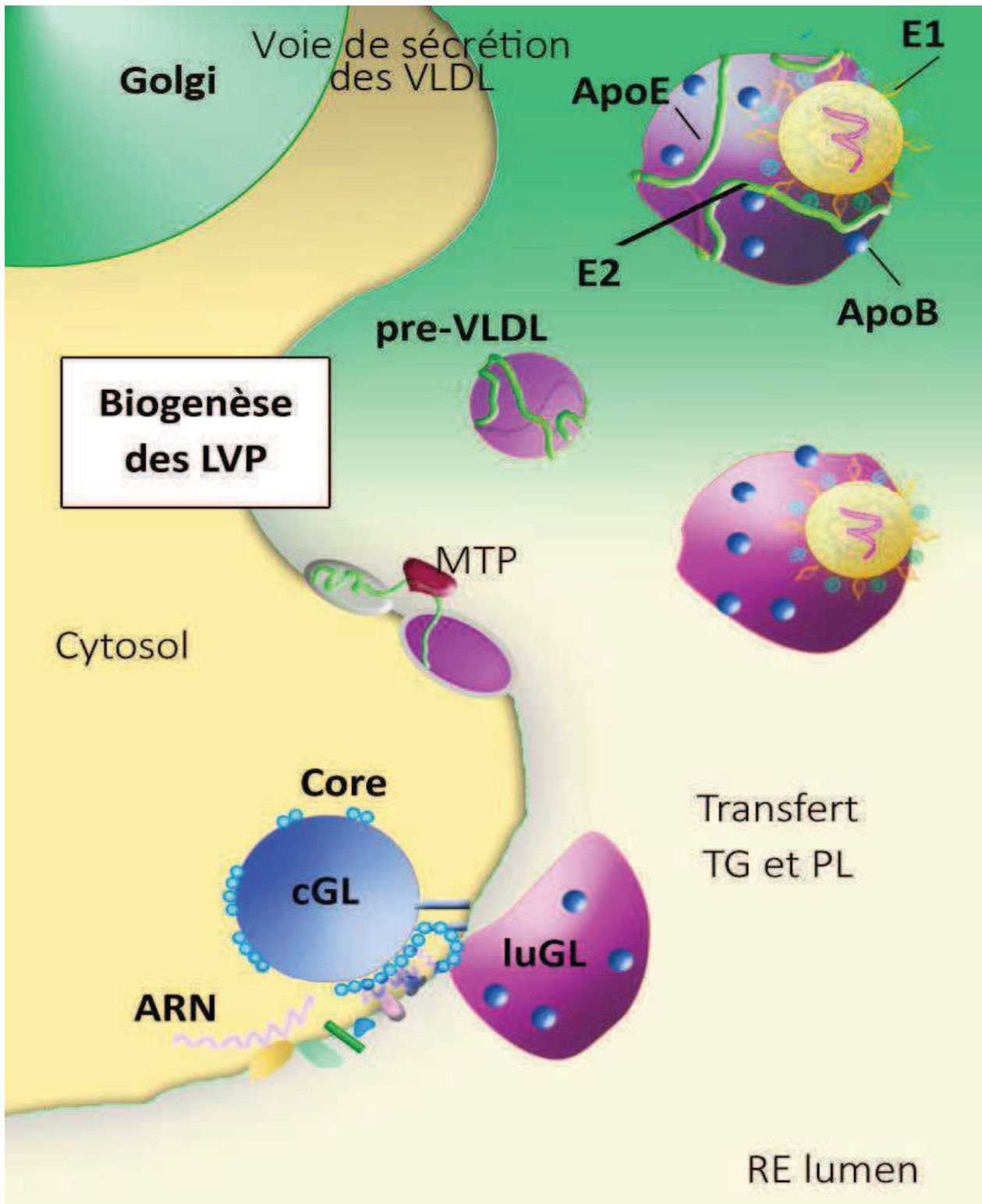


Figure 11 : Description de l'assemblage et de la maturation des particules virales. L'assemblage viral du HCV fait appel à la voie de synthèse et de sécrétion de VLDL. Ainsi, suite à la traduction au niveau de la membrane du RE, les protéines virales vont recruter de nombreux partenaires cellulaires au sein des gouttelettes lipidiques (GL). Une fois le virus assemblé, sa maturation lui apportera une molécule ApoB et plusieurs protéines ApoE, nécessaires à l'infection de nouvelles cellules.

4. Les modèles d'étude

a. Les modèles *in vivo*

Pendant plus de 20 ans, l'étude de l'infection du HCV a pu être réalisée chez le chimpanzé (*Pan troglodytes*). Les données obtenues ont permis de comprendre la pathogenèse du HCV (Alter *et al.*, 1978; Tabor *et al.*, 1978). En effet, les premières études sur le chimpanzé ont permis l'identification du HCV comme le virus responsable des hépatites non A non B, la création d'un clone ADNc du HCV, l'étude de la réponse immunitaire (Farci *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1992) et l'évaluation de l'efficacité de vaccins (Choo *et al.*, 1994; Folgori *et al.*, 2006). Cependant, son utilisation à des fins biomédicales, qui a toujours été rare en raison de contraintes éthiques et financières, a été arrêtée en 2013 en Europe et aux Etats-Unis.

Le tupaïa (*Tupaia belangeri*) est également susceptible à une infection par le HCV (Xie *et al.*, 1998). En effet, le HCV peut utiliser les protéines orthologues CD81, OCLN, SR-BI et CLDN1 exprimés chez le tupaïa pour infecter les hépatocytes de l'animal. Cependant, l'infection conduit à une expression du virus transitoire durant la phase aiguë de l'infection (Xu *et al.*, 2007), le tupaïa ne pouvant pas reproduire la phase chronique de l'infection observée chez l'Homme. De plus, l'absence de réactif spécifique et des difficultés d'élevage en captivité ont limité son utilisation pour la recherche.

Les souris sont naturellement résistantes à l'infection par le HCV. En effet, l'entrée du HCV est inhibée dans les cellules murine alors que les étapes d'assemblage et de libération des nouveaux virions ne semblent pas être limitées (Long *et al.*, 2011; Vogt *et al.*, 2013). Différents modèles murins ont été développés afin d'étudier la relation hôte-protéines virales mais également les différentes étapes du cycle viral du HCV.

Dans un premier temps, afin d'étudier les interactions entre les protéines virales et la cellule hôte *in vivo*, des souris immunocompétentes ont été génétiquement modifiées pour exprimer diverses combinaison de protéines virales (**Figure 12**). Les souris exprimant les protéines virales E1 et/ou E2, la protéine core, et/ou NS3/4A n'ont développé aucune lésion du foie (Frelin *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 1997; Koike *et al.*, 1995; Pasquinelli *et al.*, 1997). Cependant, des souris exprimant la poly-protéine virale dans son intégralité et à des niveaux plus physiologiques

ont développé des fibroses du foie et présentent une augmentation du risque de développer un HCC (Lerat *et al.*, 2002).

Par la suite, le développement de souris exprimant les facteurs cellulaires humains CD81 et OCLN nécessaires à l'entrée virale a permis de valider le rôle essentiel de ces facteurs au bon déroulement du cycle viral (**Figure 12**). De plus, ces modèles murins exprimant les facteurs d'entrée permettent d'évaluer l'efficacité antivirale des inhibiteurs d'entrée ainsi que de différentes approches vaccinales (Catanese and Dorner, 2015; Dorner *et al.*, 2011, 2013). Ce modèle a par la suite été amélioré. En effet, des modèles de souris dont le système immunitaire inné est invalidé ont été développées (pour revue (Mailly *et al.*, 2013)). L'inhibition des gènes stimulés par l'interféron ou des cellules NK (natural killer) qui participent à l'immunité innée permet de limiter la dégradation des hépatocytes exprimant les protéines humaines. Ces modèles permettraient alors d'étudier une réplication virale transitoire chez la souris. Cependant, une étude réalisée par l'équipe du Dr Miura dans laquelle des souris transgéniques exprimant les 4 récepteurs humains CD81, CLDN, OCLN et SR-BI a montré que les souris n'étaient malgré tout pas susceptibles à l'entrée du HCV (Hikosaka *et al.*, 2011).

Une avancée majeure dans la recherche sur le HCV a été le développement de la xénogreffe d'hépatocytes primaires humains (PHH) sur des souris SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*) (Mercer *et al.*, 2001). En effet, les PHH sont injectés dans la rate puis migrent via la veine portale dans le foie malade de la souris où la greffe et la repopulation du foie par les PHH va être initiée. Les souris chimériques ainsi produites permettent d'étudier l'infection par le HCV en l'absence d'un système immunitaire fonctionnel. C'est actuellement le modèle *in vivo* le plus couramment utilisé pour confirmer le rôle de facteurs cellulaires dans le cycle viral *in vivo* et de déterminer l'efficacité d'antiviraux (Kamiya *et al.*, 2010; Mailly *et al.*, 2015; Ohara *et al.*, 2011) (**Figure 12**).

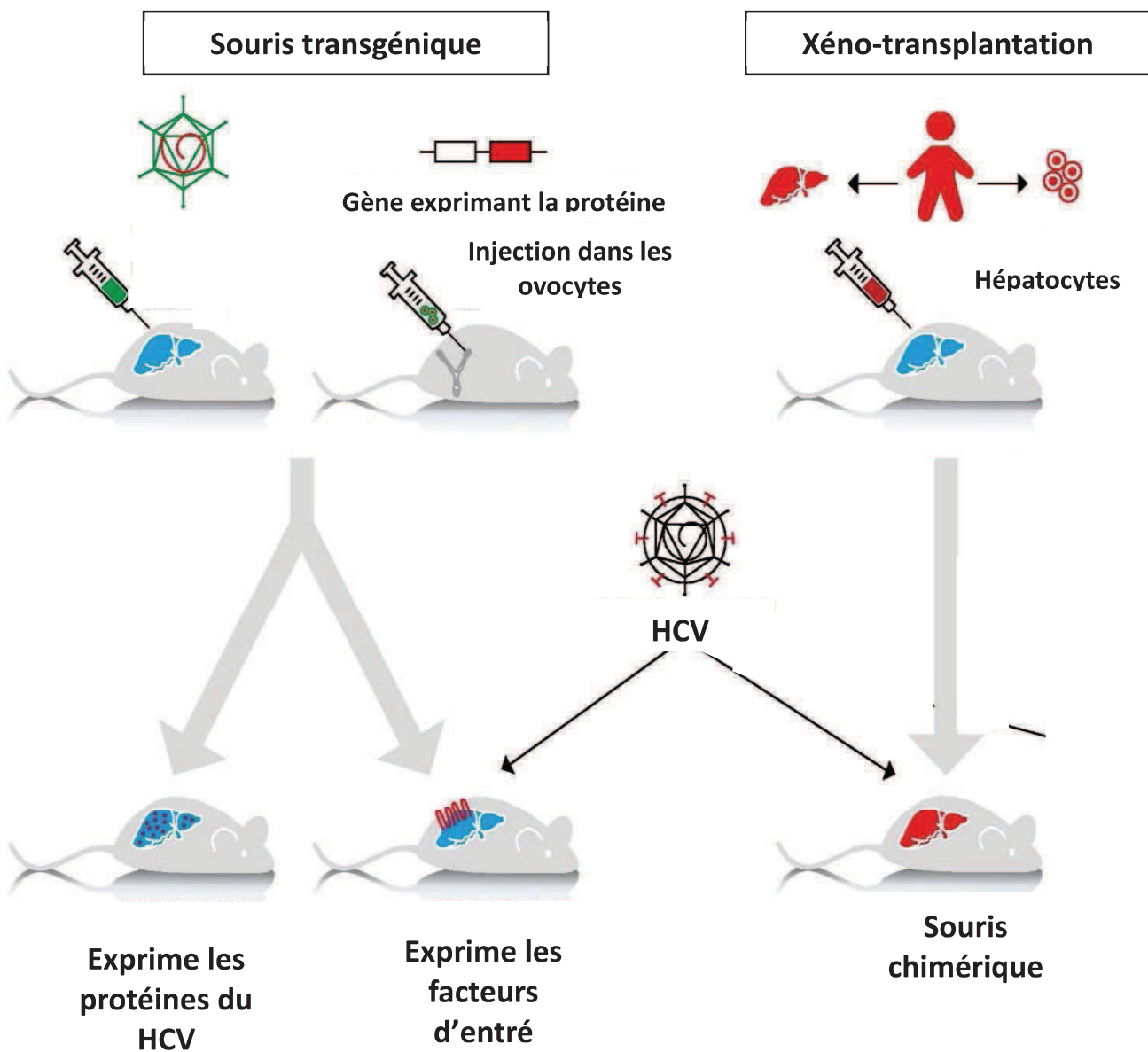


Figure 12 : Les différents modèles murins utilisés dans l'étude du HCV. A gauche, l'expression transitoire ou stable des gènes viraux permettent d'obtenir des informations sur l'interaction entre les protéines virales et cellulaires. Les souris peuvent également exprimer les facteurs humains essentiels à l'entrée virale. A droite, la xéno-transplantation des souris consiste en la repopulation du foie de la souris avec des hépatocytes humains (Mercer et al., 2001a). Figure adaptée de (Vercauteren et al., 2014)

Plus récemment, le modèle de souris déficiente pour les gènes *Fah Rag2* et *γ-c* (FRG) a été développé. Les souris FRG n'expriment pas la recombinaison *Rag2* et la chaîne *γ* des récepteurs de l'interleukine causant une immunodéficiência plus importante que pour les souris SCID. D'autre part, la déplétion du gène *Fah*, codant l'enzyme hydrolase fumaryl-acetoacetate, conduit à la dégradation du foie. Un traitement permet de prévenir cette dégradation c'est pourquoi ce modèle peut subir la transplantation des hépatocytes humain chez la souris adulte dès l'arrêt du traitement. Les souris FRG supportent l'infection par le HCV (Bissig *et al.*, 2010). Ce modèle murin est encore peu utilisé, cependant il peut être très intéressant pour l'étude des nouvelles molécules permettant de lutter contre le HCV (pour revue (Mailly *et al.*, 2013)).

D'autres modèles de souris SCID greffées avec des cellules hépatiques et hématopoïétiques d'un même donneur ont été développées. La double greffe permet d'une part la repopulation du foie de la souris par les PHH, mais aussi la production des lymphocytes T et B ainsi que des cellules NK d'origine humaine. Ces modèles ont permis l'étude de la réponse des lymphocytes T suite à l'infection par le HCV. Les lymphocytes B ont une faible réponse chez les souris en présence du HCV, empêchant l'analyse de ces cellules lors de l'infection virale (Washburn *et al.*, 2011).

b. Les modèles *in vitro*

i. Les hépatocytes et lignées hépatocytaires

Le HCV possède un tropisme strict et se réplique principalement dans les hépatocytes humains. Cependant, le virus dérivé du sang de patient n'infecte pas efficacement les PHH et les lignées hépatocytaires. Ainsi, le développement d'un modèle cellulaire capable de reproduire efficacement l'ensemble du cycle viral a pris du temps.

A ce jour, les cellules les plus permissives à la réplication du HCV sont les Huh7 et ses dérivées. Ainsi, les cellules Huh7.5 et Huh7.5.1 correspondant à des clones sélectionnés pour leur capacité à répliquer plus efficacement le HCV sont les plus utilisées pour étudier le HCV (Blight *et al.*, 2000). Ces cellules sont déficientes pour l'expression de la protéine *Retinoic Acid-Inducible Gene 1* (RIG-I), résultant en une diminution de la voie de signalisation antivirale (Sumpter *et al.*, 2005). Cependant, ces cellules ne sont pas polarisées, la localisation des récepteurs à la surface des

cellules n'est pas représentative des hépatocytes dans le foie. Des approches permettant l'étude du HCV dans des cellules polarisées ont été développées par l'ajout de 1 % de DMSO dans le milieu de culture (Bauhofer *et al.*, 2012; Sainz and Chisari, 2006). En effet, la différenciation des cellules dérivées de cellules Huh7 avec le DMSO permet aux cellules d'acquérir un phénotype et une expression génique se rapprochant fortement des hépatocytes. D'autre part, elles restent hautement permissives à l'infection par le HCV. De façon intéressante, les cellules Huh7.5 différenciées en présence de DMSO pendant 14 jours retrouvent une expression physiologique de marqueurs spécifiques des hépatocytes incluant l'albumine, le facteur hépatique nucléaire 4 α et l' α_1 -antitrypsine (Bauhofer *et al.*, 2012). D'autre part, la différenciation des cellules Huh7.5 arrête également leur prolifération. Elles récupèrent aussi une morphologie proche des hépatocytes, avec la présence de un ou deux noyaux par cellule, mais aussi un ratio noyau/cytoplasme bas, et contiennent plusieurs nucléoli (Sainz and Chisari, 2006).

Une approche plus physiologique de l'étude du HCV en culture cellulaire consiste en l'utilisation de PHH (Hépatocyte Humain primaire) (Ploss *et al.*, 2010). Les PHH représentent la cible naturelle du HCV et proviennent de plusieurs donneurs. En effet, ils sont isolés suite à des résections chirurgicales du foie de patients. Cependant, ce système est limité par la disponibilité des résections, mais aussi par le coût élevé de la procédure d'isolement, la perte de la différenciation de ces cellules, ainsi que la difficulté à réaliser des expériences complexes (Krieger *et al.*, 2010). De plus, les PHH sont peu permissives à l'infection par le HCV comparé aux lignées hépatocytaires (Ploss *et al.*, 2010).

ii. Glycoprotéines d'enveloppe recombinantes, particules virus-like et réplicons

A cause de la difficulté de réaliser des expériences d'infection *in vitro*, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 recombinantes ont été utilisées pour étudier leur interaction avec les cellules de l'hôte. La forme soluble de la glycoprotéine de surface E2 (Michalak *et al.*, 1997) a permis l'identification des récepteurs CD81 et SR-BI, ainsi que des héparanes sulfates. Cependant, ce système ne permet pas d'obtenir l'hétérodimère E1-E2 présent lors de l'entrée virale, limitant ainsi ce système à l'étude de l'interaction de E2 ou E1 avec les récepteurs cellulaires.

Les particules virus-like (VLPs) formés par auto-assemblage des protéines core, E1 et E2 du HCV ont ensuite permis de réaliser des expériences d'attachement et d'entrée (Baumert *et al.*,

1998) et d'étudier le rôle des héparanes sulfates, CD81 et SR-BI dans ces processus (pour revue (Barth *et al.*, 2006)). Ce modèle a également montré son utilité dans l'étude des anticorps neutralisants (Steinmann *et al.*, 2004).

Le développement du système de réplicon subgénomique du HCV a permis quant à lui d'étudier la réplication virale mais aussi les interactions entre les protéines virales et cellulaires (Lohmann *et al.*, 1999). Le réplicon est un ARN bicistronique contenant un gène de résistance à la néomycine dont la traduction est permise par la présence en 5' de l'IRES du HCV, et en 3' des gènes codant les protéines non structurales du HCV sous l'influence de l'IRES du virus de l'encephalomyocardite (VEMC). Cette séquence est entourée par les 5' et 3' UTR du HCV.

iii. Les pseudos particules du HCV (HCVpp)

L'étude de l'entrée virale a ensuite été réalisée plus en détail grâce au développement des HCVpp. Les HCVpp sont des particules rétrovirales défectives qui expriment les glycoprotéines de surface E1 et E2 du HCV. Les HCVpp sont produits suite à la co-transfection dans des cellules HEK293-T, les gènes codant les glycoprotéines E1 et E2, les protéines Gag-Pol provenant du HIV ou du MLV, et un génome rétroviral exprimant un gène rapporteur luciférase, β -galactosidase ou GFP qui permet de mesurer l'efficacité de l'étape d'entrée des HCVpp dans la cellule cible (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Ce système a été utilisé pour étudier le rôle des glycoprotéines E1 et E2 mais aussi pour identifier des récepteurs et autres facteurs nécessaires à l'attachement et l'internalisation du HCV (Blanchard *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2007; Lupberger *et al.*, 2011; Ploss *et al.*, 2009). Enfin les HCVpp exprimant les glycoprotéines d'enveloppe dérivés de patients ont permis de tester les propriétés des anticorps neutralisants dirigés contre E1 et E2 (pour revue (Zeisel *et al.*, 2013c)).

iv. Le HVC dérivé de la culture cellulaire (HCVcc)

Les réplicons génomiques ne permettaient pas de générer des particules infectieuses en culture cellulaire. Cependant, un réplicon génomique de génotype 2a, cloné à partir d'un virus responsable d'une hépatite fulminante chez un patient japonais (JFH1), a permis pour la première fois d'obtenir une infection productive sur des cellules Huh7 (Wakita *et al.*, 2005).

Le développement des HCVcc a permis d'étudier le cycle viral dans son intégralité (pour revue (Catanese and Dorner, 2015)). Ils ont d'une part permis de confirmer le rôle de nouveaux facteurs impliqués dans l'entrée tels que CLDN1, OCLN, EGRF et EphA2 (Colpitts *et al.*, 2015), mais aussi d'étudier l'assemblage et la libération des virions (pour revue (Paul *et al.*, 2014)), ou encore de caractériser les propriétés structurales et biophysiques des particules virales (Catanese *et al.*, 2013). Enfin, les HCVcc permettent d'infecter les chimpanzés mais aussi les modèles murins, facilitant ainsi l'évaluation des nouveaux vaccins et molécules antivirales (Jong *et al.*, 2014).

Par la suite, des virions de HCVcc chimériques entre plusieurs génotypes ont été mis au point (Catanese and Dorner, 2015). Ces virus chimériques ont une meilleure efficacité de réplication et de propagation dans les pHH et en lignée cellulaire. Plusieurs mutations au sein du génome viral peuvent augmenter l'efficacité de la propagation virale en favorisant chacune des étapes clés du cycle virale tel que l'entrée, la réplication de l'ARN ou encore le relargage des particules virales. Ainsi différents virus chimère ont été développés tels que J6/JFH1 comprenant la région Core-NS2 provenant du virus J6 (génotype 2a) et la région NS3-NS5B provenant du clone JFH1 (Lindenbach *et al.*, 2006).

D'autre part, de nombreux génomes rapporteurs ont été développés permettant de faciliter et de pouvoir suivre la réplication virale grâce à un signal fluorescent ou luminescent. Ces signaux sont dus à la présence d'une protéine rapportrice du type GFP ou luciférase. Le gène codant la protéine rapportrice est incorporé dans le génome viral et est traduit au sein de la poly protéine virale. Des sites de clivages incorporés de part et d'autre de la protéine lui permettent d'être cliver par NS3/4A comme les autres protéines virales (Horwitz *et al.*, 2013; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014). Une autre construction permet d'exprimer la protéine rapportrice fusionnée avec une des protéines virales comme NS5A par exemple (Gottwein *et al.*, 2011). Le modèle JcR2a, par exemple, est un virus rapporteur monocistronique dérivé du virus chimère Jc1 (génotype 2a). La luciférase Renilla est fusionnée en N-terminal à la région N-terminal de core et en C-terminal avec la séquence du peptide 2A provenant du virus de la fièvre aphteuse (FMDV) qui permettra la libération par auto-clivage de la luciférase du reste de la poly-protéine virale (Schmitt *et al.*, 2011).

III. Les micro-ARNs

1. Découverte des micro-ARNs

Au début des années 1990, l'équipe du Dr Jorgensen fait des recherches sur les mécanismes de coloration des Pétunias. Afin d'assombrir la couleur des fleurs, ils ajoutent des exemplaires supplémentaires d'un gène codant une enzyme productrice de pigment DFR (dihydroflavonol reductase). De façon surprenante, ils observent une perte de la production des pigments, et décrivent le mécanisme SPTG (silence post transcriptionnel des gènes). En effet, les gènes ajoutés sont transcrits cependant les ARNm endogènes et exogènes produits sont dégradés (Napoli *et al.*, 1990).

Parallèlement, l'étude du développement du nématode *Caenorhabditis elegans* met en évidence l'existence de petites séquences d'ARN non codant (ARNnc) transcrit à partir du génome : les miRs (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). En effet, les équipes des Drs Ambros et Ruvkun décrivent au cours de la même année le petit ARN lin-4 et son rôle-clé pour le développement du nématode. L'équipe du Dr Ambros identifie que le gène lin-4 ne code pour aucune protéine, mais permet la production de deux petits ARNs de 60 et 22 nucléotides (Lee *et al.*, 1993). L'équipe du Dr Ruvkun détermine que la protéine lin-14, qui est indispensable au développement de la larve, subit une régulation post-transcriptionnelle. De plus, ils démontrent que cette régulation est inversement proportionnelle à l'expression du micro-ARN lin-4. Enfin, l'analyse des séquences a permis d'identifier des régions complémentaires entre lin-4 et la région 3'UTR de l'ARNm de lin-14 (Wightman *et al.*, 1993).

Par la suite, c'est en 1998 que les Drs Fire et Mello décrivent pour la première fois les mécanismes moléculaires de l'interférence à ARN. En effet, ils observent l'inhibition de l'expression des gènes *unc-22* et *mex-3* chez *C. elegans* suite à l'injection d'un ARN bicaténaire spécifique (Fire *et al.*, 1998). Depuis, le phénomène d'interférence a été observé chez les insectes, la grenouille, la souris mais aussi chez l'Homme.

Les miRs furent classés comme étant une catégorie distincte de régulateur de l'expression génique non-protéique au début des années 2000. Aujourd'hui, on compte plus de 2000 miRs dans le génome humain (www.miRbase.org).

2. Biogenèse des micro-ARNs

Les miRs sont des petits ARNs régulateurs qui sont présents dans le cytoplasme sous forme de duplex d'une taille moyenne de 21 nucléotides. De nombreux travaux ont mis en évidence leurs rôles dans l'inhibition de l'expression de gènes via la dégradation ou la séquestration de l'ARNm cible, mais aussi via l'inhibition traductionnelle. Plus récemment, des études ont montré que les miRs peuvent également augmenter l'expression des gènes par activation des étapes d'initiation de la transcription et de la traduction (Majid *et al.*, 2010). Les miRs interviennent dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que le développement embryonnaire-larvaire, l'oncogenèse, la suppression de tumeur, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire ou encore l'interaction hôte-pathogène. Ils sont exprimés de manière différentielle selon le tissu ou le stade de développement de l'individu. Ainsi, miR-122 s'exprime spécifiquement dans le foie, miR-124a dans le système nerveux et miR-206 dans le muscle squelettique, au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre (Wienholds *et al.*, 2005).

Les miRs sont produits à partir d'un long transcrit précurseur structuré en tige-boucle. Le processus de maturation de ces ARNs se déroule en plusieurs étapes et fait intervenir de nombreux complexes moléculaires. Des processus de maturation canonique et non-canonique ont été bien caractérisés. Dans les paragraphes suivants, nous allons uniquement décrire le processus de maturation canonique.

La majeure partie des miRs sont transcrits par la polymérase II ; ils sont donc coiffés en 5' (7-méthylguanosine) et poly-adiénylés en 3' (Cai *et al.*, 2004). Cependant, certains miRs associés à des séquences répétées Alu peuvent être transcrits par la polymérase III. Certains miRs sont donc soumis aux modulations de l'expression transcriptionnelle en association avec la polymérase II, et peuvent ainsi être spécifiquement synthétisés en fonction du type cellulaire ou encore des conditions de stress ou de l'état physiologique de la cellule. Selon la classification, on distingue deux grandes classes de structures de gène codant les miRs (**Figure 13**). Les miRs « autonomes » ont un transcrit qui leur est propre. Il peut y avoir un seul miR sur le transcrit primaire ou plusieurs miRs en cluster sur le même transcrit. Les miRs « passagers » quant à eux sont présents sur des transcrits codants pour un ARNm ou un ARNnc. Ils peuvent se présenter en cluster au sein d'un

intron d'un ARNnc ou d'un préARNm, mais également seul sur un ARNnc ou encore en 3'UTR d'un pré-ARNm (Krol et al., 2010).

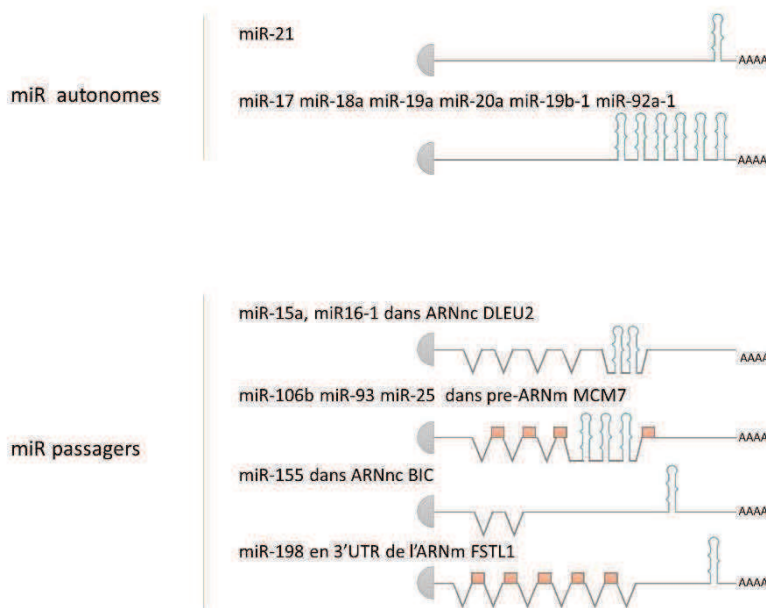


Figure 13: Localisation génique des miRs. Les miRs « autonomes » ont un transcrite qui leur est propre. Il peut y avoir un seul miR sur le transcrite primaire comme pour miR-21, ou plusieurs miRs en cluster sur le même transcrite comme dans le cas des miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1. On peut également trouver des miRs « passagers ». Ces miRs sont présents sur des transcrits codants pour un ARNm ou un ARN non -codant. Les miRs peuvent se présenter en cluster au sein d'un intron d'un ARNnc comme le cluster miR-15a et miR16-1 dans DLEU2, au sein de l'intron d'un pre-ARNm comme le cluster miR-106b, miR-93, miR-25 dans MCM7 ou seul comme le miR-155 en 3' du transcrite de l'ARNnc BIC ou enfin en 3'UTR d'un ARNm comme miR-198 dans FSTL1.

Une fois le pri-miR transcrite, il se structure en une longue tige de 33 nucléotides comportant des mésappariements, une boucle et des parties simple brin. Cette première étape est réalisée dans le noyau par le micro-processeur composé principalement de Drosha et DGCR8 (*Di George Critical Region 8*). Dans un premier temps, DGCR8 va reconnaître la taille de la boucle, se fixer dans la région de la tige-boucle la moins stable puis diriger le clivage réalisé par Drosha (**Figure 15**). Drosha porte deux domaines RNase III en tandem (Han et al., 2006; Lee et al., 2003) ce qui lui permet de réaliser un clivage asymétrique du pri-miR de 11 paires de base (Zeng et al., 2005). Ainsi, le pri-miR subit une première maturation en pré-miR qui se structure en une tige boucle de 60-70 nts, une extrémité 5' avec un groupement phosphate et 2 nucléotides non-appareillés en 3'.

Introduction

Le pré-miR ainsi obtenu va être exporté du noyau vers le cytoplasme par transport actif GTP-dépendant médié par l'Exportine 5 (Exp5) (Zeng and Cullen, 2004) (**Figure 14**).

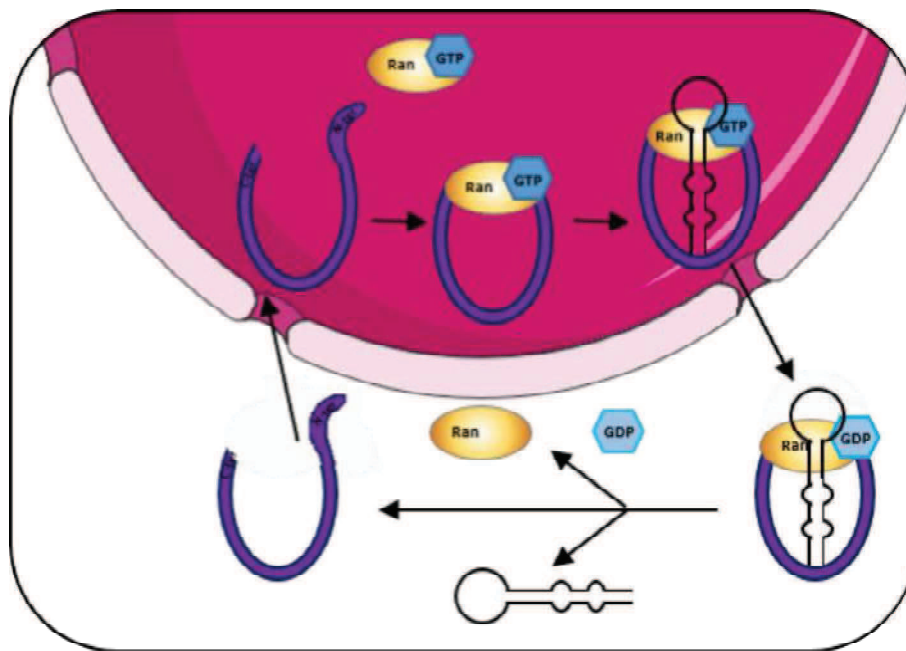


Figure 14 Reconnaissance et exportation du pré-miR par l'exportine 5 (adapté de (Wang et al., 2011)

L'exp5 est produite dans le cytoplasme puis est importée dans le noyau où elle interagit avec la protéine Ran-GTP. Cette interaction permet de restructurer l'exp5 et de former ainsi une cavité dans laquelle sera accueilli le pré-miR. L'exportation commence par la reconnaissance de la structure tige-boucle inférieure à 14 paires de bases possédant deux nucléotides non-appariés en 3'. Le complexe ainsi formé prévient la dégradation du pré-miR dans le noyau, et l'hydrolyse du GTP en GDP permet quant à elle de libérer le pré-miR dans le cytoplasme. L'exp5 libre est redirigée de nouveau dans le noyau (Wang et al., 2011).

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miR va être reconnu et pris en charge par Dicer, une protéine cytoplasmique possédant de nombreux domaines fonctionnels (**Figure 15**). Dicer est composée d'un domaine hélicase, deux domaines RNase III en tandem, un domaine de fixation à l'ARN double brin et une signature PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille). Le domaine PAZ va permettre la reconnaissance des deux nucléotides du pré-miR en 3', et le domaine de liaison à l'ARN double brin (ARNdb) permet la reconnaissance de la tige du pré-miR. Pour pouvoir cliver le pré-miR, Dicer s'associe avec d'autres partenaires sur l'ARN : TRBP (*HIV-1 transactivating response RNA-binding*

protein) et PACT (*protein activator of PKR*) qui possèdent chacun un domaine de liaison à l'ARN, formant ainsi le complexe Dicer/TRBP, Dicer/PACT ou Dicer/TRBP/PACT (Chendrimada *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). L'interaction de ces protéines avec Dicer permet de faciliter la fixation de la protéine au miR dirigeant le clivage et favorise l'activité catalytique de cette dernière. Cependant, elles ont également un rôle important dans le recrutement des différentes protéines du RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Chendrimada *et al.*, 2005; Fukunaga *et al.*, 2012). Le complexe ainsi formé va permettre le clivage et l'élimination de la boucle du pré-miR conduisant à l'obtention d'un duplex imparfait comprenant un miR-3p et un miR-5p d'une longueur variant entre 18 et 22 paires de base avec deux extrémités 3' sortantes (Filipowicz *et al.*, 2005).

Le duplex obtenu est ensuite incorporé dans le RISC. On retrouve alors associé au miR mature une protéine Argonaute (Ago1 à 4), mais aussi des hélicases comme Gemin3 ou RCK/p54. Les quatre protéines Argonautes ont été trouvées associées à un miR ou siARN chez l'Homme. La protéine Ago1 est le plus souvent associée à une accumulation des miRs alors que Ago2 est associée à la dégradation d'ARNm médiée par les miRs (Meister and Tuschl, 2004). Les protéines Argonautes sont composées de trois domaines. Le domaine PAZ en N-terminal permet la reconnaissance des deux nucléotides non-appareillés en 3', le domaine Mid reconnaît le 5'phosphate du miR mais aussi la coiffe m7G de l'ARNm. Enfin, le domaine PIWI est structuré comme une RNase H permettant l'activité endonucléase du RISC (Graves and Zeng, 2012).

D'autres protéines sont incorporées au complexe, telles que la famille des GW182. Ces protéines interagissent directement avec les protéines Argonautes et sont essentielles à l'activité des miRs. Ces protéines ont un poids moléculaire de 182 kDa et sont composées de nombreuses répétitions du motif glycine tryptophane (GW) impliqué dans l'interaction avec la protéine Ago. Il existe trois protéines de la famille des GW182 chez les vertébrés (*trinucleotid repeat-containing 6A ou TNRC6A/GW182, TNRC6B et TNRC6C*).

Suite à l'incorporation du duplex miR mature dans le RISC, un seul brin (guide) déterminé selon la stabilité thermodynamique des extrémités de chacun des brins va être conservé au sein du complexe. Le brin passager quant à lui est dissocié du brin guide et exclu du RISC pour être dégradé. Cependant, chacun des brins peut être incorporé dans le RISC de façon tissu-spécifique. Par exemple, miR-30e-3p est retrouvé accumulé dans les cellules de l'estomac, alors que son brin complémentaire, le miR-30e-5p, est spécifique à la rate (Tétreault and De Guire, 2013). Le brin

Introduction

restant est alors composé de deux régions bien distinctes : la région « *seed* » ou tête en 5' des nucléotides 2 à 7 impliqués dans l'appariement et la région en 3' importante dans la reconnaissance de la cible.

Le complexe RISC mature va être guidé par le miR incorporé vers l'ARNm cible et réaliser le mécanisme de l'interférence à ARN (ARNi).

Il existe aussi des voies de biogenèse non-canonique qui ne suivent pas le processus décrit précédemment, permettant la maturation des mirtrons, simtrons, snomiRs, ARNt-miR.

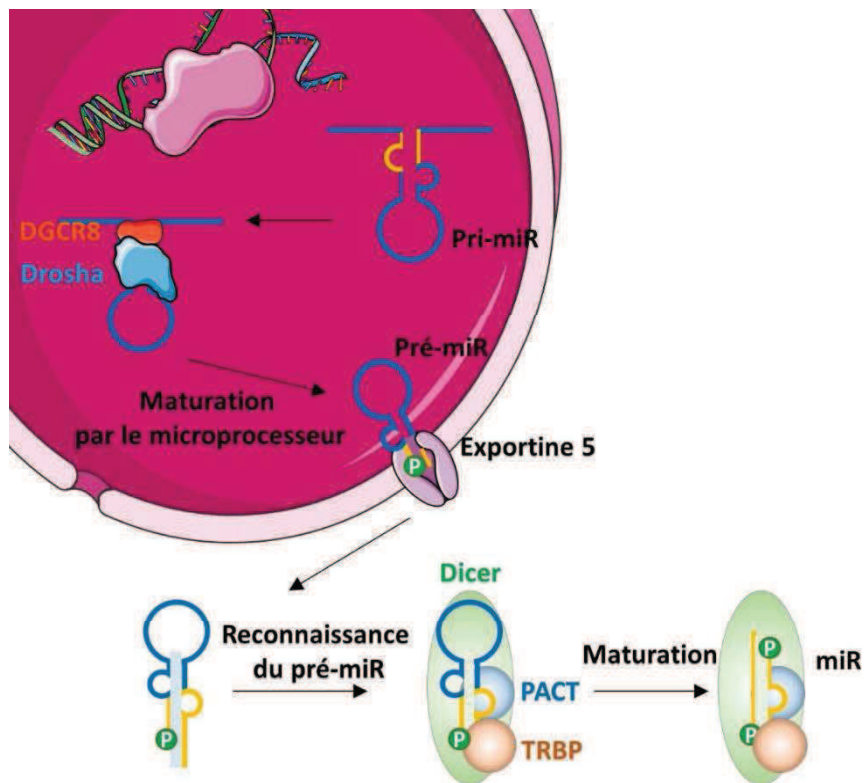


Figure 15: Représentation schématique de la biogenèse canonique des miRs. Suite à la transcription par la polIII, le pri-miR va être pris en charge par Drosha et DGCR8 et maturé en pré-miR. Le pré-miR est alors exporté par l'exp5 puis pris en charge par Dicer dans le cytoplasme qui relarguera un miR mature double brin d'environ 21 nts.

3. Mécanisme d'action des miRs

a. Appariement du miR à sa cible

Le RISC inhibe l'expression d'un ARNm spécifique grâce à l'interaction du miR guide présent au sein du complexe avec son ARNm cible. Le complexe interagit spécifiquement entre la région 3'UTR de sa cible au niveau du MRE (*miRNA response element*) et la région « *seed* » du miR. Des règles d'appariement ont été identifiées grâce à des analyses expérimentales et bio-informatiques (pour revue (Filipowicz *et al.*, 2008) (**Figure 16**)).

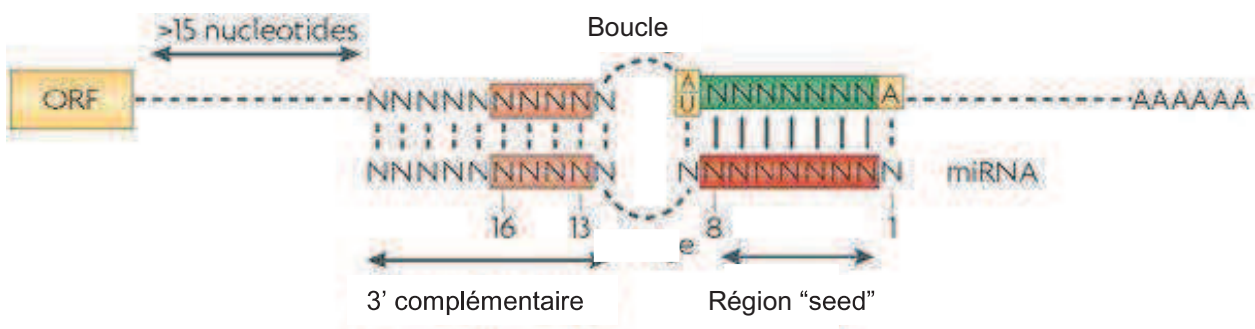


Figure 16 : Représentation schématique de l'interaction spécifique entre un miR et sa cible (adapté de (Filipowicz *et al.*, 2008)).

L'appariement parfait et continu de type Watson-Crick des nucléotides 2 à 8, de la région 5' du miR « *seed* », long en moyenne de 6 pb, est indispensable à l'activité du miR. Cependant, il peut exister des appariements GU ou des mésappariements au sein de cette région entre la cible et le miR qui diminuent grandement l'efficacité de l'inhibition. D'autre part, la présence d'une base A en position 1 du miRNA et A ou U en position 9 augmente l'efficacité du site même si ils ne sont pas appariés avec l'ARNm cible.

La présence d'un mésappariement dans la région centrale de l'interaction miR-ARNm empêche le clivage de la cible par la protéine Ago.

Enfin, il doit y avoir suffisamment d'appariements dans la région 3' du miR afin de permettre de stabiliser l'interaction. Les mésappariements et les boucles internes sont tolérés, cependant un bon appariement est nécessaire des résidus 13 à 16 du miR lorsque celui de la région « *seed* » n'est pas optimal (Filipowicz *et al.*, 2008). Ainsi, on retrouve les sites 3' supplémentaires qui se caractérisent par la présence d'un appariement de 3 à 4 paires de bases

des nts 12 à 17 en complément de l'appariement de la région « *seed* ». Les sites 3' compensatoires quant à eux vont compenser un appariement imparfait de la région « *seed* ». On retrouve alors un appariement d'au moins 9 nucléotides consécutifs à partir du 12^{ème} nt (Bartel, 2009).

Il a été également montré que les miRs peuvent se fixer sur la région 5'UTR ou sur la région codante de l'ARNm cible. Ces interactions peuvent induire une activation ou une inhibition de la traduction. En effet, l'équipe du Dr Hentze a montré chez la drosophile que miR-2 peut inhiber la traduction d'un ARN cible en se fixant en 5' UTR mais aussi dans la région codante. Le mécanisme privilégié pour expliquer cette inhibition est l'encombrement stérique généré par le RISC, empêchant le passage du ribosome lors de l'initiation (Moretti *et al.*, 2010). D'autre part, les miRs peuvent activer la traduction de leurs ARNs cibles comme dans le cas du miR-122 et de l'ARN génomique du HCV (Jopling *et al.*, 2005a), ou du miR-10a ciblant les ARNm des protéines ribosomales (Ørom *et al.*, 2008). En effet, l'équipe du Dr Lund a montré que le miR-10a favorisait la traduction des ARNm codant les protéines ribosomales en se fixant dans la région 5'UTR. Ainsi, le miR-10a contrecarre l'inhibition induite par les facteurs associés au motif 5' TOP présent sur ces ARNm. Le miR-10a augmente alors la production de protéines ribosomales et de façon indirecte mais significative la production globale des protéines cellulaires de façon tissu-spécifique (Ørom *et al.*, 2008).

Une fois que le RISC mature est associé à l'ARN cible, on observe une modulation de l'expression de cet ARNm d'intérêt. Deux mécanismes sont à ce jour décrits : l'inhibition de la traduction ou la dégradation de l'ARNm cible.

b. Inhibition de la traduction

La fonction principale des miRs est l'inhibition de la traduction. Cette inhibition peut avoir lieu pendant l'étape d'initiation, de l'élongation ou de terminaison. Il existe différents mécanismes d'inhibition par les miRs mettant en scène de nombreuses protéines cellulaires. Cependant, ces mécanismes sont complexes et restent encore mal connus malgré de nombreuses études.

A ce jour, deux mécanismes non exclusifs ont été décrits pour expliquer l'inhibition de l'initiation de la traduction par les miRs (**Figure 17**).

Le modèle le plus connu décrit le mRISC (contenant le miR mature) comme entrant en compétition avec le complexe eIF4F, en particulier au niveau de l'interaction entre eIF4E et la coiffe 5'. L'inhibition de cette étape empêche alors l'initiation de la traduction coiffe-dépendante. En effet une étude *in vitro* très complète a montré que les ARNm ayant une coiffe artificielle ne sont pas touchés par la régulation induite par les miRs. D'autre part, les miRs ayant un effet sur l'initiation de la traduction n'ont pas d'effet lorsque les ARNm cible ont en 5' UTR une séquence IRES leur permettant une initiation de la traduction coiffe-indépendante. Enfin, l'ajout en excès des éléments composant le complexe eIF4F dans la réaction a permis de supprimer l'inhibition de la traduction par les miRs (Mathonnet *et al.*, 2007). D'autres études ont démontré que la protéine Ago2 présente dans le RISC peut se fixer sur la coiffe m7G grâce à son domaine Mid. Cependant, cette compétition entre Ago2 et eIF4E reste encore aujourd'hui controversée. En effet, d'autres travaux ont mis en évidence que les résidus du domaine Mid d'Ago2 seraient impliqués dans une interaction avec son partenaire GW182. Une autre étude bio-informatique a montré qu'on ne retrouvait aucune similitude de motifs entre Ago2 et eIF4E (décrit dans (Chekulaeva and Filipowicz, 2009)).

Une autre hypothèse décrit l'inhibition de la traduction par les miRs au moment de l'assemblage des sous-unités 40S et 60S plus tardivement au cours de l'initiation de la traduction. En effet, il a été montré *in vitro* que Ago2 était retrouvée associée avec le facteur eIF6 et la sous-unité ribosomique 60S. eIF6 reste associé à cette sous-unité durant l'initiation de la traduction évitant ainsi une association trop précoce des deux sous-unités 40S et 60S. Il semblerait que le RISC recrute via Ago2 eIF6 inhibant ainsi l'assemblage du ribosome au niveau du codon START. Cette même étude a montré que la déplétion de eIF6 dans des cellules HELA permettait de lever l'inhibition d'un miR sur sa cible via ce mécanisme (Chendrimada *et al.*, 2007).

Différents mécanismes ont été décrits pour expliquer l'inhibition de la traduction par les miRs durant les étapes post-initiation.

Des études réalisées sur *C. elegans* ont montrés que le miR lin-4 inhibait la traduction de lin-14 et lin-28 sans avoir de conséquence sur l'abondance des ARNm. De plus, une sédimentation sur gradient de sucrose a permis de déterminer que ces deux ARNm étaient présents dans les fractions contenant les polysomes. Des expériences incluant des inhibiteurs de la traduction (puromycine, hippuristanol) ont permis de confirmer que les polysomes étaient actifs. En effet, en présence de ces inhibiteurs, les polysomes étaient dissociés en monosomes ou sous-unité ribosomique. Des observations similaires ont été réalisées chez le mammifère. En effet, Maronay *et al.* ont observé la co-sédimentation du messenger de KRAS associé au miR let-7 avec les polysomes (Maroney *et al.*, 2006). Ces résultats permettent de conclure que l'inhibition de la traduction de l'ARNm de KRAS par let-7 se situe à un stade post-initiation (pour revue (Filipowicz *et al.*, 2008; Huntzinger and Izaurralde, 2011)). Les mécanismes d'inhibition de l'élongation restent cependant très peu connus.

Le devenir des protéines néo-synthétisées reste aussi sans réponse. Les polypeptides naissant de gènes rapporteurs n'ont pas pu être détectés suite à des expériences d'immunoprécipitation ou de « *pulse chase* ». La dégradation des néo-peptides n'est prouvée que par résultats négatifs (absence du néo-peptide au sein des polysomes réprimés). D'autre part, des inhibiteurs du protéasome n'ont aucun effet sur l'inhibition médiée par les miRs, et aucune autre protéase n'a été identifiée à ce jour (pour revue (Filipowicz *et al.*, 2008)).

c. Dégradation de l'ARNm

La dégradation de la cible du miR est à ce jour le mécanisme le plus connus et le plus décrit. La dégradation de l'ARNm cible est le mécanisme retrouvé principalement chez les plantes (**Figure 17**).

Les premières études sur l'inhibition de l'expression des gènes par les miRs ne semblaient pas être associées à la dégradation de la cible chez l'animal. Cependant, des études réalisées plus tard ont permis de déterminer que des interactions ARNm-miR causaient une diminution importante de la quantité de ces ARNm cible en lien avec une dégradation. D'autres études sur le transcriptome ont pu mettre en évidence la corrélation inverse entre le taux de miR et l'abondance

Introduction

des cibles de ces miRs (Guo *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2005). En effet, des études ont montré que l'ajout de miR à des cultures cellulaires cause la dégradation de la cible contenant la séquence complémentaire au « *seed* ». A l'inverse, l'inhibition en culture cellulaire des facteurs essentiels à l'action des miRs (Dicer, les protéines Ago, ou GW182) permet d'observer une augmentation de la quantité des cibles connus de certains miRs (Rehwinkel *et al.*, 2005).

Le RISC associé à l'ARNm cible peut générer un clivage endonucléolotique à la condition d'avoir un appariement parfait entre le miR et sa cible. Or, l'appariement parfait entre un miR et sa cible est très rarement retrouvé chez les animaux mais beaucoup plus fréquemment chez les plantes. Chez l'homme, dans le cas d'un appariement parfait, la protéine Ago2 va cliver l'ARNm entre les positions 10 et 11 de l'appariement avec le miR. Suite à ce clivage, l'ARNm va être dégradé à partir du point de clivage par l'exosome de 3' en 5' et par des RNases de 5' en 3' (pour revue (Huntzinger and Izaurralde, 2011)).

Dans le cas d'un appariement imparfait, les miRs vont diriger leurs cibles vers les voies de dégradations des ARNs présents dans la cellule. De façon intéressante, les ARNm qui sont ciblés par les miRs sont retrouvés séquestrés au sein de foci cytoplasmiques : les P-Bodies (*Processing Bodies*). Ce sont des éléments mobiles qui sont décrits dans la littérature comme les usines à dégradation de l'ARN. On retrouve co-localisés dans les P-Bodies les miRs associés à leur cible ainsi que des protéines impliquées dans le décoiffage des ARNs (DCP1/DCP2) ou la dé-adénylation (CCR4, CAF1, NOT), des protéines activatrices du décoiffage (EDC3, Ge-1), des hélicases (RKC/p54) mais aussi les protéines de la famille des GW182 (pour revue (Kulkarni *et al.*, 2010)). Toutes ces protéines sont impliquées dans le mécanisme d'inhibition de l'expression génique médié par les miRs (Eulalio *et al.*, 2007a; Parker and Sheth, 2007). La relocalisation des ARNm ciblés par les miRs dans les P-Bodies permet d'une part de les éloigner de la machinerie de traduction et d'autre part de rapprocher spatialement tous les intervenants nécessaires à la dégradation d'un ARN. Cependant, les P-Bodies ne sont pas nécessaires à l'activité des miRs. Leur formation est une conséquence de l'inhibition médiée par les miRs et non une cause (Eulalio *et al.*, 2007b).

Suite à l'appariement du mRISC à sa cible, l'ARNm va dans un premier temps être dé-adénylé par le complexe cellulaire CAF1-CCR4-NOT, puis décoiffé par DCP2 associée à ses cofacteurs. Le décoiffage de l'ARNm est instantanément suivi par sa dégradation par XRN1, une exonucléase 5'-3' (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

Introduction

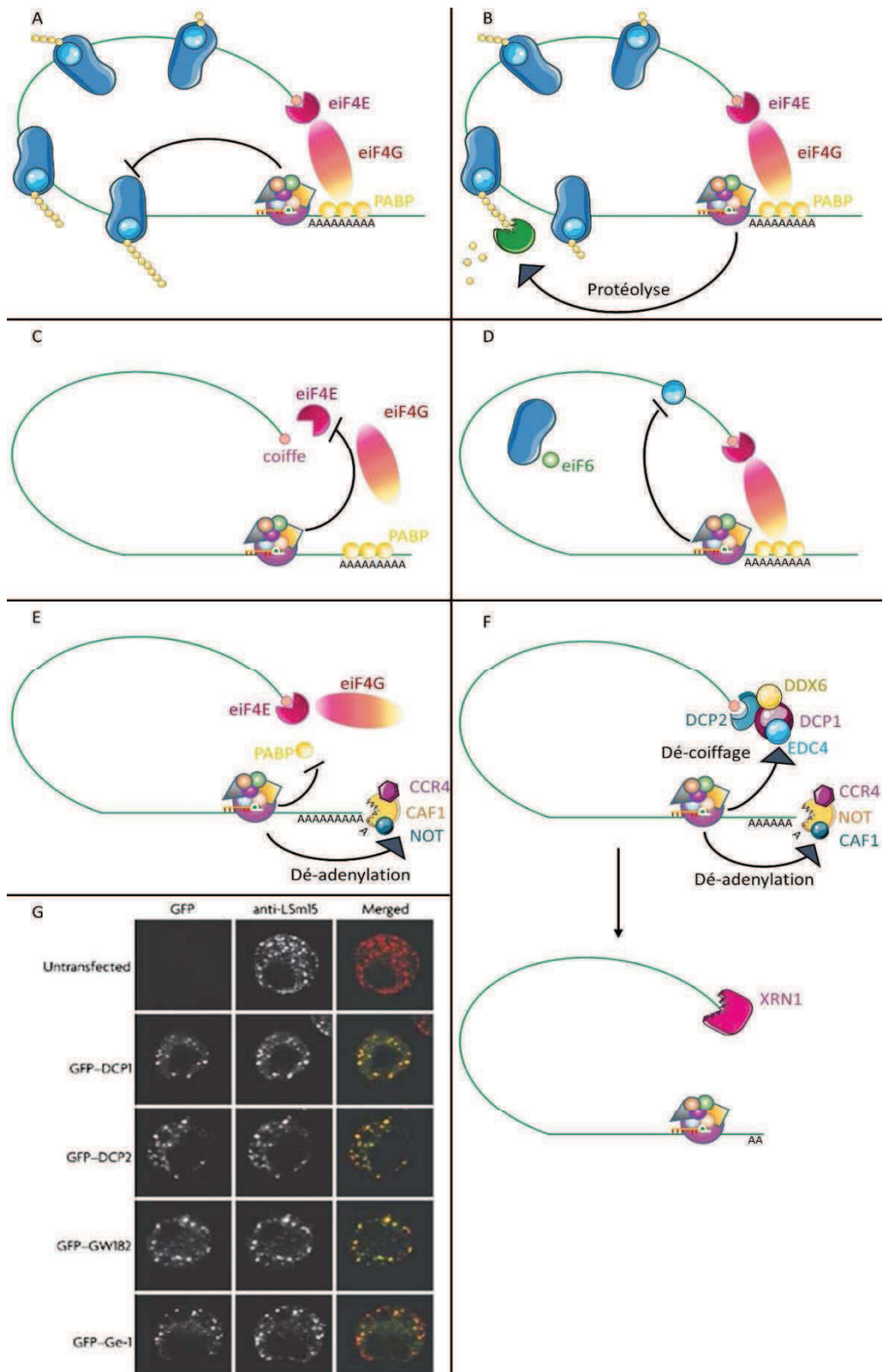


Figure 17 Inhibition de l'expression génique par un miR. (A) Inhibition de l'élongation de la traduction. L'interaction du miR associé au RISC avec le messenger bloque l'élongation de la traduction et favorise la dissociation des ribosomes. (B) Dégradation co-traductionnelle des peptides naissants. Ce modèle suggère que la traduction n'est pas inhibée mais que le mRISC recrute des protéases cellulaires qui dégradent le néo-peptide. Les protéases impliquées dans ce mécanisme restent à déterminer. (C-E) Inhibition de l'initiation de la traduction. (C) Les protéines impliquées dans le RISC, les Argonautes principalement, entrent en compétition avec le facteur eIF4E pour l'interaction avec la coiffe 5' du messenger cible. (D) Le RISC recrute le facteur eIF6 qui inhibe l'interaction précoce entre les deux sous-unités ribosomiques. L'association des deux sous-unités est donc plus difficile. (E) Le RISC recrute des composants de l'exosome cellulaire afin de déadényler le messenger cible. De plus, il va inhiber le recrutement des PABP essentiels à l'interaction avec eIF4G et la circularisation de l'ARN messenger. (F) Mécanisme d'action des miRs conduisant à la dégradation de l'ARN messenger cible. Le RISC va recruter des protéines impliquées dans le décoiffage et dans la déadénylation du messenger cible. Le messenger, une fois décoiffé et sans queue polyA, sera rapidement dégradé par l'exosome cellulaire. (G) Observation des P Bodies. Image de microscopie confocale de cellules de drosophile non transfectées (en haut) ou transfectées avec des vecteurs exprimant la GFP couplée aux enzymes de décoiffages DCP1 et DCP2 et les marqueurs de P-Bodies GW182 et GE-1. Image tirée de (Eulalio *et al.*, 2007a) (adaptée de (Eulalio *et al.*, 2008)).

4. Outils computationnels permettant l'analyse des miRs et de leurs cibles

Depuis la compréhension des mécanismes d'action des miRs, de nombreux outils informatiques ont été mis en place afin de prédire les cibles potentielles de ces miRs. Le mécanisme d'action des miRs est basé sur l'interaction de séquences complémentaires entre le miR et son ARNm cible (**Tableau 3**). De ce fait, de nombreux ARNm sont des cibles potentielles pour un seul miR. De nombreux algorithmes permettant la prédiction des cibles ont été mis au point. Ces algorithmes prennent en compte les connaissances actuelles sur le mode d'action des miRs dont la complémentarité des bases entre le miR et sa cible permet d'évaluer un score en lien avec la force d'interaction. Les nombreuses règles d'interaction ne sont pas encore toutes connues et maîtrisées c'est pourquoi chaque outil utilise sa propre combinaison de critères pour définir les cibles potentielles d'un miR d'intérêt. Cependant, certains critères sont communément utilisés.

- La séquence « *seed* »

Tous les programmes de prédiction de cibles pour les miRs prennent en compte les connaissances sur les lois d'appariement entre la localisation de l'interaction sur l'ARNm mais aussi la séquence « *seed* » du miR. Trois catégories peuvent être reconnues par le logiciel : 1- les sites canoniques des 7 ou 8 nucléotides appareillés qui sont présents dans la majorité des cas

Introduction

biologiques connus; 2- les sites supplémentaires en 3' en position 13 à 16 qui permettent d'apporter une efficacité plus accrue à l'effet du miR; 3- la présence de sites compensatoires qui permettront de compenser un mésappariement de la séquence « *seed* ». Chaque logiciel a ses propres exigences. Par exemple, TargetScan requiert des séquences strictement complémentaires, alors que miRanda autorise un appariement de type « *wobble* » (interaction G-U) dans la région « *seed* » s'il y a un site compensatoire en 3'. DIANA-micro-T, quant à lui, considère l'intégralité de la topologie du miR dans sa prédiction de cible (Tarang and Weston, 2014).

- La conservation du site cible

La conservation du site d'interaction du miR sur la région 3'UTR des différents gènes orthologues est un élément significatif dans la prédiction des cibles des miRs. En effet, une sélection naturelle positive est attendue pour des effets miR-ARNm important (Tarang and Weston, 2014).

- La stabilité thermodynamique

Les logiciels calculent également l'énergie thermodynamique nécessaire à l'interaction entre le miR et sa cible. En effet, la stabilité du complexe miR-ARNm est très importante pour l'activité enzymatique du complexe RISC (Tarang and Weston, 2014).

- Les sites multiples

Les programmes prennent aussi en compte le nombre de sites de fixation d'un même miR ou de plusieurs miRs sur un ARNm cible chez différentes espèces. Cependant, une identification de cible à l'aide de cette technique nécessite de nombreuses confirmations expérimentales. Le logiciel qui considère le plus ce paramètre est PicTar (Tarang and Weston, 2014).

Méthode de prédiction	Caractéristiques de l'outil	Référence
Diana Micro-T	Prédiction de cible basée sur les séquences de miR et d'ARNm	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/
FAME	Détermination des procédés biologiques affectés par les miRs. Les miRs impliqués dans des voies de signalisation sont validés expérimentalement	http://acgt.cs.tau.ac.il/fame/
Hoctar	Information sur les gènes codant un miR ainsi que leurs régulations	http://hoctar.tigem.it/
Magia	Recherche les prédictions de cible des miRs, les analyses de leur expression, et de réseaux de régulations post-traductionnels	http://gencomp.bio.unipd.it/magia/start/
MaMi	Prédiction de cible de miR basé sur l'énergie d'hybridation ainsi que sur les structures secondaires du duplex miR-ARNm. Les paramètres peuvent être modifiés par l'utilisateur	http://mami.med.harvard.edu/
Microinspector	Identification de site de fixation de miR sur des séquences soumises par l'utilisateur, utilisation des bases de données regroupant les sites de fixation de miR connus	http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/
miR2disease	Information sur les miRs impliqués dans des pathologies	http://www.mir2disease.org/
miRBase	Répertoire complet des séquences des miRs et de leurs cibles	http://www.mirbase.org/
mirDIP	mirDIP contient 12 ensembles de données de cible prédite provenant de 6 bases de données de prédiction de miR.	http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/index.jsp
miRecords	Regroupe les cibles validées des miRs, et les informations sur ces cibles provenant de 11 logiciels de prédiction.	http://mirecords.umn.edu/miRecords/index.php
miRGator	Compare l'expression des miRs avec l'expression des ARNm et des protéines pour interpréter les fonctions biologiques de ces miRs	http://genome.ewha.ac.kr/miRGator/miRGator.html
miRNAmapping	Information sur les statistiques des séquences de miR et de leurs gènes cible	http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/
MirPath	Identification des voies de signalisation modifiées par l'expression d'un miR spécifique	http://83.212.96.7/DianaToolsNew/index.php?r=mirpath
miRTar	Information sur les fonctions biologique des couples miR-cible et sur les sites de fixation des miRs des transcrits alternatifs	http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/
MiRTarBase	Information sur des cibles de miRs validés expérimentalement, et comparaison avec les études fonctionnelles sur les miRs	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/
miRWalk	Information sur les cibles des miRs, tenant compte de la séquence complète (promoteur, 5'UTR, région codante, et 3'UTR), information sur les cibles validées expérimentalement	http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html
Patrocles	Polymorphisme sur les séquences des miRs et des gènes cibles	http://www.patrocles.org/
PITA	Structure secondaire des hybrides miR-ARNm, pour la prédiction des gènes cible	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/index.html
Tarbase	Base de données sur les cibles validées expérimentalement	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/
Targetscan	Logiciel de prédiction de cible d'un miR d'intérêt	http://www.targetscan.org/

Tableau 3 : Liste non-exhaustive des logiciels et bases de données permettant l'analyse des miRs, de leurs cibles et de leur rôle au sein d'une cellule (adapté de (Tarang and Weston, 2014).)

5. miRs et infections virales

Comme nous l'avons vu précédemment, les miRs ont un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes. D'autre part, les miRs semblent avoir un rôle important dans l'infection virale mais aussi dans la réponse à l'infection. En effet, la cellule en réponse à l'infection exprime des miRs impliqués dans l'immunité. D'autre part, certains virus utilisent les miRs cellulaires à leur

avantage afin d'achever leur cycle de réplication. C'est alors tout un jeu de régulation qui se met en place pour la survie de la cellule et/ou du virus. Par ailleurs, certains virus codent leurs propres miRs.

a. Les miRs viraux

En 2004, il a été suggéré que certains virus pourraient exprimer leurs propres miRs. En effet, 4 % des petits ARNs purifiés à partir de cellules infectées de façon latente par le virus d'Epstein-Barr (EBV) étaient d'origine virale. L'analyse des séquences de ces petits ARNs a révélé qu'ils présentent des caractéristiques structurales de pré-miRs. Cinq miRs ont été identifiés chez l'EBV, localisés sur deux loci différents. Trois d'entre eux, nommés miR-BHRF1-1,2 et 3, sont localisés dans les régions non-codantes du gène viral BHRF1, alors que les deux autres, miR-BART1 et 2, sont localisés dans les introns du gène BART (Pfeffer *et al.*, 2004). Les miRs viraux sont capables de réguler d'une part les gènes viraux (*en cis*) et les gènes cellulaires (*en trans*).

Le mode d'action *en cis* a été décrit chez l'EBV. En effet, le miR-BART-1 est capable de cibler et d'induire la dégradation du gène viral BALF5. Ce mode d'action permet aussi au virus d'échapper au système immunitaire. En effet, durant la phase de latence le virus n'exprime qu'un faible nombre de gènes, dont ceux codant les miRs. Le maintien de la phase de latence nécessite la suppression de composants viraux et cellulaires qui peuvent déclencher la réactivation du cycle. Les miRs viraux sont impossibles à distinguer des miRs cellulaires et sont donc non-immunogènes. Ces mécanismes ont été décrits chez le HCMV (cytomegalovirus humain) (Grey *et al.*, 2007). D'autre part, l'équipe du Dr Ganem a montré que le polyomavirus SV40 (virus simien 40) exprime un miR qui cible le transcrite de l'antigène T durant l'infection. L'utilisation d'un virus muté, qui n'exprime pas ce miR, a montré une augmentation significative de l'expression de l'antigène T. Des expériences réalisées en culture cellulaire ont montré que ce SV40 muté était plus susceptible à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques comparé au virus sauvage (Sullivan *et al.*, 2005).

Les régulations *en trans* quant à elles permettent d'une part d'augmenter la durée de vie des cellules infectées. En effet, les virus dont le cycle comprend des phases de latence et des phases lytiques ont besoin de contrôler et de prévenir l'apoptose. Dans les cas du KSHV (*Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus*), le miR viral miR-K12-10a cible le récepteur TWEAKR (*tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis receptor*) impliqué dans l'apoptose. En inhibant le

TWEARK, le virus diminue l'activation de caspases et empêche donc l'apoptose. D'autres miRs exprimés par le KSHV, miR-K12-1, 3 et 4-3p, ciblent la caspase 3, un effecteur direct de l'apoptose (Suffert *et al.*, 2011).

D'autre part, les régulations *en trans* permettent également l'échappement à la réponse immunitaire par le virus. En effet, le HCMV exprime le miR-UL112-1, qui cible MICB (*major histocompatibility complex class I-related chain B*), un ligand induit par le stress cellulaire reconnu par le récepteur NKG2D exprimé par les lymphocytes T CD8+ et les cellules NK. L'utilisation d'un virus ne codant pas ce miR a permis de montrer que l'inhibition du MICB par ce miR viral permet au virus d'échapper aux cellules NK (pour revue (Boss and Renne, 2011)).

b. Les miRs de l'hôte

Les miRs cellulaires peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la réplication virale. D'autre part, ces effets peuvent être directs, c'est-à-dire le(s) miR(s) cible(nt) l'ARN viral, ou indirects, c'est-à-dire le(s) miR(s) module(nt) une voie de signalisation importante dans le cycle réplicatif du virus.

i. Régulation positive du HCV par le miR-122

- Rôle physiopathologique de miR-122 dans les hépatocytes

Le miR-122 est spécifiquement exprimé dans les hépatocytes, en très grande quantité. En effet, il représente respectivement 70 % et 52 % du miRNome chez la souris et l'Homme adulte. Il est un facteur-clé dans le développement du foie, mais aussi dans la différenciation, l'homéostasie et les fonctions métaboliques des hépatocytes. L'expression de miR-122 dans le foie est régulée par les « *liver-enriched transcription factors* » (LEFTs) (pour revue (Bandiera *et al.*, 2015)). La régulation de l'expression de miR-122 est très importante, car elle permet d'une part la ségrégation hépatobiliaire, mais aussi d'acquérir et de conserver le phénotype hépato-spécifique. Ces observations semblent confirmées par le fait que la répression de miR-122 dans des cellules hépatocytaires primaires dérivées de HCC de mauvais pronostic est associée à la suppression du phénotype hépatique (Coulouarn *et al.*, 2009).

D'une part, miR-122 joue un rôle important dans le métabolisme du foie. Il intervient dans le métabolisme des lipides et du cholestérol. En effet, des études ont montré que l'inhibition de

miR-122 par un ARN anti-sens diminue significativement le taux de cholestérol dans le plasma à la fois chez la souris et chez le primate non-humain (Elmén *et al.*, 2008; Esau *et al.*, 2006).

D'autre part, comme évoqué précédemment, miR-122 est très important pour le maintien de l'homéostasie des hépatocytes ainsi que de leur état de cellules différenciées. Dans le foie, il a une fonction de suppresseur de tumeur, étant donné qu'il a été récemment décrit que la diminution de l'expression de miR-122 dans les hépatocytes est associée à des lésions du foie (Bandiera *et al.*, 2015; Hsu *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2012; Zeisel *et al.*, 2013a). En effet, de nombreuses cibles ont été validées pour le miR-122 incluant ADAM10, Cyclin G1, IGF1R, SRF et Wnt1. Toutes ces cibles sont connues pour être impliquées dans le développement du cancer du foie, la transition epithelio-mésenchymateuse mais aussi l'angiogenèse (Nakao *et al.*, 2014).

- Rôle de miR-122 dans l'infection par le HCV

En 2005, Jopling *et al.* décrivent pour la première fois que l'inhibition du miR-122, diminue drastiquement la réplication de l'ARN du HCV. En effet, le miR-122 est capable de se fixer dans la région 5'UTR de l'ARN viral. L'utilisation d'un mutant du miR-122 incapable d'interagir avec la région 5' UTR de l'ARN génomique induisait une diminution de la réplication virale. Cette inhibition pouvait être annulée par l'introduction d'une mutation complémentaire sur l'ARN viral indiquant que l'interaction directe entre le miR-122 et l'ARN génomique est essentielle pour la réplication du HCV (Jopling *et al.*, 2005a). Par la suite, un deuxième site en 5' UTR de l'ARN génomique fut identifié (Jopling *et al.*, 2008) (**Figure 18a**). L'interaction du miR-122 au niveau de ces deux sites semble importante pour assurer une bonne réplication virale. D'autres études ont montré que la séquence « *seed* » ainsi que les nucléotides 15 et 16 sont essentiels pour une bonne réplication. Ces nucléotides n'étant pas impliqués dans les mécanismes classiques d'action des miRs, ces résultats suggèrent que l'effet du miR-122 sur la réplication du HCV ne fait pas intervenir les voies conventionnelles d'action des miRs cellulaires (Machlin *et al.*, 2011).

L'alignement des séquences de la région 5'UTR de l'ARN viral à partir de la seconde tige boucle des différents génotypes montre que les 7 nucléotides de la séquence « *seed* » sont conservés au niveau du premier site de fixation du miR-122 (**Figure 18b**). Dans le cas du deuxième site de fixation, on retrouve 6 nucléotides interagissant avec la séquence « *seed* » du miR-122 et conservés pour tous les génotypes. La séquence entre les deux sites de fixation du miR-122 a

probablement évolué de telle façon que le miR n'ait pas un appariement complet et évite ainsi le clivage de l'ARN génomique par Ago2 (pour revue (Conrad and Niepmann, 2014)).

De nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre le mécanisme moléculaire du miR-122 sur le HCV. L'équipe de Niepmann a étudié le rôle du miR-122 dans la traduction de l'ARN viral à l'aide d'un gène rapporteur monocistronique portant l'IRES viral en 5'UTR. Ils ont alors démontré que le miR-122 avait un effet positif sur la traduction de l'ARN génomique. D'autre part, la traduction de l'ARN viral est favorisée par la présence des deux sites cible du miR-122 et est indépendante de la synthèse de l'ARN viral (Henke *et al.*, 2008). La fixation du miR-122 permet de modifier la structure tertiaire de l'IRES viral favorise un changement dans la structure du ribosome 40S et aide à trouver le codon START (pour revue (Conrad and Niepmann, 2014)) (**Figure 18c**).

Cependant, la stimulation de la traduction seule n'explique pas l'effet du miR-122 sur le cycle répliatif du HCV. L'interaction du miR-122 en 5'UTR de l'ARN viral permet d'avoir une longue séquence d'ARN double brin qui permet de protéger l'ARN génomique de la dégradation nucléosidique (Shimakami *et al.*, 2012). En effet, la stabilisation est dépendante de la région 5'UTR de l'ARN viral, mais pas des séquences en aval indiquant que les deux sites de fixation du miR-122 confèrent la protection contre la dégradation à partir de l'extrémité 5'. D'autre part, le miR-122 interagit avec la région 3' UTR de l'ARN viral permettant également de stabiliser l'ARN et de diminuer la dégradation par les exonucléases cellulaires. Enfin, les protéines virales NS5B, miR-122 et Ago2 sont co-localisées dans les complexes de réplication. Ces résultats permettent de penser que le complexe mir-122 associé à d'autres protéines cellulaires telles qu'Ago2, associé à la région 5'UTR de l'ARN du HCV, peut augmenter la stabilité de l'ARN génomique durant la réplication de l'ARN (pour revue (Conrad and Niepmann, 2014)).

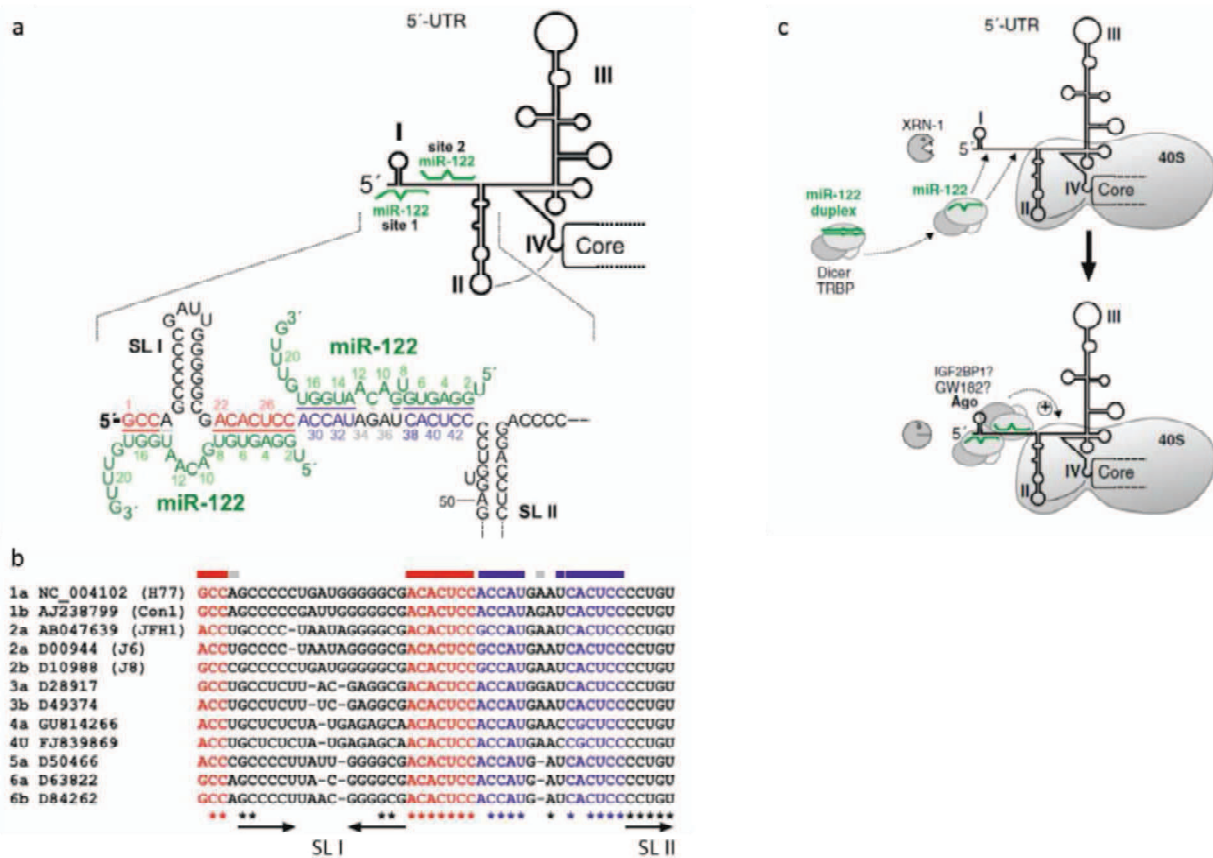


Figure 18: Représentation de l'hybridation du miR-122 avec l'ARN viral du HCV et de sa fonction dans le cycle viral. A) miR-122 possède 2 sites de fixation dans la région 5'UTR du génome viral. Le premier au niveau de la première SLC et le deuxième juste en aval de cette première tige boucle. B) Les sites d'hybridation avec le miR 122 sont très conservés dans tous les génotypes du HCV. C) Rôle du miR-122 dans la protection de l'ARN viral contre les exonucléases, ainsi que dans le repliement de l'IRES permettant le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome initiant ainsi l'initiation indépendante. Adapté de (Conrad and Niepmann, 2014).

D'autre part, une étude récente a montré que miR-122 stimule la réplication de l'ARN viral en altérant l'équilibre entre l'ARN impliqué dans un complexe répliatif ou dans un complexe traductionnel. En effet, dans cette étude l'équipe du Dr Lemon s'est libérée de la dégradation de l'ARN viral en utilisant un modèle cellulaire n'exprimant pas l'exonucléase cellulaire Xrn1, acteur majeur de la dégradation de l'ARN virale. Ainsi, miR-122 est apparu comme favorisant la réplication plutôt que la traduction de l'ARN viral. En effet, miR-122 va déplacer le facteur cellulaire PCBP2 qui permet de circulariser l'ARN viral impliqué dans les polysomes. De ce fait, l'ARN se dé-circularise, et n'est plus impliqué que dans des monosomes limitant ainsi la production de

protéines virale. Ce mécanisme permet de régulariser les mécanismes de réplication et traduction nécessitant pour les deux l'ARN viral. L'interaction de PCBP2 dans la région 5'UTR favorisera la traduction alors que l'interaction avec miR-122 dans cette même région favorisera la réplication virale (Li *et al.*, 2015; Masaki *et al.*, 2015).

Le rôle essentiel de miR-122 dans la réplication virale du HCV a été confirmé dans une étude menée au laboratoire dans lequel l'équipe du Dr Zeisel a montré que l'intégralité du cycle réplcatif du HCV peut être réalisée dans des cellules non-hépatocytaires en présence de certains facteurs essentiels. Ainsi, des cellules rénales embryonnaires, les HEK-293T, ont été modifiées afin d'exprimer de façon stable les récepteurs d'entrée CD81, CLDN, OCLN et SR-B1, ainsi que miR-122. Cette étude a montré que la présence de ces 5 facteurs cellulaires est suffisante mais essentielle pour assurer l'intégralité du cycle réplcatif du HCV (Da Costa *et al.*, 2012).

ii. Régulation négative de l'infection virale

- Interaction directe avec le génome viral

D'autres miRs cellulaires que le miR-122 peuvent se fixer sur l'ARN génomique du HCV. En effet, il a été rapporté que les miR-199a-3p, let-7b, miR-196 et miR-448 sont capables d'interagir avec l'ARN viral.

Le miR-199a-3p contribue au tropisme du HCV pour les hépatocytes dans lesquels il est peu exprimé. En effet, ce miR est capable d'inhiber la réplication du HCV (Murakami *et al.*, 2009; Niepmann, 2013). Son expression dans les autres tissus peut contribuer de façon indirecte au tropisme strict du HCV pour le hépatocytes. Le miR-199a-3p se fixe en aval du deuxième site d'interaction entre le miR-122 et la région 5' UTR de l'ARN génomique. Cette interaction semble altérer la structure secondaire de la seconde tige boucle, ce qui inhiberait à la fois la réplication et la traduction virale. Cependant, l'effet sur la traduction reste à déterminer (Conrad and Niepmann, 2014).

Le let-7b est exprimé dans de nombreux tissus dont le foie. Ce miR est capable d'interagir avec l'ARN génomique du HCV dans plusieurs régions dont la région initiatrice de la traduction (Cheng *et al.*, 2012). D'autres interactions semblent avoir un impact négatif sur la traduction de l'ARN viral en interagissant dans la région du NS5B (pour revue (Conrad and Niepmann, 2014)).

Introduction

Deux autres miRs, miR-448 et le miR-196, peuvent interagir avec l'ARN du HCV. En effet, miR-448 peut se fixer dans la région codant core alors que le miR-196 est complémentaire à une partie de la séquence codant NS5A. Il a été montré que leurs sur-expressions diminuent la réplication du HCV (Pedersen *et al.*, 2007). De façon intéressante, l'interféron augmente l'expression du miR-196, suggérant qu'il intervient dans la réponse immunitaire médiée par l'interféron. Enfin, les cellules infectées par le HCV ont une expression plus faible du miR-196. Le mécanisme expliquant le lien entre l'infection et la régulation de l'expression du miR-196 n'a pas encore été déterminé (Pedersen *et al.*, 2007).

Une étude a montré que l'inhibition du miR-29a dans des cellules HEK 293T et des lymphocytes H9 augmentait l'infectiosité du HIV-1. Des études complémentaires à l'aide de séquences imitant le miR-29a dans des cellules HEK 293T ont permis de montrer que le miR-29a inhibe l'efficacité de l'infection du HIV-1 en se fixant dans la région 3'UTR de l'ARNm génomique (Nathans *et al.*, 2009).

- Action indirecte des miRs sur le cycle viral

Les miRs cellulaires peuvent également réguler des facteurs cellulaires de l'hôte nécessaires à l'infection virale. Dans le cas du HCV, ce type de régulation a été observé pour le miR-196. Comme déjà vu précédemment, le miR-196 peut interagir avec le génome viral et inhiber sa réplication. D'autre part, le miR-196 inhibe l'infection par le HCV *in vitro*, en augmentant les réponses anti-inflammatoires et anti-oxydantes. En effet, le miR-196 est très rapidement sur-exprimé suite à une stimulation de la cellule par l'interféron- β (Bandiera *et al.*, 2015; Pedersen *et al.*, 2007).

On retrouve également ce type de régulation pour le HBV. L'équipe du Dr Wang a démontré que le miR-141 est capable d'inhiber la réplication du HBV en diminuant l'expression du facteur nucléaire PPARA (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), un co-facteur activant la transcription au niveau du promoteur viral (Hu *et al.*, 2012).

c. Modulation des miRs cellulaires par l'infection virale

Comme décrit ci-dessus, les miRs cellulaires sont capables d'affecter de façon importante le cycle répliatif d'un virus en étant associés à la réponse immunitaire innée de la cellule cible, en

Introduction

régulant des facteurs de transcription nécessaires à la réplication virale, ou en étant eux-mêmes des structures qui stabilisent l'ARN viral afin de faciliter la réplication virale. D'une façon générale, ils font partie des facteurs de restriction antiviraux présents au sein de la cellule. Leur présence ou absence peut être vitale pour le cycle répliatif de virus. En réponse à ces différents mécanismes, les virus sont capables de moduler l'expression des miRs cellulaires. Cette modulation va permettre au virus de perdurer au sein de la cellule en diminuant les réponses immunitaires ou encore en inhibant l'apoptose cellulaire en réponse à une infection virale. Cependant, la modification du miRNome au sein de la cellule amène inévitablement à la modification du protéome, ce qui peut conduire à la transformation de la cellule ainsi qu'à l'oncogenèse.

Récemment, les équipes des Drs Rice et Darnell ont pu montrer que le HCV séquestre de façon fonctionnelle le miR-122. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le miR-122 est essentiel au bon déroulement du cycle répliatif du HCV. L'interaction entre le miR-122 et l'ARN génomique du HCV réduit la fixation du miR-122 à ses cibles cellulaires naturelles. Ce mécanisme conduit alors à une dé-répression des cibles cellulaires lors de l'infection par le HCV. Afin de prouver que l'ARN viral agit comme une éponge envers le miR-122 et le séquestre des cibles cellulaires, la séquence complémentaire du miR-122 sur l'ARN viral a été remplacée par la séquence complémentaire du miR-15. En présence du virus muté, les cibles cellulaires du miR-15 avaient alors perdu leur répression par le miR-15, alors que les cibles cellulaires du miR-122 n'étaient pas affectées. Le HCV modifie donc le profil des ARNm présents dans les hépatocytes en séquestrant un miR essentiel au fonctionnement des hépatocytes (Luna *et al.*, 2015). La modification du profil des miRs peut alors induire des dérégulations majeures au sein de la cellule conduisant au développement de nombreuses pathologies telles que la cirrhose ou le HCC.

Comme décrit précédemment, le miR-122 est important dans l'homéostasie cellulaire, ainsi que le maintien des cellules au stade différencié. La délétion ou la séquestration de miR-122 a un impact important sur le métabolisme des lipides et conduit à la formation de micro-stéatoses, des inflammations qui progressent en stéatose hépatique et fibrose (Tsai *et al.*, 2012). D'autre part, la diminution du taux de miR-122 dans les hépatocytes est associée au carcinome hépatocellulaire de mauvais pronostic ainsi qu'à la formation de métastases. Plus précisément, dans les hépatocytes le miR-122 possède des cibles telles que la cycline G1, ADAM10, IGF1R,

SRF et Wnt1, qui sont impliquées dans la carcinogenèse hépatiques, les transitions epithelio-mésenchymateuses, ainsi que l'angiogenèse (Nakao *et al.*, 2014).

Par ailleurs, le HCV favorise l'expression de miRs qui inhibent la réponse immunitaire innée de la cellule, conduisant ainsi à l'augmentation de la réplication virale. Un cas très décrit est celui du miR-21 dans la réponse à l'infection par le HCV. En effet, il a été montré que l'infection par le HCV stimule particulièrement deux voies de signalisation, la voie NS5A/PKCε/JNK/c-Jun ainsi que la voie NS3/NS4A/PKCα/ERK/c-Fos. Suite à l'infection, c-Jun et c-Fos interagissent avec le site AP-1 présent sur le promoteur du miR-21 et induit l'expression de miR-21 par AP-1. miR-21 va alors cibler MyD88 and IRAK1, qui ont un rôle dans l'initiation de la réponse antivirale conduisant à l'augmentation de la réplication virale (Chen *et al.*, 2013). D'autre part, le HCV augmente l'expression du miR-130a qui cible l'ARNm d'IFITM1 qui est également impliqué dans la réponse immunitaire innée. L'inhibition de IFITM1 permet ainsi d'établir une infection persistante (Chowdhury *et al.*, 2012).

D'autre part, certaines protéines virales peuvent intervenir dans l'abondance des miRs au sein de la cellule en agissant sur leur durée de demie-vie ainsi que sur leur biogenèse (pour revue (Bandiera *et al.*, 2015)). En effet, l'ARN de l'adénovirus VA1 inhibe la biogenèse des miRs en empêchant l'export du pré-miR dans le cytoplasme et diminue aussi l'activité de Dicer en s'y fixant (Lu and Cullen, 2004). Le HBV quant à lui exprime la protéine X qui module l'expression de plusieurs miRs cellulaires conduisant aux lésions du foie.

6. miRs dans les pathologies: cibles thérapeutiques

De nombreux miRs sont actuellement étudiés comme cibles thérapeutiques en réponse à diverses pathologies. Ainsi les molécules qui altèrent la modulation de l'expression des miRs représentent une nouvelle stratégie pour le traitement de pathologies humaines (Broderick and Zamore, 2011). Ces molécules peuvent augmenter ou diminuer l'expression du miR d'intérêt grâce à l'utilisation de molécule mimant l'effet du miR (miR-mimic) ou des molécules qui vont inhiber ou séquestrer le miR (type antago-miR).

Fait marquant, une des premières approches de modulation des miRs dans le cadre thérapeutique concerne l'inhibition de miR-122 lors de l'infection par HCV. La molécule utilisée est un oligonucléotide LNA (*locked nucleic acid*) modifié, anti-sens du miR-122 appelé miRavirsen. Les

Introduction

modifications présente sur la molécule permettent d'augmenter l'affinité pour la cible (le miR-122) et permet de limiter la dégradation par les nucléases cellulaires. Le miRavirsen est capable de s'hybrider au miR-122 mature, le séquestre et bloque son interaction avec l'ARN viral du HCV. D'autre part, ce LNA est également capable d'interagir directement avec les précurseurs du miR-122 (Gebert et al., 2014). Des premiers essais avaient été réalisés sur la souris et le singe vert Africain, auxquels des séquences complémentaires du miR-122 avaient été administrées (Esau et al., 2006; Hildebrandt-Eriksen et al., 2012). L'utilisation d'anti-miR-122 ne semble pas toxique pour le foie dans ces modèles. De plus, ce traitement diminue le taux de cholestérol dans le plasma durant plusieurs semaines et reste réversible à l'arrêt du traitement, ce qui pourrait conduire à de nouvelles thérapies contre l'hyper-cholestérolémie. L'effet de cet inhibiteur a ensuite été confirmé chez l'homme dans un essai clinique de phase II. En effet, l'utilisation d'un anti-miR-122 durant 5 semaines résulte en la diminution du taux d'ARN viral d'environ 3 logs pour une dose de 7 mg/kg (Janssen et al., 2013).

A l'heure actuelle, seul le miR-122 a été montré comme étant une cible potentielle pour lutter contre l'infection virale du HCV. Cependant les miRs restent des cibles intéressantes pour lutter contre d'autres pathologies telles que le cancer, la fibrose, l'inflammation ou encore des problèmes métaboliques (**Figure 19**).

D'autres miRs sont actuellement en cours de développement afin de lutter contre de nombreuses pathologies (**Tableau 4**). En ce sens, l'entreprise Mirna Therapeutics met en place des essais cliniques basés sur des thérapies utilisant les miRs. Ainsi ils ont développé un traitement ciblant le miR-34 : MRX34. Cette molécule est un ARN double brin, mimant le miR-34 encapsulé dans une particule liposomale, et est le premier miR en essai clinique de phase 1 permettant de lutter contre le cancer. En effet, le miR-34 est un miR suppresseur de tumeur qui cible de nombreux oncogènes tel que c-Met, CDK4 qui favorise la réactivation du cycle cellulaire, BCL2 qui bloque l'apoptose et qui est souvent sur-exprimé dans de nombreux cancers (Okusaka et al., 2015; Roberts et al., 2015; Turner et al., 2015) De façon intéressante, une grande partie de ces gènes sont déjà ciblés dans des thérapies permettant de lutter contre le cancer (Okusaka et al., 2015; Roberts et al., 2015; Turner et al., 2015). De ce fait, cibler le miR-34 semble être une approche intéressante et rationnelle dans la lutte contre le cancer (pour revue Andreas G Bader et Paul, Lammers Discovery Technology).

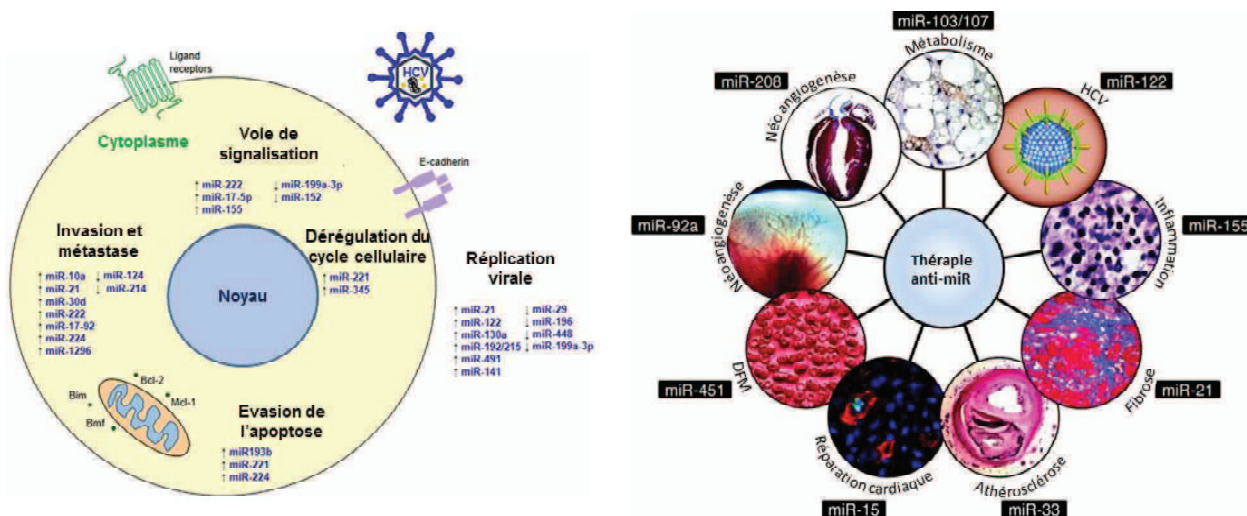


Figure 19 : Modulation de l'expression des miRs dans le développement de pathologies : (A) Modulation de l'expression des miRs dans les hépatocytes provenant de HCC causé par une infection par le HCV. (B) miR spécifiquement ciblé cliniquement dans la lutte de différentes pathologies. L'inhibition des miRs indiqué est une avancé thérapeutique pour de nombreuses pathologies. DFM : dysplasie fibromusculaire artérielle (adapté de (van Rooij *et al.*, 2012; Sidhu *et al.*, 2015)).

miR	Indication	Développement
Antago-miR		
miR-122	Hépatite C	Essai clinique phase II
miR-208/499	Problème cardiaque chronique	Développement préclinique
miR-195	Remodelage cardiaque post infarctus	Développement préclinique
miR-mimic		
miR-34	Cancer	Développement préclinique
let-7	Cancer	Développement préclinique

Tableau 4 : miRs actuellement étudiés dans le développement de nouvelles thérapies.

Objectifs

Objectifs

Les miRs sont des éléments indispensables à la régulation de l'expression des gènes. Ils interviennent dans l'homéostasie cellulaire et leur dérégulation est souvent en lien avec la cancérogenèse. Les miRs ont également un rôle essentiel dans la réponse cellulaire à un stress mais aussi à une infection bactérienne ou virale. La relation entre les miRs de l'hôte et le HCV est particulière. En effet, le mécanisme de traduction et de réplication virale en présence du miR-122 humain fut la première régulation positive par un miR décrite.

Les relations entre les miRs et le HCV semblent complexes et encore mal caractérisés. Notre travail s'est basé sur les liens importants existant entre le HCV, les miRs et le développement du HCC. Ainsi les objectifs de ma thèse étaient d'une part de mieux caractériser le rôle des miRs dans l'infection virale, et d'autre part de déterminer l'effet de l'infection virale sur l'expression des miRs hépatocytaires ainsi que le rôle de ces modulations dans le développement des lésions du foie associées au HCV.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons dans un premier temps caractérisé de façon systématique l'effet de la modulation des miRs sur le cycle répliatif du HCV. Le manuscrit en lien avec ce travail est en préparation et porte le titre « ***Systematic identification of microRNAs functionally involved in the HCV life cycle*** ».

Nous avons dans un deuxième temps déterminé par séquençage des miRs l'effet de l'infection par le HCV sur l'expression des miRs de la cellule hôte. L'identification systématique de la modulation des miRs suite à l'infection virale nous permet de comprendre les mécanismes mis en place par le virus qui conduisent à la pathogenèse de l'hépatite C et au développement du HCC. Ce travail intitulé « ***HCV-induced up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes promotes viral infection and liver disease pathogenesis*** » a été soumis à *Journal of Virology* et a reçu des commentaires encourageant à la re-soumission d'un manuscrit tenant compte des suggestions des rapporteurs.

Ces deux études nous ont permis de mieux comprendre la relation virus-hôte au travers de l'expression des miRs. A terme, l'identification de miRs impliqués dans la réplication virale permettra peut-être de développer de nouvelles thérapies antivirales (telles que l'inhibiteur de miR-122), ou encore d'identifier de nouvelles cibles pour prévenir le développement du HCC suite à l'infection virale.

Résultats

Première partie :

**Identification des miRs impliqués
dans la régulation du cycle répliatif
du HCV**

La relation virus-miR peut avoir plusieurs aspects. D'une part, un miR peut avoir un effet direct sur la réplication virale comme le miR-122 qui, en interagissant avec l'ARN viral, permet la traduction et la réplication de ce dernier. D'autres miRs interagissent avec l'ARN viral pour inhiber sa traduction comme certains membres de la famille des let-7 qui se fixent au niveau de la région codant NS5B. Par ailleurs, il existe également des miRs qui peuvent affecter la réplication virale de façon indirecte. En effet, le miR va cibler une protéine cellulaire et induire une modification des voies de signalisation sous-jacentes. Ainsi, le miR-27 cible les protéines *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-α* et *angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3)*, qui sont des régulateurs de la biosynthèse des triglycérides, et miR-27 a un impact négatif sur le cycle réplcatif du HCV. D'autres miRs vont être utilisés par le virus afin de se protéger de l'immunité innée de la cellule. En effet, le miR-21 cible des protéines essentielles à l'immunité cellulaire telles que le facteur de différenciation de la myéloïde 88 (*MyD88*) et la kinase associée au récepteur de l'interleukine 1 (*IRAK1*), facteur-clé de la voie de signalisation des récepteurs *Toll-like (TLR)*. Ainsi, en inhibant la voie des TLR, miR-21 favorise la réplication virale en bloquant la réponse immune de l'hépatocyte.

Si ces études montrent qu'un certain nombre de miRs ont été identifiés comme influençant l'infection par le HCV au cours des dernières années, aucune étude n'a à ce jour analysé de manière systématique les interactions entre les miRs de l'hôte et le HCV. Pour cette raison que nous avons voulu, dans un premier temps, déterminer de manière systématique les miRs ayant un impact sur le cycle réplcatif du HCV par une approche de criblage.

1. Matériel et méthodes

Culture cellulaire. L'entretien des cellules Huh7.5.1 a été décrit (Zhong *et al.*, 2005).

Production des HCVcc. Le virus produit à partir de culture cellulaire HCVcc JcR2a est un virus chimérique composé de deux isolats de génotype 2a (désigné Jc1) associé au gène rapporteur de la luciférase Renilla. Ces HCVcc ont été produits comme décrit dans la littérature (**Figure 20**) (Da Costa *et al.*, 2012; Reiss *et al.*, 2011).



Figure 20 : Représentation schématique de la construction de JcR2a. JcR2a est dérivé de la construction Jc1 associé au gène rapporteur de la luciférase Rénilla fusionné en partie N terminale à 16 codons de la protéine core (boite blanche) et en partie C terminale à la protéase 2A provenant du virus de la fièvre aphteuse (boite rayé grise). Le virus chimérique Jc1 est composé de la région codant les protéines structurales provenant de J6CF et de la région codant les protéines non structurales de JFH1 (respectivement les boites grise et blanches) (adapté de (Vassilaki et al., 2013))

Criblage fonctionnel des miR mimics : 5000 cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec 20 μ M de miR mimics provenant de la banque de mimic-miRs humains produite par Dharmacon (miRBase version v19.0 (2012) <http://mirbase.org>) suivant le protocole de transfection inverse fourni avec l'agent de transfection Interferin HTS (Polyplus) dans des plaques 96 puits, dans des conditions similaires à celles utilisées pour les criblages utilisant des siARNs réalisés auparavant au laboratoire (Lupberger *et al.*, 2011; Zona *et al.*, 2013). Deux jours après la transfection, un test de viabilité a été réalisé suivi par un protocole d'infection en deux étapes décrit précédemment (Li *et al.*, 2009; Poenisch *et al.*, 2015). Brièvement, la première partie du protocole consiste à infecter les cellules transfectées avec 50 μ l de HCVcc JcR2a pendant 4h. Les HCVcc ont ensuite été retirés et les cellules incubées en présence de 150 μ l de milieu complet pendant 2 jours. Dans la deuxième partie du protocole, le surnageant des cellules provenant de la première partie est transféré sur des cellules Huh7.5.1 naïves afin d'en évaluer l'infectiosité, et les cellules de la partie 1 sont lysées et le signal luminescent détecté afin de déterminer l'efficacité des étapes d'entrée, traduction et réplication de l'ARN viral. Soixante-douze heures suivant l'infection des cellules Huh7.5.1 naïves avec les surnageants de la partie 1, ces dernières sont lysées et le signal luminescent détecté afin de déterminer l'efficacité des étapes tardives du cycle viral, comprenant l'assemblage et la libération des nouveaux virions (**Figure 21**). Les contrôles siCD81, antago-miR-122 et siApoE sont utilisés comme contrôles inhibant l'infection du HCV respectivement au cours des étapes d'entrée, de réplication et d'assemblage (Jopling *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2009; Lupberger *et al.*, 2011)

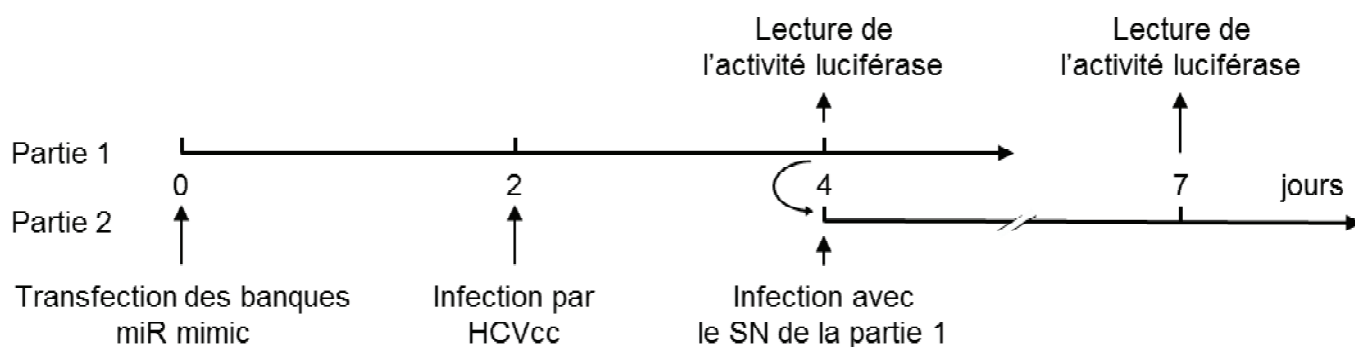


Figure 21 : Schéma expérimental suivi lors du criblage fonctionnel permettant l'identification systématique des miRs impliqués dans le cycle réplcatif du HCV

Analyse bio-informatique. Les données d'absorbance de l'expérience de viabilité et de luminescence de la luciférase Renilla des deux parties ont été analysées. Au total, 26 groupes de plaques (réalisé en triplicat) avec 2468 miRs ont été testés. L'intégralité des analyses a été réalisée avec le logiciel R (www.r-project.org). La présence de nombreux puits contrôles positifs et contrôles négatifs répartis sur les plaques ont permis en plusieurs étapes de normaliser les données au sein de la plaque mais également entre les plaques. Dans un premier temps, le biais intra-zonal des plaques a été analysé et un modèle de l'effet médian au sein de l'intégralité du criblage a été déterminé grâce à l'algorithme permettant le polissage des médianes (Mosteller, 1977) et toutes les plaques ont été corrigées en fonction. Dans un deuxième temps, les données ont été analysées pour éliminer les plaques ayant un signal aberrant tel qu'une plaque dont la totalité des mesures individuelles ne corrèle que faiblement avec les autres réplcats. Ainsi, 3 plaques correspondant à la partie 1 et 9 plaques correspondant à la partie 2 ont été éliminées dû à la faible corrélation de leurs médianes ($r < 0.7$) afin que celle des plaques restantes augmente considérablement ($> 40\%$). Par la suite, les plaques ont été normalisées au sein des réplcats selon la méthode robuste de la normalisation quantile-quantile (Amaratunga and Cabrera, 2001). Enfin, les données ont été testées selon un test-t modéré (Smyth, 2004) pour l'hypothèse nulle, c'est à dire l'absence de modulation de l'infection virale par un miR donné comparé au contrôle négatif. Les valeurs p résultantes pour les tests indépendants de chacun des miRs furent corrigées pour le test de situation multiple et exprimé en *local false discovery rate* (lfdr, outil R pour fdr, Strimmer 2008).

Les tests ont été réalisés de façon indépendante pour l'analyse de la partie 1 et de la partie 2, ainsi que la sélection des miRs qui en découle. Dans le cas de la partie 1, le seuil de l_{fd} sélectionné est de 0.0027, alors que pour la partie 2, le seuil est de 0.15 à cause d'un bruit de fond élevé. Pour cette raison, le minimum acceptable de faux positifs est à 15% pour chacun des miRs sélectionnés.

Identification des cibles des miRs sélectionnés. Les cibles validées et prédites des miRs sélectionnés ont été identifiées grâce aux bases de données DIANA, Target scan et miRDB (Witkos *et al.*, 2011). L'expression de l'intégralité des gènes cibles fut vérifiée dans les cellules Huh7.5.1 par comparaison avec une banque de données interne au laboratoire obtenue par analyse de l'expression génique des cellules grâce à la technique de puce à ADN. Ainsi, les gènes exprimés de façon significative dans les cellules Huh7.5.1 ont été sélectionnés pour d'autres analyses plus approfondies sur leurs fonctions au sein de la cellule ainsi que sur l'impact de leur modulation sur les voies de signalisation impliquées dans le cycle répliatif du HCV.

2. Mise en place du criblage permettant l'identification systématique des miRs impliqués dans le cycle répliatif du HCV.

Afin de déterminer quels miRs peuvent avoir un effet sur le cycle viral du HCV, nous avons réalisé un criblage avec une banque de miR mimics. Les "mimics" sont des molécules d'ARN qui miment les miRs matures et qui peuvent être transfectées dans les cellules comme un siARN. Les mimics nous ont permis de sur-exprimer temporairement un miR au sein des cellules transfectées.

Nous avons souhaité étudier l'impact des miRs sur la totalité du cycle viral incluant les phases précoces - comprenant l'entrée, la traduction des protéines virales et la réplication de l'ARN viral - et les phases tardives - comprenant l'assemblage et la libération des nouveaux virions. Afin d'étudier l'ensemble du cycle viral, nous avons suivi un protocole expérimental similaire à celui précédemment décrit pour un criblage siARN (**Figure 21**) (Li *et al.*, 2009). Dans la première partie du protocole, nous avons transfecté la banque miR mimic dans des cellules Huh7.5.1. Après transfection, les cellules ont été infectées avec des HCVcc JcR2a pendant 4

heures (partie 1). Quarante-huit heures après l'infection, des Huh7.5.1 naïves (partie 2) ont été infectées avec le surnageant provenant des cellules infectées pendant la première partie. Ainsi, la détection du taux d'infection par lecture du signal luminescent de la luciférase Rénilla nous permet de connaître l'efficacité des étapes d'entrée, de traduction et de réplication (partie 1), et les étapes d'assemblage et de libération des nouveaux virions (partie 2).

Des contrôles positifs permettant de juger de l'efficacité de la transfection pour chacune des deux étapes du criblage ont été inclus. Ainsi, un ARN interférant ciblant la protéine cellulaire CD81 essentielle à l'entrée virale a été utilisé pour valider la transfection au cours de la partie 1 du criblage. En effet, on observe une diminution drastique du signal luciférase correspondant à l'efficacité de l'infection virale après transfection du siCD81 (partie 1) et cette inhibition de l'entrée virale dans la partie 1 du protocole a un impact important sur la partie 2 (**Figure 22A et 22B**). Etant donné que seul une fraction minoritaire de HCV entre dans la cellule lorsque l'expression de CD81 est diminuée, peu de virus se répliquent et une faible quantité de virus est présente dans le surnageant servant à l'infection de cellules Huh7.5.1 naïves dans la partie 2. Afin de déterminer l'efficacité de transfection et son impact sur les étapes d'assemblage et de relargage (partie 2), nous avons utilisé comme contrôle un ARN interférant ciblant la protéine cellulaire ApoE nécessaire à l'assemblage viral. Ainsi, nous observons lors du criblage que la condition siApoE n'a pas d'effet significatif sur la partie 1 alors qu'elle diminue drastiquement la partie 2 (**Figure 22A et 22B**). Ces contrôles confirment l'approche et valident les étapes de transfection ainsi que les deux parties du protocole d'infection.

L'intégralité des miRs a été normalisée par rapport aux contrôles négatifs présents sur les plaques. Ainsi, nous avons identifié des miRs qui modulent significativement l'efficacité du cycle viral du HCV soit lors des phases précoces (**Figure 23A**) ou lors des phases tardives (**Figure 23B**) comparé au contrôle négatif. Le seuil de significativité (en pointillés noirs) a été déterminé en accord avec le bio-statisticien associé à l'étude. En effet, lors de la partie 1 du criblage nous avons pu déterminer un seuil assez strict de $l_{fdr} = 0.00027$.

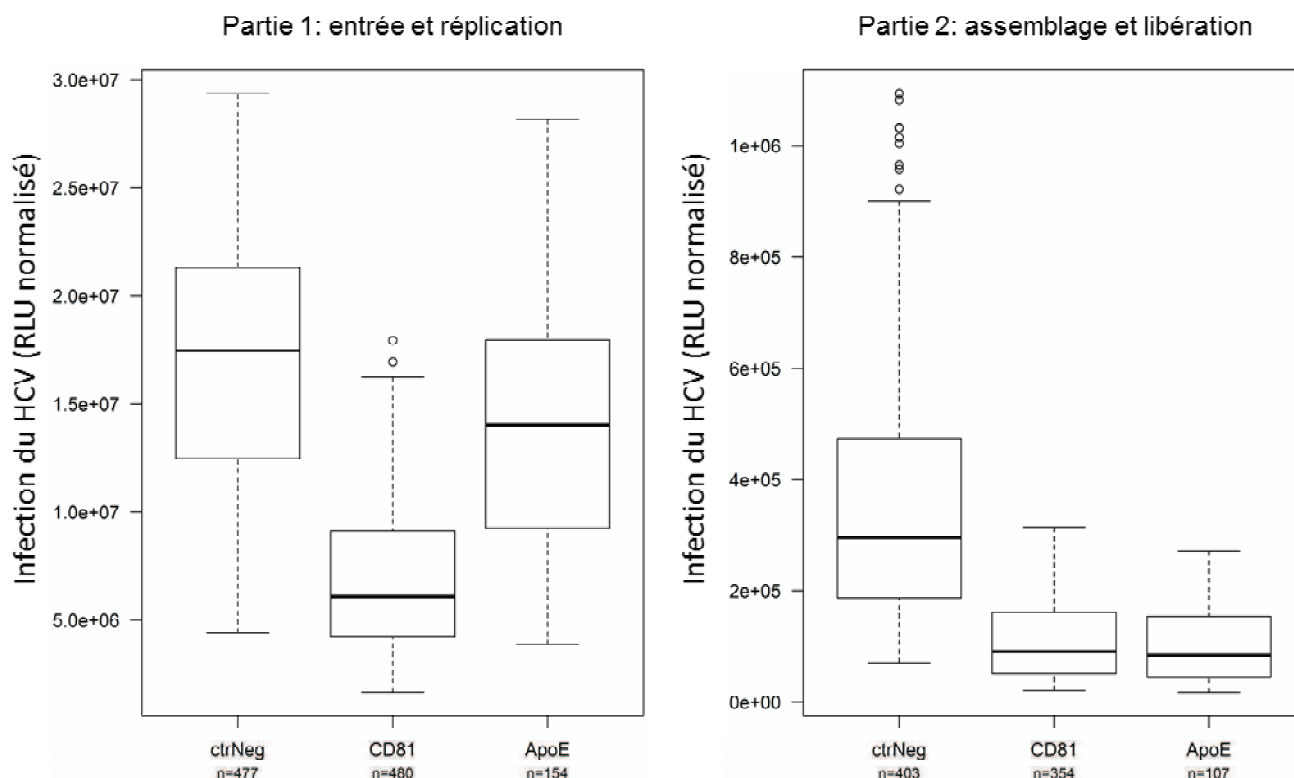


Figure 22 : Analyse des contrôles utilisés lors du criblage. Le contrôle siCD81 diminue drastiquement l'entrée du HCV et donc l'intégralité des phases précoces du cycle viral. Cette inhibition de l'entrée a également un impact sur les étapes tardives du cycle réplcatif et la génération de nouveaux virions. Le contrôle siApoE inhibe l'assemblage des nouveaux virions. La diminution de l'expression de ApoE n'a pas d'effet significatif sur les phases précoces de l'infection virale, mais conduit à une diminution significative des phases tardives de l'infection virale. L'analyse des contrôles au sein des plaques nous permet de valider l'efficacité du protocole et d'initier l'analyse des miRs.

La partie 2 du criblage avait un bruit de fond plus important, en lien avec le nombre de manipulations des plaques. Le seuil fixé était donc de $l_{fdr} = 0,12$. Ainsi, nous avons identifié 495 miRs qui, lorsqu'ils sont sur-exprimés, modulent de façon significative l'infection virale. En effet, 186 miRs ont un effet sur les phases précoces de l'infection virale (partie 1), alors que 309 miRs ont un effet sur les phases tardives du cycle viral (partie 2). Enfin, 68 miRs ont un effet significatif sur les phases précoces et les phases tardives. Il est intéressant de remarquer que, pour la partie 1 et la partie 2, la sur-expression des miRs entraîne globalement une diminution de l'infection par le HCV. Plus précisément, parmi les 495 miRs qui modulent de façon significative l'infection virale, 186 miRs diminuent les phases précoces du cycle réplcatif et 298 miRs diminuent de façon significative les phases tardives du cycle viral du HCV. D'autre part, nous avons identifié des miRs qui étaient déjà connus comme ayant un rôle dans l'infection par le HCV. Ainsi, nous avons identifié la famille des let-7, la famille des miR-29 et miR-21, qui sont connus pour moduler

l'infection du HCV lors des phases précoces du cycle viral (**Figure 23A et Figure 24B**). D'autre part, la partie 2 du criblage a identifié des membres de la famille des miR-27 qui a été décrite comme régulant le métabolisme des lipides dans les hépatocytes, et inhibant la phase tardive du cycle réplcatif de HCV (**Figure 23B et Figure 24C**).

L'ensemble de ces résultats nous permet de valider notre approche expérimentale. D'autre part nous pouvons déterminer de nouveaux miRs ayant un rôle direct ou indirect dans l'infection par le HCV.

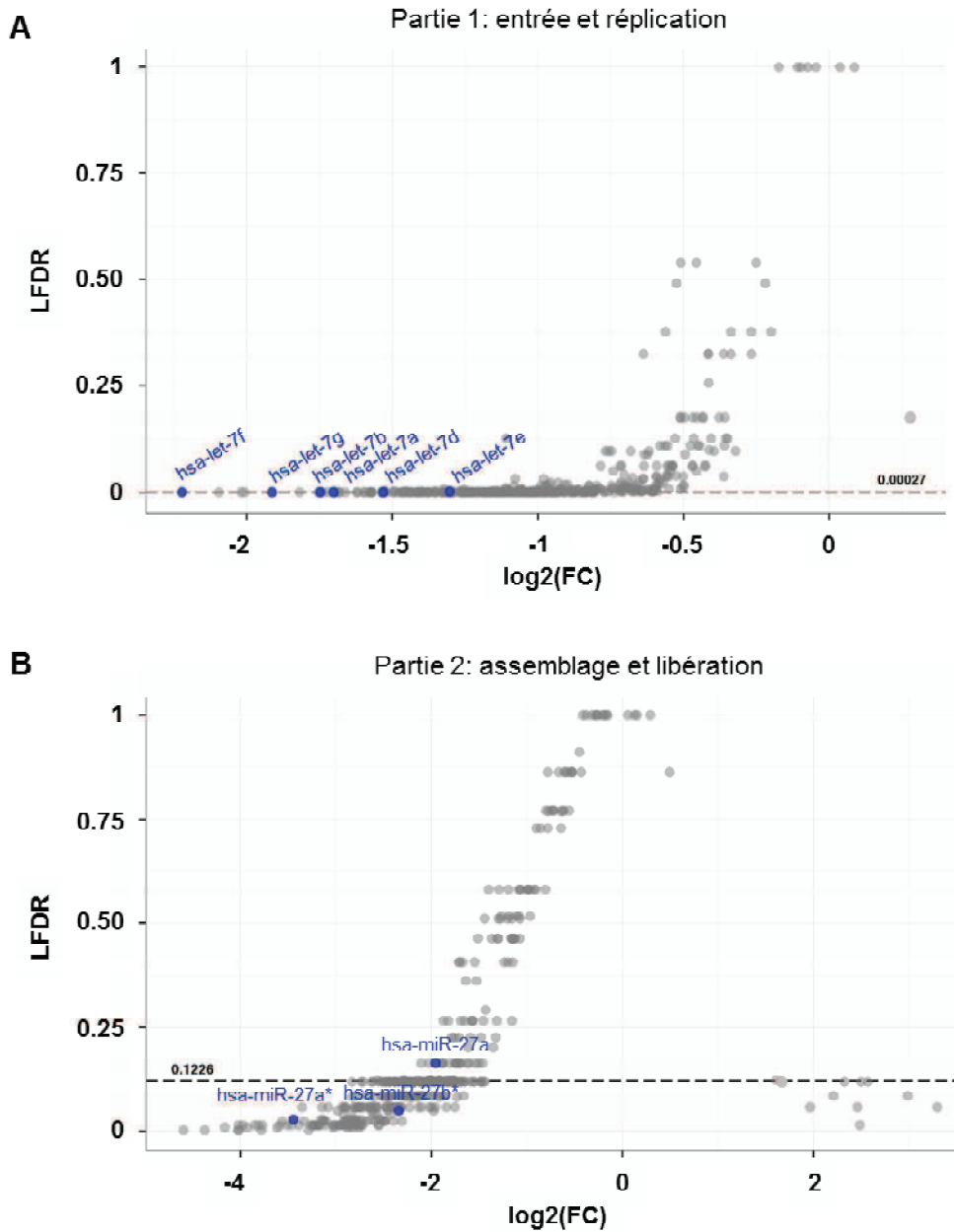


Figure 23 : Analyse de l'effet de la surexpression des miRs sur les phases précoces (A) et les phases tardives (B) du cycle viral. Les miRs situés sous la ligne pointillée sont considérés comme ayant un impact statistiquement significatif sur l'infection par le HCV. Les seuils ont été fixés en accord avec le bio-statisticien associé à l'étude afin de limiter le nombre de faux positifs mais également d'avoir un nombre suffisant de miRs à analyser. Les miRs apparaissant en bleu sont des miRs au sein de la banque qui avaient précédemment été décrits dans la littérature comme ayant un impact sur le cycle répliatif du HCV, tels que la famille des let-7 connus pour l'inhibition de la phase précoce (A) et la famille des miR-27 dans l'inhibition des phases tardives (B) du cycle viral.

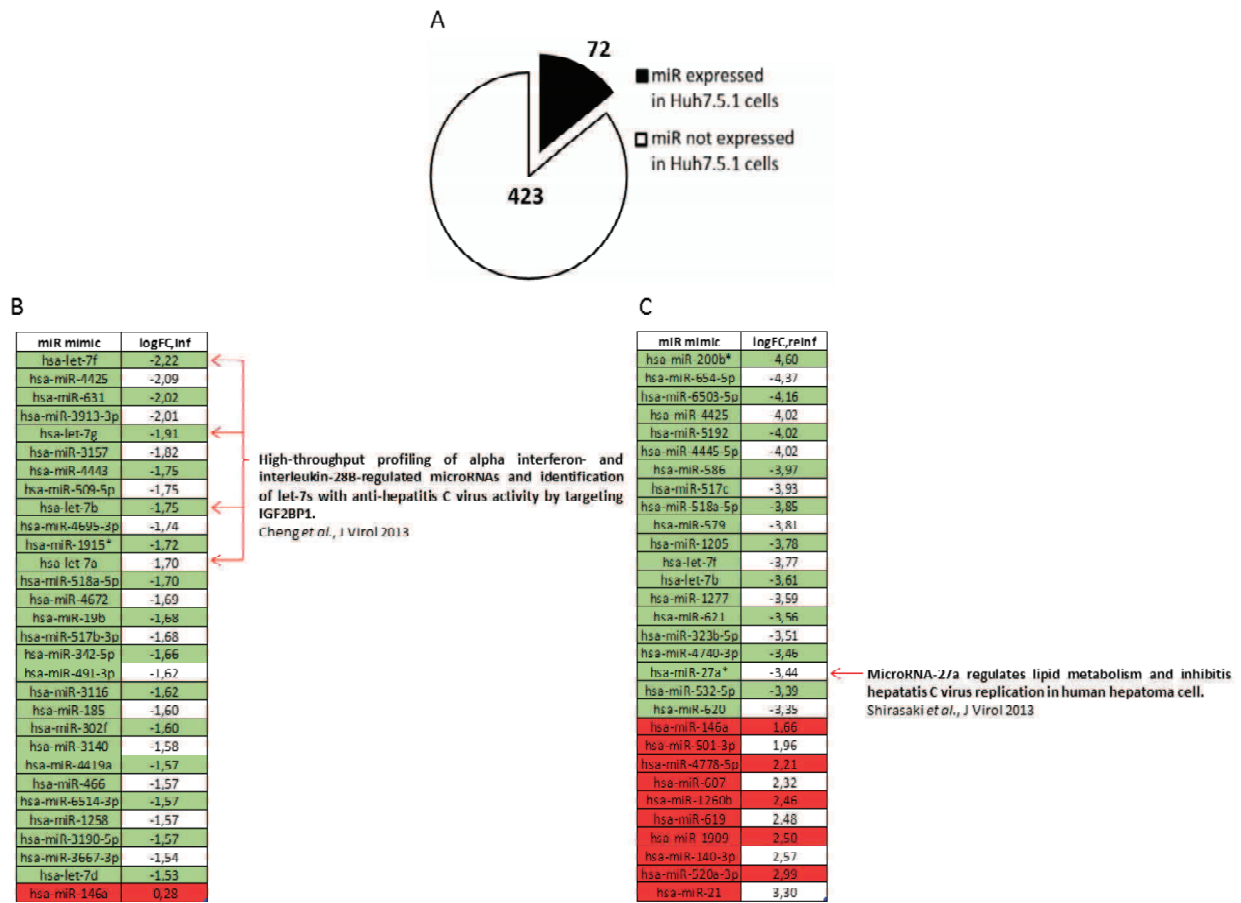


Figure 24 : Analyse des miRs qui modulent l’efficacité de l’infection par le HCV. (A) 15% des miRs modulant l’efficacité du cycle viral du HCV sont exprimés de façon endogène dans les cellules Huh7.5.1. (B-C) Liste des 30 premiers miRs identifiés lors de la première partie (B) ou deuxième partie (C) du criblage miR mimic. Les miRs en vert diminuent l’efficacité de l’infection virale et les miRs en rouge la favorisent. Les flèches rouges indiquent les miRs précédemment associés au cycle viral du HCV.

3. Les miR-619 et miR-501-3p jouent un rôle dans l’assemblage et la libération des nouveaux virions.

Nous avons dans un premier temps analysé l’ensemble des miRs ayant un impact significatif sur l’intégralité du cycle viral du HCV. L’analyse globale nous a permis d’identifier que sur les 495 miRs qui ont un effet sur le cycle viral, seulement 72 sont exprimés de façon endogène dans les cellules Huh7.5.1 (**figure 24A**). Etant donné que les étapes les moins bien caractérisées du cycle réplcatif du HCV sont l’assemblage et la libération des nouveaux virions, nous avons décidé de nous concentrer sur les 309 miRs qui modulent les phases tardives du cycle viral. Parmi eux, nous avons sélectionné pour des analyses plus approfondies 4 miRs incluant le miR-140-3p, miR-501-

3p, miR-619 et le miR-4778-5p, qui semblent augmenter drastiquement l'infection par le HCV en l'absence d'impact sur les phases précoces de l'infection.

Dans un premier temps, nous avons validé avec des expériences indépendantes l'effet de la sur-expression de ces 4 miRs sur l'infection virale (**Figure 25**). Ainsi, nous avons confirmé l'effet des miRs 501 et miR-619 sur les phases tardives du cycle viral. En effet, la sur-expression des miR-619 et miR-501-3p ne module pas l'infection par le HCV dans les cellules transfectées (partie 1), correspondant aux étapes d'entrée, de traduction et de réplication de l'ARN viral. En revanche, ces deux miRs augmentent de façon significative l'infection par le HCV des cellules Huh7.5.1 incubées avec le surnageant des cellules de la partie 1.

Ces résultats suggèrent que les miRs 619 et 501-3p ont un impact sur les étapes d'assemblage et de libération des nouveaux virions ou encore sur l'infectiosité des nouveaux virions produits.

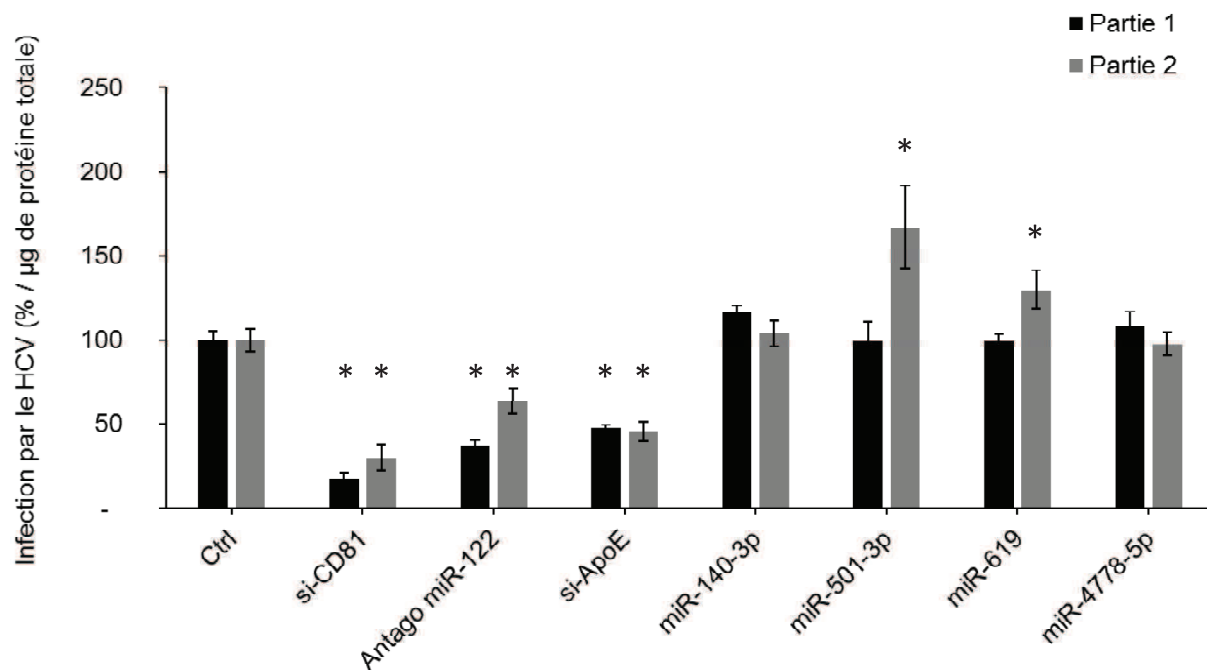


Figure 25 : Validation de l'effet des 4 miRs sélectionnés sur les phases tardives du cycle répliatif du HCV. Les miR-501-3p et miR-619 stimulent significativement les phases tardives du cycle viral du HCV (en gris) sans avoir d'effet sur les phases précoces du cycle viral (en noir). P < 0.05, test Mann Whitney (n=12).

4. Identification des cibles des miR-619 et miR-501-3p en lien avec les phases tardives du cycle viral du HCV.

Afin de caractériser l'effet de ces miRs aux cours des étapes tardives du cycle viral, nous avons tout d'abord cherché les cibles validées et prédites de ces miRs à l'aide des bases de données DIANA, Target scan et miRDB. Une fois ces cibles identifiées, nous avons vérifié leur expression dans nos cellules Huh7.5.1 grâce à des données d'expression génique des cellules Huh7.5.1 disponibles au laboratoire. Ainsi, toutes les cibles non exprimées dans nos cellules n'ont pas été conservées pour la suite des analyses. Les gènes cibles ont ensuite été analysés à l'aide d'un logiciel d'analyse de voies de signalisation IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) (**figure 26**). Chacun des gènes potentiellement modulables par les miR-501-3p et miR-619 a été associé à une ou plusieurs voies de signalisation cellulaire (*pathway*) ou à des réseaux de gènes en relation avec le développement de maladie ou des régulateurs en amont (*network*) (**Tableau 5**).

La fonction de chacun des gènes a ensuite été analysée à l'aide de la base de données Uniprot (Consortium, 2015). Ainsi, nous avons pu identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol (HMGCS1), la voie d'export ESCRT (CHMP1B), la maturation des protéines au sein du RE (SEC63, SLC35D1, OGT), ou encore la biogenèse des adipocytes (et SMAD3). Enfin, nous avons sélectionné les gènes ayant un impact dans la maturation des protéines au sein du RE, l'export, les protéines interagissant avec l'ARN et la lipogenèse (**Tableau 5**). Le rôle des gènes cibles que nous avons sélectionnés au cours des phases tardives de l'infection par le HCV est en cours d'étude. En effet, nous avons mis en place un criblage par ARN interférant pour diminuer l'expression de chacun de ces gènes afin d'analyser l'effet sur l'infection par le HCV en utilisant le même protocole que pour le criblage des miRs.

miR	Pathway or Network	Symbol	Function
miR-501-3p	calcium signaling	MEF2A	myocyte enhancer factor 2A
		PPP3CA	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme
		PPP3CC	protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isozyme
	cholesterol biosynthesis	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)
		AFF4	Key component of the super elongation complex (SEC), a complex required to increase the catalytic rate of RNA polymerase II transcription by suppressing transient pausing by the polymerase at multiple sites along the DNA. In the SEC complex, AFF4 acts as a central scaffold that recruits other factors through direct interactions with ELL proteins (ELL, ELL2 or ELL3) and the P-TEFb complex
	Inflammatory Response, Dermatological Diseases and Conditions, Inflammatory Disease	CHMP1B	Probable peripherally associated component of the endosomal sorting required for transport complex III (ESCRT-III) which is involved in multivesicular bodies (MVBs) formation and sorting of endosomal cargo proteins into MVBs
		CUX1	Probably has a broad role in mammalian development as a repressor of developmentally regulated gene expression. May act by preventing binding of positively-activating CCAAT factors to promoters. Component of nf-munr repressor; binds to the matrix attachment regions (MARs) (5' and 3') of the immunoglobulin heavy chain enhancer
		DCLK1	Probable kinase that may be involved in a calcium-signaling pathway controlling neuronal migration in the developing brain. May also participate in functions of the mature nervous system.
		LMX1A	Acts as a transcriptional activator by binding to an A/T-rich sequence, the FLAT element, in the insulin gene promoter. Required for development of the roof plate and, in turn, for specification of dorsal cell fates in the CNS and developing vertebrae (By similarity).
		PTBP2	RNA-binding protein which binds to intronic polypyrimidine tracts and mediates negative regulation of exons splicing. May antagonize in a tissue-specific manner the ability of NOVA1 to activate exon selection. In addition to its function in pre-mRNA splicing, plays also a role in the regulation of translation. Isoform 5 has a reduced affinity for RNA.
		RBMS1	Single-stranded DNA binding protein that interacts with the region upstream of the MYC gene. Binds specifically to the DNA sequence motif 5'-[AT]CT[AT]AT]-3'. Probably has a role in DNA replication.
		RC3H1	Post-transcriptional repressor of mRNAs containing a conserved stem loop motif, called constitutive decay element (CDE), which is often located in the 3'-UTR, as in HMGB3, ICOS, IER3, NFKBID, NFKBIZ, PPP1R10, TNF and in many more mRNAs (By similarity). Binds to CDE and promotes mRNA deadenylation and degradation. This process does not involve miRNAs (By similarity). In follicular helper T (T _{fh}) cells, represses of ICOS and TNFRSF4 expression, thus preventing spontaneous T _{fh} cell differentiation, germinal center B-cell differentiation in the absence of immunization and autoimmunity (By similarity). In resting or LPS-stimulated macrophages, controls inflammation by suppressing TNF expression (By similarity). Also recognizes CDE in its own mRNA and in that of paralogous RC3H2, possibly leading to feedback loop regulation (By similarity).
		SCN2A	Mediates the voltage-dependent sodium ion permeability of excitable membranes. Assuming opened or closed conformations in response to the voltage difference across the membrane, the protein forms a sodium-selective channel through which Na ⁺ ions may pass in accordance with their electrochemical gradient.
SEC63		Required for integral membrane and secreted preprotein translocation across the endoplasmic reticulum membrane.	
ZFXH4		May play a role in neural and muscle differentiation (By similarity). May be involved in transcriptional regulation.	
Inflammatory Response, Organ Morphology and Function, Nervous System Development	CDK6	Serine/threonine-protein kinase involved in the control of the cell cycle and differentiation; promotes G1/S transition. Phosphorylates pRB/RB1 and NPM1. Interacts with D-type G1 cyclins during interphase at G1 to form a pRB/RB1 kinase and controls the entrance into the cell cycle. Involved in initiation and maintenance of cell cycle exit during cell differentiation; prevents cell proliferation and regulates negatively cell differentiation, but is required for the proliferation of specific cell types (e.g. erythroid and hematopoietic cells). Essential for cell proliferation within the dentate gyrus of the hippocampus and the subventricular zone of the lateral ventricles. Required during thymocyte development. Promotes the production of newborn neurons, probably by modulating G1 length. Promotes, at least in astrocytes, changes in patterns of gene expression, changes in the actin cytoskeleton including loss of stress fibers, and enhanced motility during cell differentiation. Prevents myeloid differentiation by interfering with RUNX1 and reducing its transcription transactivation activity, but promotes proliferation of normal myeloid progenitors. Delays senescence. Promotes the proliferation of beta-cells in pancreatic islets of Langerhans. May play a role in the centrosome organization during the cell cycle phases	
	CSDE1	RNA-binding protein. Required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. May be involved in translationally coupled mRNA turnover. Implicated with other RNA-binding proteins in the cytoplasmic deadenylation/translational and decay interplay of the FOS mRNA mediated by the major coding-region determinant of instability (mCRD) domain	
	ELAV2	Binds RNA. Seems to recognize a GAAA motif. Can bind to its own 3'-UTR, the FOS 3'-UTR and the ID 3'-UTR	
	GLI2	Has a dual function as a transcriptional activator and a repressor of the hedgehog (Hh) pathway. May play a role during embryogenesis	
	HOXD10	Sequence-specific transcription factor which is part of a developmental regulatory system that provides cells with specific positional identities on the anterior-posterior axis.	
Cellular Development, Nervous System Development	LSM5	Plays a role in U6 snRNP assembly and function. Binds to the 3' end of U6 snRNA, thereby facilitating formation of the spliceosomal U4/U6 duplex formation in vitro.	
	MEF2A	Transcriptional activator which binds specifically to the MEF2 element, 5'-YTA(AT) _n TAR-3', found in numerous muscle-specific genes. Also involved in the activation of numerous growth factor- and stress-induced genes. Mediates cellular functions not only in skeletal and cardiac muscle development, but also in neuronal differentiation and survival. Plays diverse roles in the control of cell growth, survival and apoptosis via p38 MAPK signaling in muscle-specific and/or growth factor-related transcription. In cerebellar granule neurons, phosphorylated and sumoylated MEF2A represses transcription of NUR77 promoting synaptic differentiation. Associates with chromatin to the ZNF16 promoter.	
	MYCN	May function as a transcription factor.	

		Chromatin-binding factor that repress Notch signaling in the absence of Notch intracellular domain by acting as a CBF1 corepressor. Binds to the HEY promoter and might assist, along with NCOR2, RBPJ-mediated repression. Binds RNA in vitro. May be involved in RNA metabolism. Promotes ubiquitination of several tyrosine-phosphorylated Src substrates, including CDH1, CTNN and DOK1. Targets CDH1 for endocytosis and degradation Transcription factor that coordinates proliferation arrest and the differentiation of myeloid progenitors, adipocytes, hepatocytes, and cells of the lung and the placenta. Binds directly to the consensus DNA sequence 5'-TJTGJNNGNAA[GTG]-3' acting as an activator on distinct target genes (PubMed:11242107). During early embryogenesis, plays essential and redundant functions with CEBPB. Essential for the transition from common myeloid progenitors (CMP) to granulocyte/monocyte progenitors (GMP). Critical for the proper development of the liver and the lung (By similarity). Necessary for terminal adipocyte differentiation, is required for postnatal maintenance of systemic energy homeostasis and lipid storage (By similarity). To regulate these different processes at the proper moment and tissue, interplays with other transcription factors and modulators. Downregulates the expression of genes that maintain cells in an undifferentiated and proliferative state through E2F1 repression, which is critical for its ability to induce adipocyte and granulocyte terminal differentiation. Reciprocally E2F1 blocks adipocyte differentiation by binding to specific promoters and repressing CEBPA binding to its target gene promoters. Proliferation arrest also depends on a functional binding to SWI/SNF complex (PubMed:14660596). In liver, regulates gluconeogenesis and lipogenesis through different mechanisms. To regulate gluconeogenesis, functionally cooperates with FOXO1 binding to IRE-controlled promoters and regulating the expression of target genes such as PCK1 or G6PC. To modulate lipogenesis, interacts and transcriptionally synergizes with SREBF1 in promoter activation of specific lipogenic target genes such as ACAS2. In adipose tissue, seems to act as FOXO1 coactivator accessing to ADIPOQ promoter through FOXO1 binding sites (By similarity).
ATXN1		Receptor for netrin required for axon guidance. Mediates axon attraction of neuronal growth cones in the developing nervous system upon ligand binding. Its association with UNC5 proteins may trigger signaling for axon repulsion. It also acts as a dependence receptor required for apoptosis induction when not associated with netrin ligand. Implicated as a tumor suppressor gene.
CBLL1		Protein NipSnap homolog 2
CEBPA		Accessory subunit of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels, regulating their cell-surface expression and cyclic nucleotide dependence. Required for completion of mitosis and cytokinesis. May function as a guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase RAC1. E3 ubiquitin-protein ligase which accepts ubiquitin from E2 ubiquitin-conjugating enzymes UBE2L3 and UBE2L6 in the form of a thioester and then directly transfers the ubiquitin to targeted substrates. Mediates the ubiquitination and degradation of the DNA damage kinase PRKDC.
DCC		May function as RNase and regulate the levels of target RNA species
GBAS		runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
PEX5L		SMAD family member 3
RCC2		Transcription repression factor which plays an important role in the establishment of the regional subdivision of the developing brain and in the development of the telencephalon Functions as a GC-rich promoter-specific transactivating transcription factor.
RNF144A		Has E3 ubiquitin ligase activity towards IGBP1, promoting its monoubiquitination, which results in deprotection of the catalytic subunit of protein phosphatase PP2A, and its subsequent degradation by polyubiquitination
ZC3H12C		Acts as a transcriptional coactivator of serum response factor (SRF). Required for skeletal myogenic differentiation.
RUNX1T1	adipocyte biogenesis	RNA binding protein that regulates the expression of target mRNAs at the translation level. Regulates expression of the NOTCH1 antagonist NUMB. Binds RNA containing the sequence 5'-GUUAGUUAGUUAGUU-3' and other sequences containing the pattern 5'-[GA]U1-3AGU-3'. May play a role in the proliferation and maintenance of stem cells in the central nervous system (By similarity).
SMAD3		Single-stranded nucleic acid binding protein that binds preferentially to oligo dC. Major cellular poly(rC)-binding protein. Binds also poly(rU). Negatively regulates cellular antiviral responses mediated by MAVS signaling. It acts as an adapter between MAVS and the E3 ubiquitin ligase ITCH, therefore triggering MAVS ubiquitination and degradation.
FOXG1		Dephosphorylates and concomitantly deactivates CaM-kinase II activated upon autophosphorylation, and CaM-kinases IV and I activated upon phosphorylation by CaM-kinase kinase. Promotes apoptosis.
GPBP1		Required for selective autophagy (aggrephagy) but not for autophagic degradation of bulk cytosol in response to starvation. Involved in the formation and degradation of cytoplasmic polyubiquitin-containing bodies (p62 bodies, ALIS/aggresome-like induced structures). May play a role as adaptor or scaffolding protein by promoting the association of the E3-like ligase ATG12-ATG5-ATG16L and LC3 to ubiquitinated target substrate. The association with GABARAP is required for its recruitment to LC3B-positive p62 bodies suggesting a role in targeting certain p62 structures for clearance. Involved in midbody ring degradation.
MID1		
MKL2		
MSI1	Cancer	
PCBP2		
PPM1F		
WDFY3	Cell Cycle, Organismal Injury and Abnormalities,	

ACVR2B	<p>Transmembrane serine/threonine kinase activin type-2 receptor forming an activin receptor complex with activin type-1 serine/threonine kinase receptors (ACVR1, ACVR1B or ACVR1c). Transduces the activin signal from the cell surface to the cytoplasm and is thus regulating many physiological and pathological processes including neuronal differentiation and neuronal survival, hair follicle development and cycling, FSH production by the pituitary gland, wound healing, extracellular matrix production, immunosuppression and carcinogenesis. Activin is also thought to have a paracrine or autocrine role in follicular development in the ovary. Within the receptor complex, the type-2 receptors act as a primary activin receptors (binds activin-A/INHBA, activin-B/INHBB as well as inhibin-A/INHBA). The type-1 receptors like ACVR1B act as downstream transducers of activin signals. Activin binds to type-2 receptor at the plasma membrane and activates its serine-threonine kinase. The activated receptor type-2 then phosphorylates and activates the type-1 receptor. Once activated, the type-1 receptor binds and phosphorylates the SMAD proteins SMAD2 and SMAD3, on serine residues of the C-terminal tail. Soon after their association with the activin receptor and subsequent phosphorylation, SMAD2 and SMAD3 are released into the cytoplasm where they interact with the common partner SMAD4. This SMAD complex translocates into the nucleus where it mediates activin-induced transcription. Inhibitory SMAD7, which is recruited to ACVR1B through FKBP1A, can prevent the association of SMAD2 and SMAD3 with the activin receptor complex, thereby blocking the activin signal. Activin signal transduction is also antagonized by the binding to the receptor of inhibin-B via the IGSF1 inhibitor coreceptor.</p> <p>Microtubule-associated protein required for initial steps of neuronal dispersion and cortex lamination during cerebral cortex development. May act by competing with the putative neuronal protein kinase DCLK1 in binding to a target protein. May in that way participate in a signaling pathway that is crucial for neuronal interaction before and during migration, possibly as part of a calcium ion-dependent signal transduction pathway. May be part with PAFAH1B1/IJS-1 of overlapping, but distinct, signaling pathways that promote neuronal migration.</p>
DCX	Orphan receptor that acts as transcription activator in the absence of bound ligand. Binds specifically to an estrogen response element and activates reporter genes controlled by estrogen response elements (By similarity). Induces the expression of PERM1 in the skeletal muscle.
ESRRG	Serine/threonine-protein kinase involved in various processes such as cell proliferation, differentiation, migration, transformation and programmed cell death. Extracellular stimuli such as proinflammatory cytokines or physical stress stimulate the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAP/JNK) signaling pathway. In this cascade, two dual-specificity kinases MAP2K4/MKK4 and MAP2K7/MKK7 phosphorylate and activate MAPK9/JNK2. In turn, MAPK9/JNK2 phosphorylates a number of transcription factors, primarily components of AP-1 such as JUN and ATF2 and thus regulates AP-1 transcriptional activity. In response to oxidant or ribotoxic stresses, inhibits rRNA synthesis by phosphorylating and inactivating the RNA polymerase 1-specific transcription initiation factor RRN3. Promotes stressed cell apoptosis by phosphorylating key regulatory factors including TP53 and YAP1. In T-cells, MAPK8 and MAPK9 are required for polarized differentiation of T-helper cells into Th1 cells. Upon T-cell receptor (TCR) stimulation, is activated by CARM1, BCL10, MAP2K7 and MAP3K7/TAK1 to regulate JUN protein levels. Plays an important role in the osmotic stress-induced epithelial tight-junctions disruption. When activated, promotes beta-catenin/CTNNB1 degradation and inhibits the canonical Wnt signaling pathway. Participates also in neurite growth in spiral ganglion neurons. Phosphorylates the CLOCK-ARNTL/BMAL1 heterodimer and plays a role in the regulation of the circadian clock (PubMed:22441692).
PCBP1	Single-stranded nucleic acid binding protein that binds preferentially to oligo dC.
PDE3B	Cyclic nucleotide phosphodiesterase with a dual-specificity for the second messengers cAMP and cGMP, which are key regulators of many important physiological processes. May play a role in fat metabolism. Regulates cAMP binding of RAPGEF3. Through simultaneous binding to RAPGEF3 and PIK3R6 assembles a signaling complex in which the PI3K gamma complex is activated by RAPGEF3 and which is involved in angiogenesis.
SMAD3	Receptor-regulated SMAD (R-SMAD) that is an intracellular signal transducer and transcriptional modulator activated by TGF-beta (transforming growth factor) and activin type 1 receptor kinases. Binds the TRE element in the promoter region of many genes that are regulated by TGF-beta and, on formation of the SMAD3/SMAD4 complex, activates transcription. Also can form a SMAD3/SMAD4/JUN/FOS complex at the AP-1/SMAD site to regulate TGF-beta-mediated transcription. Has an inhibitory effect on wound healing probably by modulating both growth and migration of primary keratinocytes and by altering the TGF-mediated chemotaxis of monocytes. This effect on wound healing appears to be hormone-sensitive. Regulator of chondrogenesis and osteogenesis and inhibits early healing of bone fractures. Positively regulates PDPK1 kinase activity by stimulating its dissociation from the 14-3-3 protein YWHAQ which acts as a negative regulator.
SMARCC1	Receptor-regulated SMAD (R-SMAD) that is an intracellular signal transducer and transcriptional modulator activated by TGF-beta (transforming growth factor) and activin type 1 receptor kinases. Binds the TRE element in the promoter region of many genes that are regulated by TGF-beta and, on formation of the SMAD3/SMAD4 complex, activates transcription. Also can form a SMAD3/SMAD4/JUN/FOS complex at the AP-1/SMAD site to regulate TGF-beta-mediated transcription. Has an inhibitory effect on wound healing probably by modulating both growth and migration of primary keratinocytes and by altering the TGF-mediated chemotaxis of monocytes. This effect on wound healing appears to be hormone-sensitive. Regulator of chondrogenesis and osteogenesis and inhibits early healing of bone fractures. Positively regulates PDPK1 kinase activity by stimulating its dissociation from the 14-3-3 protein YWHAQ which acts as a negative regulator.
TGFB3	Involved in embryogenesis and cell differentiation.
PAPOLA	Polymerase that creates the 3'-poly(A) tail of mRNAs. Also required for the endoribonucleolytic cleavage reaction at some polyadenylation sites. May acquire specificity through interaction with a cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) at its C-terminus.
RUNX1T1	Transcription regulator that exerts its function by binding to histone deacetylases and transcription factors. Can repress transactivation mediated by TCF12.
SHANK2	Seems to be an adapter protein in the postsynaptic density (PSD) of excitatory synapses that interconnects receptors of the postsynaptic membrane including NMDA-type and metabotropic glutamate receptors, and the actin-based cytoskeleton. May play a role in the structural and functional organization of the dendritic spine and synaptic junction.
SLC35D1	Transports both UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA) and UDP-N-acetylgalactosamine (UDP-GalNAc) from the cytoplasm to into the endoplasmic reticulum lumen. May participate in glucuronidation and/or chondroitin sulfate biosynthesis.
<p style="text-align: center;">Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry</p>	
<p style="text-align: center;">Gene Expression, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry</p>	

Tableau 5 : Voie de signalisation et réseau dans lesquels sont impliqués les gènes prédits des miR-501 et miR-619.

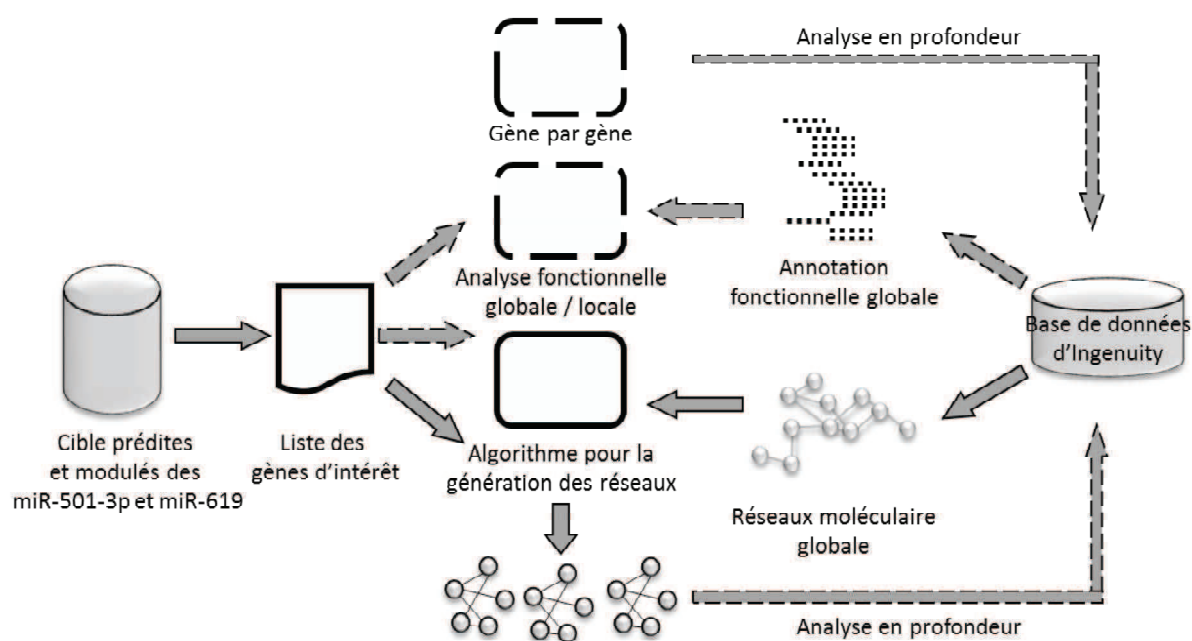


Figure 26 : Les étapes d'analyses par IPA. Le logiciel analyse une liste de gènes et les redistribue dans leurs réseaux respectifs sur la base des informations contenues dans la base de données d'Ingenuity (IPKB). Le réseau moléculaire global est composé de milliers de gènes interagissant les uns avec les autres et permet de calculer un algorithme de génération de réseaux entre les gènes d'intérêts et les autres gènes du réseau. (Source Ingenuity.com)

D'autre part, le logiciel IPA nous a permis de déterminer les lésions et maladies associés à la modulation des cibles potentielles des miR-501-3p et miR-619 (**Tableau 6 et 7 respectivement**). Le miR-501-3p ciblerait des produits d'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et l'inflammation, mais également dans le développement de maladies telles que l'inflammation du foie en lien avec l'infection chronique par le HCV, l'hyperplasie et l'hypoplasie du foie, mais aussi le développement du HCC. Le miR-619 quant à lui a des cibles prédites impliquées dans l'adhésion des hépatocytes, les lésions du foie, l'hyperplasie du foie ainsi que la fibrose et la cirrhose du foie.

Résultats - Partie 1

Ces résultats suggèrent que ces miRs modulent des produits d'expression de gènes impliqués dans des voies de signalisation importantes pour les étapes tardives du cycle viral du HCV. De façon intéressante, ces miRs peuvent également jouer un rôle dans le développement des maladies hépatiques.

Résultats - Partie 1

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-Value	genes
Nephrosis	minimal change nephrotic syndrome	7,63E-04	PPP3CA,PPP3CC
Cardiac Arteriopathy	autosomal dominant coronary artery disease type 1	3,46E-03	MEF2A
Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	autosomal dominant polycystic liver disease	3,46E-03	SEC63
Cardiac Dilation	dilation of right ventricle	1,04E-02	MEF2A
Liver Hypoplasia	hypoplasia of liver	1,06E-02	CDK6,MYCN
Liver Damage, Liver Inflammation/Hepatitis	chronic hepatitis C	1,16E-02	PPP3CA,PPP3CC
Renal Necrosis/Cell Death	survival of mesangial cells	1,38E-02	PPP3CA
Kidney Failure	acute renal failure	1,45E-02	PPP3CA,PPP3CC
Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	liver tumor	2,04E-02	ADCY2,AFF4,ATP11A,CIT,COL10A1,CPEB2,CSDE1,CUX1,DCC,DCLK1,GAN,GLI2,HERC1,HMGCS1,KBTD2,LSM5,MEF2A,OGT,PTBP2,SBNO1,SCN2A,SEMA3C,TET3,TFDP2,TSHZ3,USP37,ZBTB43,ZFH4,ZMYM4
Renal Dilation	dilation of collecting tubule	2,06E-02	SEC63
Cardiac Enlargement	enlargement of cardiomyocytes	2,06E-02	PPP3CA
Cardiac Infarction	acute myocardial infarction	2,59E-02	PPP3CA,PPP3CC
Renal Dilation	dilation of kidney	3,07E-02	SEC63
Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	liver cancer	3,35E-02	ADCY2,AFF4,ATP11A,CIT,COL10A1,CPEB2,CSDE1,CUX1,DCC,DCLK1,GAN,GLI2,HERC1,HMGCS1,KBTD2,LSM5,MEF2A,OGT,PTBP2,SBNO1,SCN2A,SEMA3C,TET3,TFDP2,TSHZ3,USP37,ZBTB43,ZFH4,ZMYM4
Cardiac Hypertrophy	hypertrophy of myocardium	3,41E-02	PPP3CA
Cardiac Hypoplasia	hypoplasia of myocardium	4,08E-02	MYCN
Renal Inflammation, Renal Nephritis	lupus nephritis	4,54E-02	PPP3CA,PPP3CC
Increased Levels of Creatinine	increased clearance of creatinine	5,07E-02	PPP3CA
Renal Necrosis/Cell Death	apoptosis of podocytes	6,06E-02	PPP3CA
Liver Proliferation	quantity of hepatocytes	6,06E-02	CIT
Liver Necrosis/Cell Death	apoptosis of hepatocytes	6,79E-02	CIT,MYCN
Renal Dysfunction	dysfunction of kidney	7,35E-02	PPP3CA
Kidney Failure	chronic renal failure	8,59E-02	PPP3CA,PPP3CC
Increased Levels of Creatinine	increased quantity of creatinine	1,11E-01	PPP3CA
Cardiac Hypoplasia	hypoplasia of trabeculae carne	1,21E-01	MYCN
Renal Proliferation	proliferation of mesangial cells	1,24E-01	PPP3CA
Cardiac Proliferation	proliferation of cardiomyocytes	1,94E-01	MYCN
Heart Failure	failure of heart	2,38E-01	MYCN,PPP2R5E
Liver Hepatomegaly	hepatomegaly	2,40E-01	CUX1
Cardiac Hypertrophy	hypertrophy of cardiomyocytes	2,71E-01	PPP3CA
Cardiac Arteriopathy	coronary artery disease	2,83E-01	MEF2A,SAMD12
Increased Levels of Red Blood Cells	increased quantity of red blood cells	2,91E-01	CDK6
Cardiac Congestive Cardiac Failure, Heart Failure	congestive heart failure	3,13E-01	MYCN
Renal Necrosis/Cell Death	cell death of kidney cells	3,59E-01	DCC,PPP3CA
Cardiac Fibrosis	fibrosis of heart	4,62E-01	PPP3CA
Renal Necrosis/Cell Death	apoptosis of kidney cell lines	5,57E-01	DCC
Hepatocellular Carcinoma, Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	hepatocellular carcinoma	1,00E+00	CPEB2,ZBTB43

Tableau 6 : Rôle des gènes prédits du miR-501-3p dans le développement de maladies d'après le logiciel IPA. De façon intéressante, de nombreuses maladies sont liées au foie et aux hépatocytes. Les gènes dont les produits d'expression sont impliqués dans le développement des lésions sont cités à droite. Les valeurs p sont indicatives et calculées par le logiciel IPA.

Résultats - Partie 1

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-Value	genes
Cardiac Arrhythmia, Congenital Heart Anomaly	familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia type 1	1,81E-03	TGFB3
Liver Adhesion	adhesion of hepatocytes	5,41E-03	SMAD3
Congenital Heart Anomaly	congenital heart disease	5,58E-03	ACVR2B,MKL2,TGFB3
Increased Levels of Alkaline Phosphatase	increased activation of alkaline phosphatase	6,15E-03	SMAD3,TGFB3
Glutathione Depletion In Liver, Liver Fibrosis	generation of reactive oxygen species in liver	7,21E-03	SMAD3
Congenital Heart Anomaly	mesocardia	7,21E-03	ACVR2B
Congenital Heart Anomaly	conotruncal heart malformations	8,75E-03	ACVR2B,MKL2
Liver Fibrosis	chemotaxis of hepatic stellate cells	9,00E-03	SMAD3
Increased Levels of ALT	increased release of ALT	1,08E-02	MAPK9
Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	liver cancer	1,30E-02	DCX,ESRRG,FOXG1,GAL3ST3,MAPK9,MDGA2,MKL2,NUFIP2,OGT,PAPOLA,PCBP2,PDE3B,RUNX1T1,SH3PXD2A,TGFB3,UBN2,WDFY3,ZNF507
Liver Damage	repair of liver	1,44E-02	MAPK9
Congenital Heart Anomaly	ventricular septal defect	1,63E-02	ACVR2B,MKL2
Kidney Failure	end stage renal disease	1,74E-02	PDE3B,SMAD3
Cardiac Damage	reperfusion injury of heart	1,79E-02	MAPK9
Liver Necrosis/Cell Death	apoptosis of hepatocytes	2,08E-02	MAPK9,SMAD3
Liver Proliferation	proliferation of hepatocytes	2,44E-02	MAPK9,SMAD3
Increased Levels of Blood Urea Nitrogen	increased quantity of blood urea nitrogen	2,68E-02	SMAD3
Renal Inflammation, Renal Nephritis	interstitial nephritis	3,03E-02	SMAD3
Congenital Heart Anomaly	transposition of great vessels	3,55E-02	ACVR2B
Liver Fibrosis, Liver Proliferation	proliferation of hepatic stellate cells	3,73E-02	SMAD3
Hepatocellular Carcinoma, Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	tumorigenesis of hepatocellular carcinoma	4,08E-02	MAPK9
Liver Inflammation/Hepatitis, Liver Steatosis	nonalcoholic steatohepatitis	4,25E-02	PDE3B
Congenital Heart Anomaly	perimembranous ventricular septal defect	4,25E-02	MKL2
Congenital Heart Anomaly	dextrocardia	4,60E-02	ACVR2B
Renal Damage	reperfusion injury of kidney	5,11E-02	SMAD3
Liver Inflammation/Hepatitis	alcoholic hepatitis	5,46E-02	PDE3B
Liver Hemorrhaging	bleeding of liver	5,46E-02	MKL2
Increased Levels of Creatinine	increased quantity of creatinine	5,97E-02	SMAD3
Renal Necrosis/Cell Death	apoptosis of renal tubule	7,49E-02	SMAD3
Congenital Heart Anomaly	atrial septal defect	7,49E-02	ACVR2B
Liver Hypoplasia	hypoplasia of liver	7,82E-02	SMAD3
Glomerular Injury, Kidney Failure, Renal Fibrosis	interstitial fibrosis of kidney	8,16E-02	SMAD3
Congenital Heart Anomaly	double outlet right ventricle	8,66E-02	MKL2
Renal Hypoplasia	hypoplasia of kidney	8,66E-02	ACVR2B
Renal Necrosis/Cell Death	necrosis of renal tubule	8,82E-02	SMAD3
Liver Steatosis	hepatic steatosis	9,52E-02	ACVR2B,PDE3B
Liver Inflammation/Hepatitis	inflammation of liver	1,02E-01	MAPK9,PDE3B
Cardiac Arteriopathy	coronary artery disease	1,04E-01	PDE3B,SMAD3
Liver Cirrhosis	primary biliary cirrhosis	1,58E-01	TGFB3
Liver Damage	injury of liver	1,69E-01	MAPK9
Cardiac Congestive Cardiac Failure, Heart Failure	congestive heart failure	1,78E-01	PDE3B
Liver Fibrosis	fibrosis of liver	1,93E-01	SMAD3
Cardiac Fibrosis	fibrosis of heart	2,76E-01	SMAD3
Cardiac Hypertrophy	hypertrophy of heart	4,63E-01	SMAD3

Tableau 7 : Rôle des gènes prédits du miR-619 dans le développement de maladies d'après le logiciel IPA. De façon intéressante, de nombreuses maladies sont liées au foie et aux hépatocytes. Les gènes impliqués dans le développement des lésions sont cités à droite. Les valeurs p sont indicatives et calculées par le logiciel IPA.

Deuxième partie:

**Modulation de l'expression des miRs
lors de l'infection par le HCV
conduisant à la pathogénèse
hépatique**

L'infection par le HCV cause de nombreux changements au sein de la cellule parmi lesquels des modifications de la signalisation cellulaire mais également de l'expression génique qui sont à l'origine d'une transformation cellulaire menant à un phénotype cancéreux. Les miRs jouent un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire et donc la modification phénotypique de la cellule. En lien avec ces mécanismes, la deuxième partie de mon projet a été de déterminer quels miRs sont responsables du passage de la cellule d'un phénotype sain à un phénotype cancéreux après infection par le HCV.

Un séquençage des petits ARN non codants a été réalisé au laboratoire dans lequel le miRNome de cellules Huh7.5.1 différenciées en cellules "*hepatocyte-like*" infectées par le HCV a été comparé au miRNome des cellules non infectées. De nombreux miRs ont vu leur expression augmenter ou diminuer après infection par le HCV. Dans un premier temps, nous avons identifié en utilisant des outils bioinformatiques les cibles potentielles de ces miRs ainsi que les voies de régulation dans lesquelles elles interviennent. Nous avons entre autres identifié les voies de signalisation cellulaire WNT et NOTCH, mais aussi des voies impliquées dans la fibrose. Nous avons sélectionné 20 miRs et nous avons confirmé par RT qPCR la modulation de leur expression après infection par le HCV à différents temps post-infection. Ainsi nous avons montré que l'infection par le HCV augmente l'expression de miR-146a non seulement dans les cellules Huh7.5.1 mais également dans des PHH. L'augmentation du miR-146a a également été confirmée dans des biopsies de patients chroniquement infectés par le HCV comparées à des biopsies de patients non infectés.

Etant donné que le HCV augmente miR-146a dans tous nos modèles d'infection et que ce miR est connu pour jouer un rôle important dans l'inflammation et le cancer, nous avons effectué une analyse sur puce à ADN (*micro array*) pour comparer l'expression de gènes entre des cellules Huh7.5.1 dans lesquelles nous avons surexprimé miR-146a et des cellules Huh7.5.1 contrôles afin de déterminer son rôle fonctionnel dans les cellules hépatocytaires. L'analyse différentielle des ARNm a permis d'identifier une modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité, l'inflammation et le métabolisme cellulaire. Nous confirmons actuellement la modulation de l'expression de certains gènes d'intérêt et étudions leur rôle fonctionnel dans l'infection par le HCV.

Résultats - Partie 2

Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit qui a été soumis à *Journal of Virology* et qui a reçu des commentaires encourageant à la re-soumission d'un manuscrit tenant compte des suggestions des rapporteurs.

**HCV-induced up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes
promotes viral infection and liver disease pathogenesis**

Sophie Pernot^{1,2,*}, Simonetta Bandiera^{1,2,*}, Hussein El Saghire^{1,2},
Sarah C. Durand^{1,2}, Tao Ye^{2,3}, Christine Thumann^{1,2}, Isabel Fofana⁴,
Markus H. Heim⁴, Thomas F. Baumert^{1,2,5,#}, Mirjam B. Zeisel^{1,2,#}

¹Inserm, U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Strasbourg, France;

²Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France; CNRS, UMR7104, Illkirch, France; Inserm, U964, Illkirch, France;

⁴Division of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland; Department of Biomedicine, University of Basel, Basel, Switzerland; ⁵Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatodigestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

* these authors contributed equally

Word count. Abstract: 250 words; Importance: 150 words; main manuscript: 4002 words; 63 references; 4 figures; 2 tables

Corresponding authors: Mirjam B. Zeisel, PhD, PharmD, Inserm U1110, Université de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; Phone: (+33) 3 68 85 37 03, Fax: (+33) 3 68 85 37 24, e-mail: Mirjam.Zeisel@unistra.fr and Thomas F. Baumert, MD, Inserm U1110, Université de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé and Pôle Hépatodigestif, Nouvel Hôpital Civil, F-67000 Strasbourg, France; Phone: (+33) 3 68 85 37 03, Fax: (+33) 3 68 85 37 24, e-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr

Keywords. Hepatitis C virus, microRNA, virus-host interactions, liver disease, hepatocellular carcinoma

Running title. Role of miR-146a-5p in HCV infection and pathogenesis (53 characters)

Abbreviations. ALS: amyotrophic lateral sclerosis; CpG: cytidine-phosphate-guanosine; DMSO: dimethyl sulfoxide; dpi: days post-infection; ECM: extracellular matrix; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; GSEA: Gene Set Enrichment Analysis; HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; HCVcc: cell culture-derived HCV; HNF1a: hepatocyte nuclear factor 1a; IPA: Ingenuity Pathway Analysis; IRAK1: interleukin-1 receptor-associated kinase 1; JAK: Janus kinase; LPS: lipopolysaccharide; MAPK: mitogen-activated protein kinase; miRNA: microRNA; NK: natural killer; NOD: nucleotide-binding oligomerization domain; PHH: primary human hepatocyte; RIG: retinoic acid-inducible gene; mRNA: messenger RNA; rRNA: ribosomal RNA; RNA-Seq: RNA-sequencing, SHP-1: SH2 domain-containing phosphatase-1; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; TLR: Toll-like receptor.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV)-induced chronic liver disease is one of the leading causes of hepatocellular carcinoma (HCC). However, the molecular mechanisms underlying HCC development following chronic HCV infection remain poorly understood. MicroRNAs (miRNAs) play an important role in cellular homeostasis within the liver and deregulation of the miRNome has been associated with liver disease including HCC. While host miRNAs are essential for HCV replication, viral infection in turn appears to induce alterations of intrahepatic miRNA networks. Although the cross-talk between HCV and liver cell miRNAs most likely contributes to liver disease pathogenesis, the functional involvement of miRNAs in HCV-driven hepatocyte injury and HCC remains elusive. Here, we combined a hepatocyte-like based model system, high-throughput small RNA-sequencing, computational analysis and functional studies to investigate HCV-miRNA interactions that may contribute to liver disease and HCC. Profiling analyses indicated that HCV infection differentially regulated the expression of 74 miRNAs by at least two-fold including miRNAs that were previously described to target genes associated with inflammation, fibrosis and cancer development. Further investigation demonstrated that miR-146a-5p was consistently increased in HCV-infected hepatocyte-like cells and primary human hepatocytes as well as in liver tissues from HCV-infected patients. Genome-wide microarray and computational analyses indicated that miR-146a-5p over-expression is related to liver disease and HCC development. Furthermore, we showed that miR-146a-5p positively impacts on late steps of the viral replication cycle thereby increasing HCV infection. Collectively, our data indicate that the HCV-induced increase in miR-146a-5p expression both promotes viral infection and is relevant for pathogenesis of liver disease.

Importance

Hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of chronic liver disease and cancer. However, how HCV induces liver cancer remains poorly understood. There is accumulating evidence that viral cure does not eliminate the risk for HCC development. Thus, there is an unmet medical need to

develop novel approaches to predict and prevent virus-induced HCC. MicroRNA (miRNA) expression is known to be deregulated in liver disease and cancer. Furthermore, miRNAs are essential for HCV replication and HCV infection alters miRNA expression. However, how miRNAs contribute to HCV-driven pathogenesis remains elusive. Here, we show that HCV induces miRNAs that may contribute to liver injury and carcinogenesis. miR-146a-5p was consistently increased in different cell-based models of HCV infection and HCV patient-derived liver tissues. Furthermore, miR-146a-5p increases HCV infection. Collectively, our data are relevant to understand viral pathogenesis and may open perspectives for novel biomarkers and prevention of virus-induced liver disease and HCC.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. While there is no vaccine to prevent HCV infection, tremendous progress has been made in the management of chronic hepatitis C (1). However, recent evidence indicates that individuals that have achieved viral cure remain at risk to develop HCC (2). This suggests that the virus triggers changes in host cell networks that drive liver disease and carcinogenesis, and persist even after viral elimination. However, the molecular mechanisms underlying HCV-induced liver disease and HCC development remain poorly understood.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression at a post-transcriptional level. They play an important role in cellular homeostasis within the liver and hence alterations in intrahepatic miRNA networks have been associated with liver disease, including fibrosis, cirrhosis and HCC (3, 4). Notably, HCV infection is intricately linked to miRNAs as the most abundant miRNA of the liver, miR-122, is essential for HCV replication (5-7). In addition of using host miRNAs for viral replication, HCV may also modulate host cell miRNA profiles to favour its persistence, and thereby induce liver disease (8). Accumulating evidence highlights a complex cross-talk between HCV and miRNAs in liver fibrosis, steatosis and HCC (8). However, the functional involvement of miRNAs in HCV-mediated hepatocyte injury and liver disease pathogenesis remains to be elucidated.

Several pieces of evidence have shown HCV-mediated deregulation of miRNAs in hepatoma cell lines (9). Although a few *ex vivo* studies have investigated miRNA patterns in HCV-associated HCC tissues, no clear picture has yet emerged as to the modulation of miRNAs upon HCV-induced liver disease. Indeed, these studies largely differ in their methodological approach, the sampling size and features, and the ethnicity of patients (9, 10). Most importantly, only limited information is available about the differential expression of miRNAs in pre-neoplastic liver nodules as compared to HCC (11, 12), underlying the current lack of a proper model that closely recapitulates the progression of HCV-associated HCC. To date, the majority of cell culture models to study the molecular virology and cell biology of HCV infection rely on human hepatoma cells (reviewed in (13)). However, given their transformed phenotype, these model systems may preclude to systematically identify changes in host cell circuits relevant for virus-induced liver

disease. Human hepatocytes are the natural target cells of HCV, but primary cells are not well suited for large scale and long-term analysis of infection. It had previously been reported that DMSO-differentiation of Huh7-derived human hepatoma cell lines induces a hepatocyte-like phenotype and that these cells are amenable to long-term HCV infection (14-16). In this study, we combined this hepatocyte-like based model system, high-throughput small RNA-sequencing, computational analysis and functional studies to investigate HCV-miRNA interactions that may contribute to liver disease and HCC.

Material and method

Human subjects

Human material from patients undergoing liver biopsy or surgical resection was obtained with informed consent from all patients. The respective protocols were approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Basel, Switzerland (EKBB 13 December 2004, liver biopsies) and University of Strasbourg Hospitals, France (CPP 10-17, isolation of primary human hepatocytes).

Liver biopsies

Histopathological grading and staging of the liver biopsies according to the Metavir classification system was performed at the Pathology Institute of the University Hospital Basel as described (17) and are summarized in Table 1. All patients that donated liver tissue were male between 30 and 55 years old and female between 31 and 76 years old (Table 1).

Cell culture

The source and culture conditions of Huh7.5.1 cells have been described (18). For proliferation arrest and differentiation in long-term infection experiments, 2.5×10^4 Huh7.5.1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) as described (14-16). Primary human hepatocytes (PHH) were isolated and cultured as described (19).

miRNA transfection

Huh7.5.1 cells were reverse transfected with miR-146a-5p mimic or control miRNA mimic (5 nM) (GE Dharmacon) using RNAiMax reagent according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Forty-eight hours post-transfection, total RNA was extracted and subject to transcriptomic analyses.

HCV production and infection assays

Cell culture-derived HCVcc Jc1, Jc1E2^{FLAG} and JcR2a (all genotype 2a/2a) were generated in Huh7.5.1 cells as described (20-22). Infectivity of HCVcc was determined by calculating the 50% tissue culture infectious doses (TCID₅₀) as described (23). Titers of HCVcc Jc1 and JcR2a used across experiments were 0.5-5 x 10⁶/ml, and titer of Jc1E2^{FLAG} was 1.6 x 10⁷/ml. Fifty-percent confluent Huh7.5.1 cultures were infected with HCVcc Jc1 or Jc1E2^{FLAG} for 7 days. Eighty-percent confluent PHH monolayers were exposed to HCVcc Jc1 infection for 3 days. FLAG peptide (100 µg/mL) or cell culture supernatants from mock electroporated cells were used for control experiments. HCV infection was assessed by RT-qPCR of intracellular HCV RNA, immunostaining using HCV E2-specific AP33 antibody or luciferase activity as described (22, 24, 25)(22, 24, 25)(22, 24, 25).

Effect of miR-146a on the HCV life cycle

To assess the impact of miR-146a on the viral life cycle, Huh7.5.1 were transfected with miR-146a-5p mimic or miRNA control (20 nM) using Interferin HTS (Polyplus) according to the 96-well format reverse transfection protocol previously described for siRNA (26). siCD81 and anti-miR-122 were used as controls to inhibit HCV entry and replication, respectively (5, 26, 27). After 48h, a two step infection assay was performed as described (27, 28). Briefly, during the first part of the protocol (part 1), 50 µl of HCVcc JcR2a were incubated with Huh7.5.1 cells during 4h. HCVcc were then removed and cells incubated with 150 µl of complete medium for 48h. In the second step of the protocol (part 2), supernatants from cells in part 1 were used to inoculate naïve Huh7.5.1 cells, which were cultured for another 72h. Cells from part 1 and part 2 were lysed at the end of each infection step to determine Renilla luciferase activity (Promega) as described (22,

25). Renilla luciferase activity was normalized to protein amounts, which were determined in the same lysate using DC protein Assay (BioRad) according to manufacturer's instructions.

RNA purification

For total RNA purification, human liver tissues, Huh7.5.1 cells and PHH were lysed using TRI-reagent (MRC) and RNA purified either according to the manufacturer's instructions or in combination with the Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research). RNA quantity and quality was assessed using NanoDrop (Thermo Scientific) and Bioanalyzer 2100 (Illumina) with a quality cut-off of RNA Integrity Number >8.

Small RNA library preparation deep sequencing

Libraries were prepared as described (17, 29). Briefly, 10 µg of total RNA from Huh7.5.1 cells that were HCV-infected for 7 days, were size fractionated on a 17.5% urea denaturing polyacrylamide gel. The 19-24 nt band was excised, crushed and solved in 2 volumes of 0.3 M NaCl by overnight agitation at 4°C. Small RNAs were sequentially ligated to 3' adapter (5'-NNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-[C7amino]) and then to 5' adapter (GUUCAGAGUUCUACAGUCCACGAUCNNNN) (with T4 RNA Ligase 2 and T4 RNA Ligase 1, respectively). Four degenerate bases were respectively included at the 3' end of the 5' adapter and at the 5' end of the 3' adapter to minimize ligation bias due to secondary structure formation (30, 31). After each ligation step, the product was purified on denaturing polyacrylamide gel. In order to generate cDNA libraries, RNA was reverse transcribed with SuperScript III RT (Thermo Scientific), then amplified by PCR with a common forward primer and different reverse primers for multiplex sequencing. PCR products were sent for large-scale sequencing, which was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform using an Illumina HiSeq 2500 instrument with a read length of 50 nt.

Reverse Transcription Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

Quantitative real-time PCRs were established as described (32) using a Corbett Rotor-gene 6000 Real-Time PCR System (Qiagen). For mature miRNA analysis, total RNA (100 ng) was first

polyadenylated and reverse transcribed using the miScript II RT system (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The obtained cDNA (2 μ l of a 1/10 dilution) was subject to RT-qPCR using the miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). Primers were the mature miRNA sequence for the forward primers (as indicated at the Sanger miRBase database, v19.0 (33)), and the universal miScript primer (Qiagen) for the reverse primer. To check for RT-qPCR efficiency, standard curves were performed using 10-fold dilution series of total RNA from naive Huh7.5.1 cells. Data were analyzed using the $\Delta\Delta$ Ct method (34)), and the universal miScript primer (Qiagen) for the reverse primer. To check for RT-qPCR efficiency, standard curves were performed using 10-fold dilution series of total RNA from naive Huh7.5.1 cells. Data were analyzed using the $\Delta\Delta$ Ct method (34)(34) using small nucleolar RNA, C/D box 61 (SNORD61) as an endogenous reference, and the non-infected samples as a calibrator.

Microarray

Genome-wide mRNA profiling in miR-146a-5p over-expressing Huh7.5.1 cells was performed using GeneChip Gene 1.0 ST array (Affymetrix TSA) at the IGBMC Microarray and Sequencing Platform (Illkirch, France). Briefly, biotinylated single strand cDNA targets were prepared as described (35). Following fragmentation and end-labelling, hybridization of 2.07 μ g of cDNAs was performed using the GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) for 16h at 45°C. The array strips were imaged using the GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) at a resolution of 0.7 μ m. Console software was used to generate DAT and CEL files displaying the expression level of 28.869 transcripts. Three technical replicates were run for each condition.

Bioinformatic and statistical analyses

Processing and annotation of small RNA sequences have been described (17). Briefly, sequencing reads were preprocessed using FASTX_Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit). Reads of 15 to 40 nt in length were then mapped to the human genome (assembly version hg19 – UCSC repository) using Bowtie v0.12.8, (36). Small RNAs were annotated and quantified using ncPRO-seq as described (37). To allow subsequent comparative expression analysis, miRNA measures were normalized per million miRNA reads (RPMmi, Reads Per Million miRNA reads), and only

miRNAs present in at least one of the libraries with a minimum of 10 RPMmi were kept for further analysis. For analysis of miRNA expression patterns, hierarchical clustering with complete linkage and euclidean distance was performed using the union of the most abundant miRNAs in each library using the Multi Experiment Viewer software (MeV version 4.9.0).

Raw data (CEL Intensity files) from genome-wide mRNA profiling were extracted from the scanned images using the Affymetrix GeneChip® Command Console (AGCC) version 4.0. CEL files were further processed with Affymetrix Expression Console software version 1.3.1 to calculate probe set signal intensities using Robust Multi-array Average (RMA) algorithms with default settings. Differentially expressed genes were selected using the FCROS method (38) setting selection error at 0.03. Functional annotation and gene network analyses of differentially regulated genes was performed by using Ingenuity Pathway Analysis (IPA Qiagen) software. In parallel, modulation of molecular pathway under miR-146a-5p over-expression was determined in Molecular Signature Database (MSigDB, ver.4.0) (39) using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, (40)(40)(40)).

miRNA targeting analyses were performed using MiRSystem (41), which allows retrieving both experimentally validated and predicted miRNA targets.

Unless otherwise indicated, the data are presented as the mean \pm SEM, and were analyzed by the two-tailed Mann-Whitney test as indicated. A p -value < 0.05 was considered significant and is indicated by an asterisk in relevant Figures.

Gene Expression Omnibus accession numbers

Genome-wide mRNA and small RNA data reported in this paper are currently under submission to the Gene Expression Omnibus database (GEO).

Results

Persistent HCV infection induces the up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes

To systematically identify HCV-induced alteration of miRNA profiles in hepatocytes, we induced a poor proliferative state as well as expression of hepatocyte-specific genes in Huh7.5.1 cells, a state-of-the-art permissive cell line for HCV infection using 1% DMSO (14-16). These hepatocyte-like cells were then subject to HCV (strain Jc1) infection for 7 days (17, 42) which resulted in the establishment of pervasive infection as assessed by immunofluorescence staining against the viral antigen E2 (Fig. 1A). We then performed high-throughput small RNA cloning and deep sequencing of these persistently HCV-infected hepatocyte-like cells (17, 29). In total, 109,543,844 reads were generated for both cells at 7 days post-infection (dpi) and non-infected controls. About 85% of total reads could be mapped to the human genome, and categorized into RNA classes based on sequence annotation (data not shown). The large majority of reads from both HCV-infected and non-infected cells was annotated as mature miRNAs of about 22 nt in length. Interestingly, infected cells presented a slight increase in the number of reads annotated as rRNA as compared to controls (data not shown). This is consistent with previous evidence of deregulated rRNA transcription in HCV-infected cultured liver cells (43). Profiling analyses indicated that HCV infection differentially regulated the expression of 74 miRNAs, of which 57 were up-regulated by at least 2-fold and 17 were down-regulated 2-fold or more (Fig. 1B). Among the up-regulated miRNAs, miR-21-5p was previously reported to be enhanced by HCV in both Huh7-derived cells and in liver tissues (44-46). Interestingly, miR-21-5p appears to be highly expressed in HCC tumors and cell lines where it was shown to enhance cell proliferation, migration, and invasion (47, 48). Of note, one member of the miR-27 family, known regulators of the lipid metabolism that were shown to be increased by HCV and to contribute to liver steatosis (49, 50), was also enhanced in HCV-infected cells (Fig. 1B). Aiming to identify additional virus-mediated alterations of miRNA patterns that may be linked to liver disease and hepatocarcinogenesis, we chose to focus our investigation on those miRNAs that were previously described to target genes associated with inflammation, fibrosis and cancer development, but have not yet been strongly linked to HCV-mediated hepatocyte injury (Table 2). By RT-qPCR we independently validated the expression of miR-146a-5p and miR-143-3p in chronically infected

hepatocyte-like cells along with that of miR-21-5p, which was assessed as a positive control. Similarly to RNA-Seq, a significant increase of these miRNAs was observed upon viral infection (Fig. 1C, p -value = 0.00094, 0.00094 and 0.013, respectively, two-tailed Mann-Whitney test). Interestingly, miR-146a-5p, which is a well known immunoregulatory miRNA (51) was described to be up-regulated in the serum and peripheral blood monocytes of HCV-infected patients (52, 53). Moreover, a recent piece of evidence points to an involvement of miR-146a in liver fibrosis in mice and humans independently of HCV (54). To better understand the link between HCV and miR-146a expression in the liver, we further studied the modulation of miR-146a-5p by HCV in primary human hepatocytes (PHH), a model that most closely reflects the *in vivo* situation. In PHH cultures that were subject to HCV infection, both miR-146a-5p and miR-21-5p were significantly up-regulated (Fig. 2A, p -value = 0.04 and 0.012, respectively, two-tailed Mann-Whitney test), confirming that the HCV-mediated enhancement of miR-146a-5p and miR-21-5p occurs in human hepatocytes. To gain insights into the clinical relevance of our findings, we studied miR-146a-5p expression in liver biopsies from chronically HCV-infected patients and HCV negative individuals (Table 1). Consistently with our *in vitro* data, up-regulated miR-146a-5p was observed in HCV-positive liver tissues (Fig. 2B, p -value = 0.0048, two-tailed Mann-Whitney test). Altogether, our findings suggest that miR-146a-5p may play a role in HCV-hepatocyte interactions.

miR-146a-5p regulates cell metabolism and contributes to pathogenesis of liver disease

To explore the functional relevance of miR-146a-5p up-regulation, we performed a genome-wide transcriptomic analysis of liver cells upon ectopic miR-146a-5p expression (Fig. 3). By RT-qPCR we assessed a consistent increase of miR-146a-5p upon miRNA transfection prior to genome-wide microarray analysis (data not shown). As compared to control cells, enhanced miR-146a-5p expression in Huh7.5.1 cells resulted in a significant deregulation of 69 genes, including 25 up-regulated and 44 down-regulated genes (Fig. 3A, p -value < 0.015, FCROS method). Interestingly, *interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)*, a known target of miR-146a-5p (51), was among the down-regulated genes. In line with a previously shown implication of miR-146a-5p and *IRAK1* in inflammatory responses in immune cells, our data suggest a role of miR-146a-5p in inflammation signaling in hepatocytes. Functional annotation using the Ingenuity Pathway

Analysis (IPA) systems biology tool further showed an involvement of miR-146a-5p in gene networks related to infectious diseases, inflammatory response, cell death and survival as well as cancer-associated processes (supplemental material Fig. S1). Moreover, when running all the significantly deregulated genes through Ingenuity's *Tox Function* prediction, the top toxicological functions that were most strongly associated with miR-146a-5p over-expression were related to liver disease including liver cirrhosis, fibrosis, steatosis and HCC development (Fig. 3B). Together with previous evidence linking miR-146a deregulation to liver fibrosis (54), this piece of data suggests that the modulation of miR-146a-5p may contribute to liver disease pathogenesis. To gain further insights into the role of miR-146a-5p in hepatocyte injury and progression of liver disease, we chose to extend our computational analysis of miR-146a-5p over-expressing cells by retrieving those gene sets that shared common regulation by miR-146a-5p through Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, (40)). In contrast to control mock-transfected Huh7.5.1 cells, miR-146a-5p over-expressing cells presented a gene profile underlying an enrichment of metabolic regulatory networks, such as protein synthesis and turn-over pathways, RNA transcription and translation, regulation of fatty acid metabolism and of mitochondrial oxidative phosphorylation (Fig. 3C, supplemental material Table S1). Interestingly, GSEA also suggested an involvement of miR-146a-5p in regulating infection of RNA viruses, such as HIV and influenza virus (supplemental material Table S1). Taken together with our evidence of a HCV-mediated up-regulation of miR-146a-5p, this piece of data suggests that in addition to contributing to liver disease pathogenesis, miR-146a-5p may fine-tune the metabolic activity of hepatocytes upon viral infection, and eventually act on the viral replication cycle itself.

miR-146a-5p promotes the production of infectious HCV particles without affecting viral entry or replication

To assess the potential impact of miR-146a-5p on the HCV life cycle, we performed a two step infection assay (27, 28) using a luciferase reporter virus (strain JcR2a), which allowed us to functionally assess the role of the miRNA during the early steps (part 1) - including entry, translation and replication - and the late steps of the HCV replication cycle (part 2) - including assembly and release of new virions (Fig. 4A). Control loss-of-function perturbation of essential HCV-host factor required either for viral entry or for translation/replication interactions using

siCD81 and anti-miR-122, respectively, resulted in a reduction of HCV infection in part 1 and consequently in part 2. This confirmed that reduced viral entry or viral translation/replication in the first part of the assay ultimately affected a reduced production of viral particles and thus reduced infectivity of the cell supernatants that were used to inoculate naive Huh7.5.1 cells in the second part of the assay (Figure 4B-C). Through gain-of-function genetic perturbation of HCV-miRNA interactions, we revealed that, in contrast to siCD81 and anti-miR-122, ectopic miR-146a-5p expression promoted late steps of the HCV replication cycle, likely by increasing HCV assembly/egress (part 2), while having only a marginal effect on HCV entry and translation/replication (part 1) (Fig. 4B-C). Taken together, these results uncover miR-146a-5p as a new pro-viral host factor for HCV infection that increases the production of infectious viral particles without affecting other steps of the viral life cycle. Collectively, our data indicate that the HCV-induced increase in miR-146a-5p expression both promotes virus infection, and contributes to liver disease progression.

Discussion

Progression of chronic hepatitis C to poor prognosis liver disease and HCC is a multifactorial process that involves persistent hepatic inflammation, progressive liver fibrogenesis, development of neoplastic clones and finally establishment of a carcinogenic tissue microenvironment (55). Being central players in both physiological and pathological conditions, miRNAs most likely contribute to HCV-driven liver disease (3, 8). Moreover, increasing evidence points to a role of miRNAs in fine-tuning HCV-hepatocyte interactions (4, 8). However, the lack of efficient and convenient model systems to investigate the biological circuits of virus-host interactions represents a major obstacle for the understanding of the mechanisms linking HCV infection, inflammation and carcinogenesis. By performing high-throughput small RNA-sequencing and computational analyses in a hepatocyte-like based model system, which enables persistent HCV infection (14-16) we identified 74 miRNAs significantly modulated by HCV that could have a putative involvement in virus-driven liver disease and HCC (Fig. 1, Table 2). Indeed, 21 out of these 74 miRNAs were already known for their implication in inflammation, fibrosis and cancer development. This subset of miRNAs included: miR-122, which is a key player in HCV infection and liver disease (reviewed in (4)); miR-21-5p, which has been consistently shown to be

implicated in HCV infection and liver disease (44-46) and miR-146a-5p, a well known immunoregulatory miRNA further described to be associated with liver fibrosis and HCC (53, 56-58). Moreover, members of the miR-27 family of miRNAs, which contribute to regulation of the lipid metabolism, have recently been reported to be increased by HCV and to contribute to liver steatosis (49, 50).

By pursuing our investigation in PHH and clinical liver tissues from HCV-infected patients (Fig. 2), we provided first evidence that HCV induces up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes. Interestingly, miR-146a has been previously associated with HCV infection as an increased expression of this miRNA was observed in the serum and peripheral blood monocytes of HCV-infected patients, suggesting a role of circulating miR-146-5p as a biomarker for hepatic injury (52, 53). In line with this, hepatitis B virus (HBV) has also been shown to increase miR-146a in human hepatoma cell lines and chronically HBV-infected patient-derived liver tissues (59). However, the cross-talk between miR-146a-5p and HCV and its relevance for hepatocyte injury has not yet been evidenced. Taking advantage of a well established functional assay to investigate virus-host interactions, we discovered that miR-146a-5p exerts a pro-viral effect in liver cells likely by modulating HCV assembly/egress, while having only a marginal effect on HCV entry and translation/replication (Fig. 4). In contrast to data reported with HepG2 cells where a high ectopic expression of miR-146a was shown to target *epidermal growth factor receptor (EGFR)* (60), which is a HCV entry co-factor in liver cells (26), ectopic expression of miR-146a-5p in our experimental conditions did not affect *EGFR* expression (data not shown) in line with the absent modulation of the early steps of HCV infection upon miR-146a-5p over-expression (Fig. 4). Collectively, our data uncover miR-146a-5p as a new pro-viral host factor for HCV infection and it would be interesting to further explore the underlying molecular mechanisms. By over-expressing miR-146a-5p in liver cells we observed its involvement in key metabolic pathways, including oxidative phosphorylation, proteasome pathway and fatty acid metabolism (Fig. 3C, supplemental material Table S1), which in turn were associated with HCV virion assembly (61-63). This piece of data suggests that by regulating liver cell metabolism, miR-146a-5p may be beneficial for HCV infection and potentially play a role in HCV-driven liver disease.

Beyond cell metabolism, our pathway enrichment analysis further suggests a pivotal role of miR-146a in regulating inflammation signaling in hepatocytes (Fig. 3, supplemental material

Table S1). This is consistent with recent evidence of a hepatocyte-specific inflammatory feedback circuit including hepatocyte nuclear factor 1a (HNF1a), SH2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), p65, miR-21 and miR-146a (54). In rat models of liver fibrosis, the increased expression of both miR-146a and miR-21 was shown to sustain repression of HNF1a in hepatocytes, thus enhancing hepatocellular inflammation and disease progression (54). This is also in line with previous studies showing up-regulation of miR-146a in the plasma of mice, which were subject to liver inflammation induced by cytidine-phosphate-guanosine (CpG) motif and lipopolysaccharide (LPS) (52). Interestingly, the same study highlighted enhanced miR-146a expression in mice with acetaminophen-induced liver injury characterized by little inflammation (52). Given its central role in liver cell homeostasis and signaling (Fig. 3), we propose that miR-146a-5p might serve as a molecular switch that fine-tunes stress signaling in hepatocytes, enabling modulation of metabolic activity in response to micro-environmental changes. Thus impairment of miR-146a regulation and signaling may participate to hepatocellular injury. This could also provide clues about the putative modulation of miR-146a expression during the progression of liver disease. While enhanced expression of this miRNA was observed in chronic HCV infection (Fig. 2) and fibrosis (54), its repression was associated with invasiveness of HCC tumors (53, 57) thus suggesting a tumor suppressor function for miR-146a. Further investigation will be necessary to better understand the molecular mechanisms of miR-146a-mediated liver disease pathogenesis and HCC development.

Taken together, our study indicates a novel involvement of miR-146a-5p in promoting HCV infection and liver disease progression, and contributes to a better understanding of HCV-induced liver disease pathogenesis ultimately providing novel potential therapeutic targets to prevent HCC in HCV-infected patients.

Funding information. This work was supported by the European Union (INTERREG-IV-Rhin Supérieur-FEDER-Hepato-Regio-Net 2012 to M.B.Z. and T.F.B. and FP7 HepaMab to T.F.B.), ANRS (2012/239 to M.B.Z. and T.F.B., 2013/108 to T.F.B), by ARC, Paris and Institut Hospitalo-Universitaire, Strasbourg (TheraHCC IHUARC IHU201301187 to T.F.B.), Inserm, and University of Strasbourg. This work has been published under the framework of the LABEX ANR-10-LABX-0028_HEPSYS and benefits from a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program. S.P. was supported by a fellowship from the French Ministry of Research. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Acknowledgments. We thank Dr. R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) for providing the plasmid for production of HCVcc, Dr. F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift of Huh7.5.1 cells, Dr. A. Patel (MRC Virology Unit, Glasgow, UK) for E2-specific mAb AP33 and Prof. P. Pessaux (Inserm U1110, Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatodigestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France) for providing liver resections for isolation of PHH. We acknowledge M. Oudot, S. Coassolo and A. Mawa (Inserm U1110, Strasbourg, France) as well as A. Weiss, Dr. L. Brino and Dr. D. Dembele (IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, Illkirch, France) for excellent technical assistance as well as helpful discussions regarding transfection protocols and computational analyses. We thank Dr. S. Pfeffer (IBMC, Strasbourg, France) for helpful discussions regarding miRNA expression analyses. The small RNA-Seq and microarray analyses as well as bioinformatics were performed at IGBMC Microarray and Sequencing Platform (Illkirch, France), member of the France Genomique program.

Author contribution. T.F.B and M.B.Z initiated the project. M.B.Z. supervised research. S.P., S.B., and M.B.Z. designed experiments. S.P., S.B., S.C.D. and C.T. performed experiments. S.P., S.B., T.Y., H.E.S., T.F.B. and M.B.Z. analyzed data. I.F. and M.H.H. provided essential reagents. S.P., S.B., H.E.S and I.F. designed figures and tables. S.P., S.B. and M.B.Z. wrote the paper. T.F.B edited the manuscript. The authors declare no conflict of interest.

References

1. **Chung RT, Baumert TF.** 2014. Curing chronic hepatitis C--the arc of a medical triumph. *N Engl J Med* **370**:1576-1578.
2. **van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H, Dufour JF, Lammert F, Duarte-Rojo A, Heathcote EJ, Manns MP, Kuske L, Zeuzem S, Hofmann WP, de Knegt RJ, Hansen BE, Janssen HL.** 2012. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA* **308**:2584-2593.
3. **Szabo G, Bala S.** 2013. MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**:542-552.
4. **Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB.** 2015. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol* **62**:448-457.
5. **Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P.** 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**:1577-1581.
6. **Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M.** 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* **27**:3300-3310.
7. **Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon SM.** 2013. Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:1881-1886.
8. **Shrivastava S, Mukherjee A, Ray RB.** 2013. Hepatitis C virus infection, microRNA and liver disease progression. *World J Hepatol* **5**:479-486.
9. **Gragani L, Piluso A, Fognani E, Zignego AL.** 2015. MicroRNA expression in hepatitis C virus-related malignancies: A brief review. *World J Gastroenterol* **21**:8562-8568.
10. **Fan HX, Tang H.** 2014. Complex interactions between microRNAs and hepatitis B/C viruses. *World J Gastroenterol* **20**:13477-13492.
11. **Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M.** 2008. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**:1223-1232.

12. **Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S.** 2009. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **49**:1098-1112.
13. **Steinmann E, Pietschmann T.** 2013. Cell culture systems for hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**:17-48.
14. **Sainz B, Jr., Chisari FV.** 2006. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* **80**:10253-10257.
15. **Bauhofer O, Ruggieri A, Schmid B, Schirmacher P, Bartenschlager R.** 2012. Persistence of HCV in quiescent hepatic cells under conditions of an interferon-induced antiviral response. *Gastroenterology* **143**:429-438 e428.
16. **Xiao F, Fofana I, Thumann C, Maily L, Alles R, Robinet E, Meyer N, Schaeffer M, Habersetzer F, Doffel M, Leyssen P, Neyts J, Zeisel MB, Baumert TF.** 2015. Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C. *Gut* **64**:483-494.
17. **Maily L, Xiao F, Lupberger J, Wilson GK, Aubert P, Duong FH, Calabrese D, Leboeuf C, Fofana I, Thumann C, Bandiera S, Lutgehetmann M, Volz T, Davis C, Harris HJ, Mee CJ, Girardi E, Chane-Woon-Ming B, Ericsson M, Fletcher N, Bartenschlager R, Pessaux P, Vercauteren K, Meuleman P, Villa P, Kaderali L, Pfeffer S, Heim MH, Neunlist M, Zeisel MB, Dandri M, McKeating JA, Robinet E, Baumert TF.** 2015. Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol* **33**:549-554.
18. **Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV.** 2005. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9294-9299.
19. **Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, Thumann C, Harris HJ, Schnober EK, Mee C, Soulier E, Royer C, Lambotin M, Grunert F, Dao Thi VL, Dreux M, Cosset FL, McKeating JA, Schuster C, Baumert TF.** 2010. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**:1144-1157.

20. **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**:791-796.
21. **Merz A, Long G, Hiet MS, Brugger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2011. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* **286**:3018-3032.
22. **Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet MS, Longerich T, Diehl S, Ramirez F, Balla T, Rohr K, Kaul A, Buhler S, Pepperkok R, Lengauer T, Albrecht M, Eils R, Schirmacher P, Lohmann V, Bartenschlager R.** 2011. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* **9**:32-45.
23. **Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM.** 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623-626.
24. **Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glauben S, Xiao F, Fafi-Kremer S, Soulier E, Royer C, Thumann C, Mee CJ, McKeating JA, Dragic T, Pessaux P, Stoll-Keller F, Schuster C, Thompson J, Baumert TF.** 2010. Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* **139**:953-964, 964 e951-954.
25. **Da Costa D, Turek M, Felmlee DJ, Girardi E, Pfeffer S, Long G, Bartenschlager R, Zeisel MB, Baumert TF.** 2012. Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J Virol* **86**:11919-11925.
26. **Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doeffoel M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF.** 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**:589-595.

27. **Li Q, Brass AL, Ng A, Hu Z, Xavier RJ, Liang TJ, Elledge SJ.** 2009. A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16410-16415.
28. **Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, Hildt E, Luo G, McLauchlan J, Baumert TF, Schuster C.** 2010. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**:43-53.
29. **Tuddenham L, Jung JS, Chane-Woon-Ming B, Dolken L, Pfeffer S.** 2012. Small RNA deep sequencing identifies microRNAs and other small noncoding RNAs from human herpesvirus 6B. *J Virol* **86**:1638-1649.
30. **Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailovic A, Holoch D, Lin C, Pena JT, Nusbaum JD, Morozov P, Ludwig J, Ojo T, Luo S, Schroth G, Tuschl T.** 2011. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA* **17**:1697-1712.
31. **Sorefan K, Pais H, Hall AE, Kozomara A, Griffiths-Jones S, Moulton V, Dalmay T.** 2012. Reducing ligation bias of small RNAs in libraries for next generation sequencing. *Silence* **3**:4.
32. **Buck AH, Perot J, Chisholm MA, Kumar DS, Tuddenham L, Cognat V, Marcinowski L, Dolken L, Pfeffer S.** 2010. Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *RNA* **16**:307-315.
33. **Griffiths-Jones S.** 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* **32**:D109-111.
34. **Schmittgen TD, Livak KJ.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**:1101-1108.
35. **Adamo A, Atashpaz S, Germain PL, Zanella M, D'Agostino G, Albertin V, Chenoweth J, Micale L, Fusco C, Unger C, Augello B, Palumbo O, Hamilton B, Carella M, Donti E, Pruneri G, Selicorni A, Biamino E, Prontera P, McKay R, Merla G, Testa G.** 2015. 7q11.23 dosage-dependent dysregulation in human pluripotent stem cells affects transcriptional programs in disease-relevant lineages. *Nat Genet* **47**:132-141.
36. **Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL.** 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**:R25.

37. **Chen CJ, Servant N, Toedling J, Sarazin A, Marchais A, Duvernois-Berthet E, Cognat V, Colot V, Voinnet O, Heard E, Ciaudo C, Barillot E.** 2012. ncPRO-seq: a tool for annotation and profiling of ncRNAs in sRNA-seq data. *Bioinformatics* **28**:3147-3149.
38. **Dembele D, Kastner P.** 2014. Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics* **15**:14.
39. **Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP.** 2011. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* **27**:1739-1740.
40. **Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP.** 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:15545-15550.
41. **Lu TP, Lee CY, Tsai MH, Chiu YC, Hsiao CK, Lai LC, Chuang EY.** 2012. miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PLoS One* **7**:e42390.
42. **Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R.** 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7408-7413.
43. **Raychaudhuri S, Fontanes V, Barat B, Dasgupta A.** 2009. Activation of ribosomal RNA transcription by hepatitis C virus involves upstream binding factor phosphorylation via induction of cyclin D1. *Cancer Res* **69**:2057-2064.
44. **Chen Y, Chen J, Wang H, Shi J, Wu K, Liu S, Liu Y, Wu J.** 2013. HCV-induced miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS Pathog* **9**:e1003248.
45. **Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD.** 2008. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* **14**:419-427.
46. **Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, Christensen RN, Schmidt WN, McCaffrey AP.** 2010. Correlation between microRNA

- expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab Invest* **90**:1727-1736.
47. **Meng F, Henson R, Wehbe-Janeck H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T.** 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **133**:647-658.
48. **Bao L, Yan Y, Xu C, Ji W, Shen S, Xu G, Zeng Y, Sun B, Qian H, Chen L, Wu M, Su C, Chen J.** 2013. MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways. *Cancer Lett* **337**:226-236.
49. **Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S.** 2013. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol* **87**:5270-5286.
50. **Singaravelu R, Chen R, Lyn RK, Jones DM, O'Hara S, Rouleau Y, Cheng J, Srinivasan P, Nasheri N, Russell RS, Tyrrell DL, Pezacki JP.** 2014. Hepatitis C virus induced up-regulation of microRNA-27: a novel mechanism for hepatic steatosis. *Hepatology* **59**:98-108.
51. **Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D.** 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12481-12486.
52. **Bala S, Tilahun Y, Taha O, Alao H, Kodys K, Catalano D, Szabo G.** 2012. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. *J Transl Med* **10**:151.
53. **Zhang Z, Zhang Y, Sun XX, Ma X, Chen ZN.** 2015. microRNA-146a inhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* **14**:5.
54. **Qian H, Deng X, Huang ZW, Wei J, Ding CH, Feng RX, Zeng X, Chen YX, Ding J, Qiu L, Hu ZL, Zhang X, Wang HY, Zhang JP, Xie WF.** 2015. An HNF1alpha-regulated feedback circuit modulates hepatic fibrogenesis via the crosstalk between hepatocytes and hepatic stellate cells. *Cell Res* **25**:930-945.

55. **Hoshida Y, Fuchs BC, Bardeesy N, Baumert TF, Chung RT.** 2014. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **61**:S79-90.
56. **Zhu K, Pan Q, Zhang X, Kong LQ, Fan J, Dai Z, Wang L, Yang XR, Hu J, Wan JL, Zhao YM, Tao ZH, Chai ZT, Zeng HY, Tang ZY, Sun HC, Zhou J.** 2013. MiR-146a enhances angiogenic activity of endothelial cells in hepatocellular carcinoma by promoting PDGFRA expression. *Carcinogenesis* **34**:2071-2079.
57. **Sun X, Zhang J, Hou Z, Han Q, Zhang C, Tian Z.** 2015. miR-146a is directly regulated by STAT3 in human hepatocellular carcinoma cells and involved in anti-tumor immune suppression. *Cell Cycle* **14**:243-252.
58. **Peng Q, Li S, Lao X, Chen Z, Li R, Deng Y, Qin X.** 2014. The association of common functional polymorphisms in mir-146a and mir-196a2 and hepatocellular carcinoma risk: evidence from a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **93**:e252.
59. **Li JF, Dai XP, Zhang W, Sun SH, Zeng Y, Zhao GY, Kou ZH, Guo Y, Yu H, Du LY, Jiang SB, Zhou YS.** 2015. Upregulation of microRNA-146a by hepatitis B virus X protein contributes to hepatitis development by downregulating complement factor H. *MBio* **6**.
60. **Huang S, He R, Rong M, Dang Y, Chen G.** 2014. Synergistic effect of MiR-146a mimic and cetuximab on hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res Int* **2014**:384121.
61. **Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T.** 2013. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog* **9**:e1003589.
62. **Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, Ohishi W, Hyogo H, Nomura S, Chayama K.** 2005. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig Dis Sci* **50**:1361-1371.
63. **Syed GH, Amako Y, Siddiqui A.** 2010. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **21**:33-40.

Figure legends

Figure 1. Persistent HCV infection modulates host cell miRNA expression in hepatocyte-like Huh7.5.1^{diff} cells. Huh7.5.1 cells were differentiated into hepatocyte-like cells using 1% DMSO (14-16), persistently infected using HCVcc (Jc1 or Jc1E2^{FLAG}) and subject to molecular analyses at 7 days post-infection (dpi). (A) Immuno-detection of HCV E2 protein in HCV-infected hepatocyte-like cells (HCV) and non-infected controls (Control). Nuclei are counterstained with DAPI. Representative overlay images are shown. Scale bar, 50 μ m. (B) Modulation of miRNA expression by HCV infection. Small RNAs (19-24 nt) from HCV Jc1E2^{FLAG}-infected cells (HCV) or non-infected controls (Control) were subject to RNA-Seq (material and methods). The heatmap shows the 74 miRNAs with significant modulation upon HCV infection as compared to control cells. The two columns represent average miRNA expression from three HCV (left) and three control (right) samples. High relative miRNA expression is indicated by red shades, low expression by green shades. (C) HCV increases the expression of miR-21-5p, miR-146a-5p and miR-143-3p. miRNA expression was analyzed by RT-qPCR in total RNA extracts from HCV-infected cells as compared to non-infected controls. Data are shown as mean percentage \pm SEM from two independent experiments, $n = 8$. * $p < 0.05$ two-tailed Mann-Whitney test.

Figure 2. HCV infection increases miR-146a-5p expression in hepatocytes and liver tissues. (A) HCV increases expression of miR-21-5p and miR-146a-5p in PHH. Expression of miR-21-5p and miR-146a-5p was analyzed by RT-qPCR in total RNA extracts from HCV Jc1-infected PHH (HCV) at 3 dpi as compared to non-infected controls (Control). Data are shown as mean percentage \pm SEM from four independent experiments, $n = 12$. (B) miR-146a-5p expression is enhanced in liver tissues from HCV-infected patients. Liver tissues from 6 HCV-infected patients (HCV) and 9 uninfected subjects (Control) were analyzed for miR-146a-5p expression by RT-qPCR. Median miRNA expression is shown as black lines. In both (A) and (B), * $p < 0.05$ two-tailed Mann-Whitney test.

Figure 3. miR-146a modulates the expression of genes related to liver disease. (A) Modulation of mRNA expression by miR-146a-5p. Huh7.5.1 cells were reverse transfected with miR-146a-5p

or control miRNA mimic (5 nM) two days prior to total RNA extraction and analysis of mRNA expression by microarray (material and methods). Gene expression profiles are represented as a volcano plot where the x-axis represents the log₂ of the fold change between miR-146a-transfected cells and control cells, and the y-axis represents the -log₁₀ of the p-value obtained from the f-cross test comparing miR-146a-5p-transfected cells to control cells. Red dots represent mRNA considered statistically significant ($p < 0.015$, FCROS method). (B) Functional network analysis of the genes with modified expression after miR-146a-5p over-expression in Huh7.5.1 cells. Ingenuity Pathway Analysis (IPA)-toxicity algorithm was used to assess the enrichment of the deregulated genes in specific toxicity pathways with altered expression in human disease. The *p*-value indicates the significance of the enrichment of the input genes for each *Toxfunction* pathway. (C) Co-regulated gene networks in miR-146a-5p over-expressing cells. Modulation of molecular pathways by miR-146a-5p was determined in KEGG database using GSEA (40). Significantly enriched gene networks involved in immune responses (in blue), cell cycle and DNA repair (in black) as well as cell metabolism (in grey) are shown. Gene sets down-regulated by miR-146a-5p are depicted as open circles while gene sets up-regulated by the miRNA are represented as black circles. The thickness of the connecting lines is proportional to the degree of overlapping genes between two different gene sets.

Figure 4. miR-146a-5p promotes HCV infection by enhancing production of infectious viral particles. (A) Schematic outline of the two-step infection assay to functionally test the role of miR-146a-5p during early and late steps of the HCV replication cycle. Huh7.5.1 were transfected with miR-146a-5p mimic, siCD81, anti-miR-122 or control prior to infection with HCV Jc2a (part 1). Supernatants from cells in part 1 were then used to inoculate naïve Huh7.5.1 cells (part 2) (material and methods). Cells from part 1 and part 2 were lysed at the end of each infection step (2 and 3 dpi, respectively) to determine Renilla luciferase activity (22, 25). (B-C) Modulation of HCV infection in part 1 (B) or in part 2 (C) upon transfection of siCD81, anti-miR-122, miR-146a-5p mimic or control non-targeting siRNA. Data are shown as mean \pm SEM relative light units (RLU) normalized to the total protein amount in each lysate from one experiment, $n = 4$.

Table 1. Characteristics of the patients and patient-derived liver biopsies included in the study

Biopsy ID	HCV genotype	Viral Load (IU/mL)	Diagnosis	Metavir	Age at biopsy (years)	Gender
C270	1b	1.75E+06	Chronic HCV infection	A3/F3	76	F
C300	3a	1.95E+06	Chronic HCV infection and ASH	A3/F4	55	M
C304	1a	1.55E+06	Chronic HCV infection + HIV infection +ASH	A2/F3	38	F
C238	1b	ND	Chronic HCV infection	A1/F1	54	F
C257	1a	1.08E+05	Chronic HCV infection	A1/F1	30	M
B823	4	3.16E+06	Chronic HCV infection	A1/F1	50	M
C262	N/A	N/A	ASH, cirrhosis	N/A	59	F
C344	N/A	N/A	Steatosis 5%, siderosis grade I	N/A	43	M
C332	N/A	N/A	NASH	N/A	49	F
C330	N/A	N/A	Minimal steatosis	N/A	47	M
C305	N/A	N/A	Minimal unspecific hepatitis	N/A	44	M
C298	N/A	N/A	Steatohepatitis (NASH)	N/A	50	M
C237	N/A	N/A	Steatosis, ASH, siderosis	N/A	51	M
C187	N/A	N/A	Normal liver parenchymal	N/A	31	F
C145	N/A	N/A	Normal liver parenchymal	N/A	43	F

Résultats - Partie 2

ASH, alcoholic steatohepatitis; F, Female; M, Male; HCV, HCV-infected patient; HIV, human immunodeficiency virus; N/A, non applicable; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; ND, no determined.

Table 2. HCV-regulated miRNAs with a known involvement in inflammation, fibrosis and cancer^a.

miRNA ID	MiRNA Target (gene symbol)	Molecular function		
		Inflammation	Fibrosis	Cancer
miR-122-5p	IGF1R	x	x	x
	SRF	x	x	x
	CCNG1			x
	SLC7A1			x
	BCL2L2	x		
	ADAM10	x	x	x
	PRKRA			
	WNT1	x	x	x
miR-210-3p	FGFRL1			x
	RAD52		x	x
	EFNA3			x
	BDNF	x	x	x
	PTPN1	x		
	ISCU			x
	E2F3			x
	MNT	x	x	x
miR-338-5p	LRP1	x		x
miR-483-3p	SMAD4	x	x	x
	BBC3			x
	SRF	x	x	x
	MAPK3			x
miR-574-5p	FOXN3			x
miR-885-5p	CDK2		x	x
	MCM5			x

Résultats - Partie 2

miR-1	HCN4	x		
	FOXP1			x
	HCN2	x	x	
	PTMA			x
	MET	x	x	x
	XPO6			x
	TAGLN2	x	x	x
	LASP1	x		x
	KCNE1			x
	PNP			x
	PIM1	x		x
	PAX3			x
	TWF1		x	x
	TWF2			
	FN1	x		x
	NOTCH3	x	x	
	FABP3		x	x
miR-10a-5p	HOXA1	x		x
	USF2		x	x
	MAP3K7	x		x
	BTRC			
	EPHA4	x		x
miR-127-3p	PRDM1	x		x
	BCL6	x		x
miR-132-3p	CDKN1A	x	x	x
	ARHGAP32			
	RB1	x		x
miR-133a-3p	HBEGF	x	x	x
	HCN2	x	x	
	KCNQ1	x		x

Résultats - Partie 2

	FSCN1			X
	KCNH2			X
	TAGLN2	X	X	X
	LASP1	X		X
	PNP			X
miR-133b	KCNH2			X
	FSCN1			X
	FAIM			X
	EGFR	X	X	X
	FGFR1	X	X	X
	HCN4	X		
miR-143-3p	KRAS	X	X	X
	MYO6			X
	DNMT3A	X	X	X
	FNDC3B			X
	MAPK7			X
	FSCN1			X
	SERPINE1	X	X	X
	MACC1	X		X
	JAG1	X	X	X
	AKT1	X	X	X
miR-146a-5p	CXCR4	X	X	X
	TLR2	X	X	X
	TRAF6	X		X
	IRAK1	X		X
	BRCA1	X		X
	NFKB1	X		X
	EGFR	X	X	X
	CD40LG	X	X	X
	SMAD4	X	X	X

Résultats - Partie 2

	HNF1	x	x	x
	SHP1	x	x	x
	TLR4	x	x	x
miR-150-5p	MYB	x	x	x
	EGR2	x		x
	MUC4	x	x	x
	ZEB1	x	x	x
miR-206	MET	x	x	x
	NOTCH3	x	x	
	ESR1	x		x
	PAX3			x
miR-212-3p	MECP2	x	x	x
	PEA15			x
	PTCH1		x	x
	RB1	x		x
miR-21-5p	RASGRP1			x
	BCL2	x	x	x
	TIMP3	x	x	x
	SOX5			x
	MTAP	x	x	x
	RECK		x	x
	TGFBR2	x	x	x
	PTEN	x	x	x
	E2F1	x	x	x
	LRRFIP1	x		x
	TPM1			x
	NFIB			x
	APAF1	x		x
	BTG2			x
	PDCD4	x	x	x

Résultats - Partie 2

	RHOB	x		x
	SERPINB5		x	x
	BMPR2	x	x	x
	DAXX	x		x
	TP63			x
	MSH2	x		x
	MSH6			x
	ISCU			x
	EIF4A2			x
	ANKRD46			x
	CDK2AP1			x
	DUSP10			x
	PPARA	x	x	x
	ANP32A			x
	SMARCA4			x
	FASLG	x	x	x
miR-494-3p	PTEN	x	x	x
	CDK6	x		x
	BCL2L11			x
miR-584-5p	ROCK1	x	x	x
miR-663a	JUNB	x		x
	JUND		x	x

^aThe targets of miRNAs differentially regulated by HCV infection in hepatocyte-like Huh7.5.1 cells at 7 days post-infection were retrieved using the miRsystem tool (Material and Methods). The involvement of these target genes into pathways related to inflammation, fibrosis and cancer was assessed through miRsystem and a systematic screen of the available literature using PubMed. x: involvement of miRNA target into the indicated process.

Figure 1

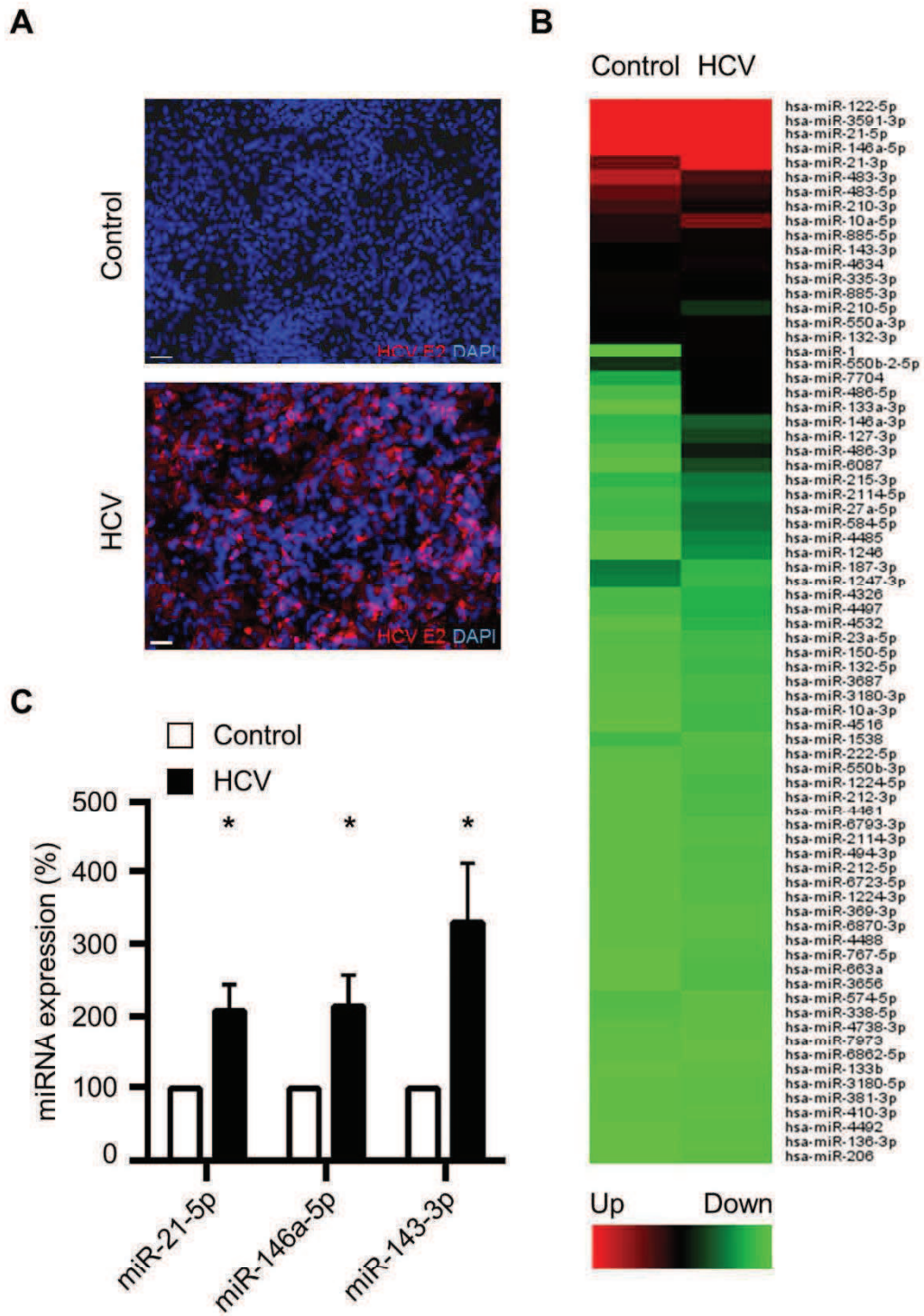
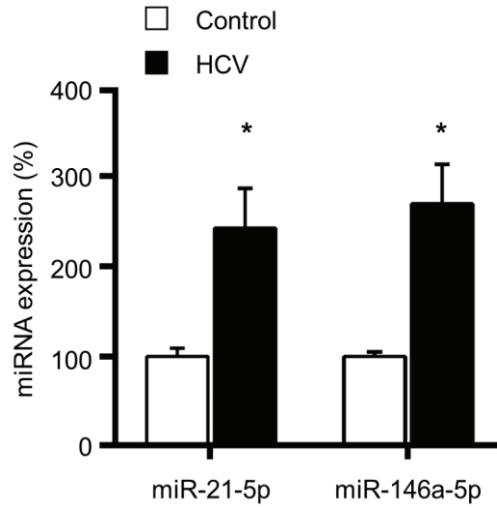


Figure 2

A



B

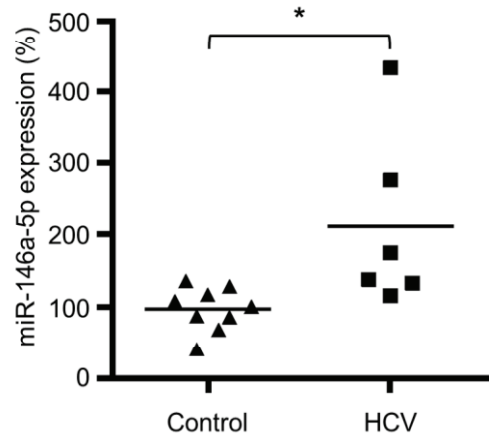


Figure 3

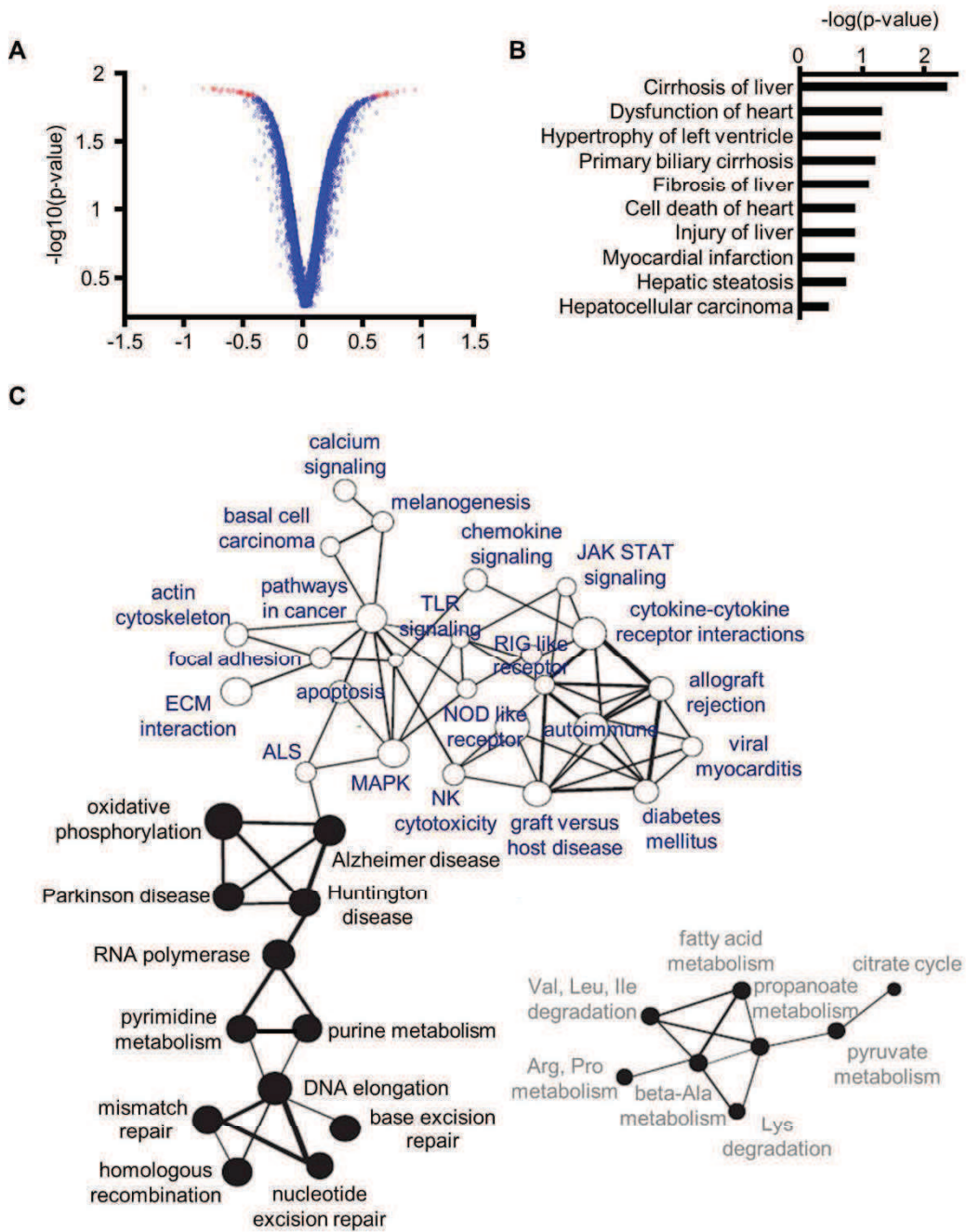
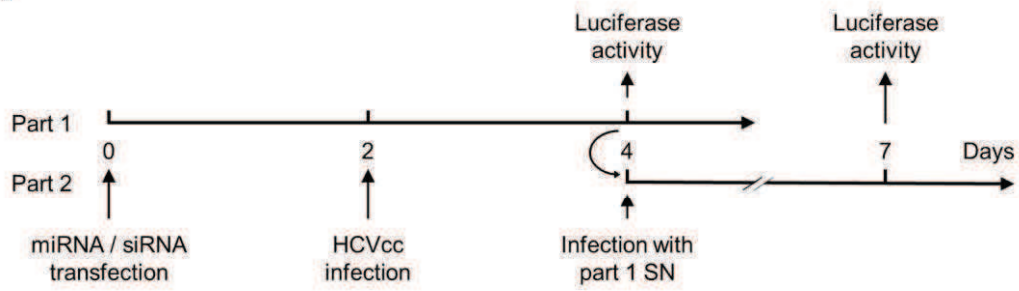
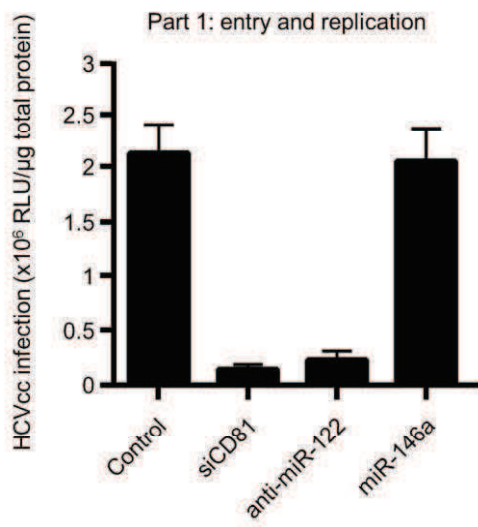


Figure 4

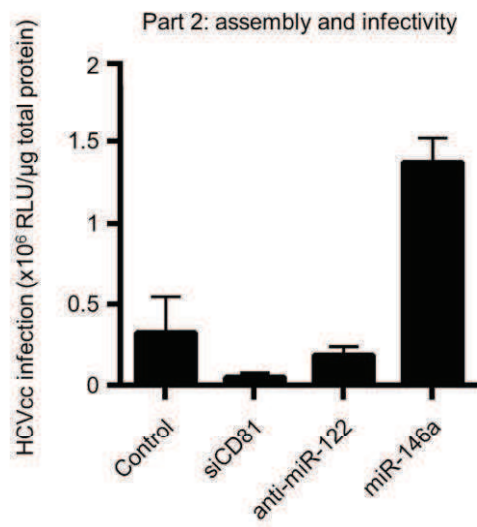
A



B



C



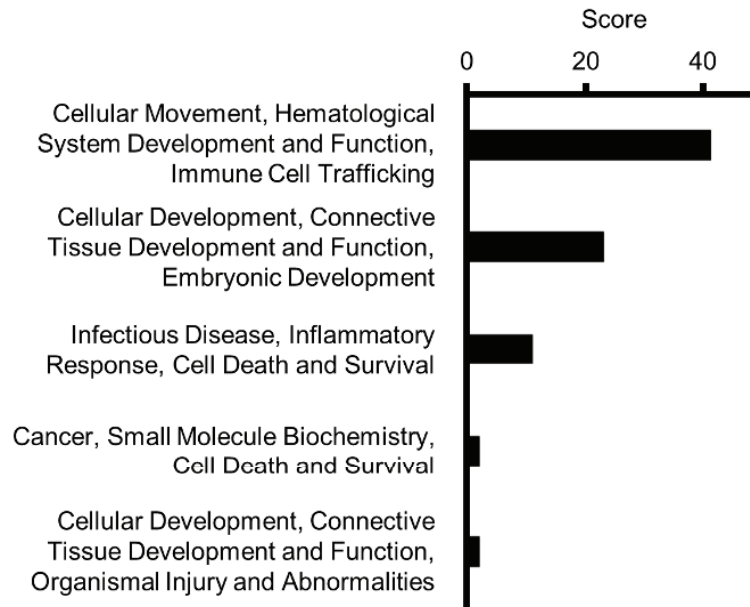
**HCV-induced up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes
promotes viral infection and liver disease pathogenesis**

Sophie Pernot, Simonetta Bandiera, Hussein El Saghire,
Sarah C. Durand, Tao Ye, Christine Thumann, Isabel Fofana,
Markus H. Heim, Thomas F. Baumert, Mirjam B. Zeisel

Supplemental material

SUPPLEMENTAL FIGURE

FIGURE S1. IPA network analysis of miR-146a-5p over-expressing cells



Top five networks identified by IPA analysis of the genes differentially regulated in miR-146a-5p over-expressing Huh7.5.1 cells as compared to control cells. The significance score ($-\log_{10}(\text{p-value})$) represents the probability that the genes regulated by miR-146a-5p correspond to the genes within one specific network by random chance.

SUPPLEMENTAL TABLE

TABLE S1. Gene sets modulated by over-expression of miR-146a-5p in Huh7.5.1 cells (Gene Set Enrichment Analysis)^a.

Gene set database	Enriched in	Gene set	NES	p-value	FDR
Biocarta (Curated pathway database)	miR-146a-5p over-expressing cells	PROTEASOME PATHWAY	2.21	0.000	0.001
		ATRBRCA PATHWAY	2.02	0.000	0.008
		EIF PATHWAY	1.68	0.019	0.155
	Control cells	INFLAMMATION PATHWAY	-2.12	0.000	0.002
		CASPASE PATHWAY	-1.80	0.004	0.041
		NKT PATHWAY	-1.78	0.002	0.043
		IL17 PATHWAY	-1.81	0.000	0.044
		PML PATHWAY	-1.83	0.005	0.044
		CYTOKINE PATHWAY	-1.88	0.000	0.047
		STEM PATHWAY	-1.84	0.000	0.056
		NFKB PATHWAY	-1.69	0.017	0.105
		IL7 PATHWAY	-1.62	0.025	0.176
		ERYTH PATHWAY	-1.60	0.022	0.186
HIVNEF PATHWAY	-1.57	0.018	0.211		
CTLA4 PATHWAY	-1.55	0.037	0.232		
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	miR-146a-5p over-expressing cells	SPLICEOSOME	2.75	0.000	0.000
		RIBOSOME	2.64	0.000	0.000
		AMINOACYL TRNA BIOSYNTHESIS	2.45	0.000	0.000
		PROPANOATE METABOLISM	2.36	0.000	0.000

Résultats - Partie 2

(Curated pathway database)	RNA DEGRADATION	2.33	0.000	0.000
	VALINE LEUCINE AND ISOLEUCINE DEGRADATION	2.33	0.000	0.000
	OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	2.27	0.000	0.000
	ARGININE AND PROLINE METABOLISM	2.25	0.000	0.000
	RNA POLYMERASE	2.24	0.000	0.000
	PROTEIN EXPORT	2.22	0.000	0.000
	PYRIMIDINE METABOLISM	2.15	0.000	0.001
	NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR	2.04	0.000	0.002
	BASAL TRANSCRIPTION FACTORS	2.01	0.000	0.002
	HISTIDINE METABOLISM	1.96	0.000	0.002
	ONE CARBON POOL BY FOLATE	1.94	0.002	0.003
	DNA REPLICATION	1.93	0.000	0.003
	FATTY ACID METABOLISM	1.92	0.000	0.003
	PARKINSONS DISEASE	1.89	0.000	0.004
	GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL GPI ANCHOR BIOSYNTHESIS	1.86	0.008	0.005
Control cells	STEROID BIOSYNTHESIS	1.81	0.009	0.007
	OLFACTORY TRANSDUCTION	-2.36	0.000	0.000
	CYTOKINE CYTOKINE RECEPTOR INTERACTION	-2.17	0.000	0.000
	ECM RECEPTOR INTERACTION	-2.11	0.000	0.001
	HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	-2.10	0.000	0.000
	TYPE I DIABETES MELLITUS	-2.10	0.000	0.000
	ALLOGRAFT REJECTION	-2.06	0.000	0.001

		GRAFT VERSUS HOST DISEASE	-2.04	0.000	0.001
		NEUROACTIVE LIGAND RECEPTOR INTERACTION	-2.03	0.000	0.001
		ARRHYTHMOGENIC RIGHT VENTRICULAR CARDIOMYOPATHY ARVC	-1.86	0.000	0.006
		CELL ADHESION MOLECULES CAMS	-1.83	0.000	0.006
		FOCAL ADHESION	-1.82	0.000	0.007
		VIRAL MYOCARDITIS	-1.78	0.002	0.011
		NATURAL KILLER CELL MEDIATED CYTOTOXICITY	-1.78	0.000	0.010
		ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION	-1.74	0.000	0.015
		DILATED CARDIOMYOPATHY	-1.73	0.000	0.015
		AUTOIMMUNE THYROID DISEASE	-1.73	0.000	0.014
		HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY HCM	-1.69	0.000	0.021
		INTESTINAL IMMUNE NETWORK FOR IGA PRODUCTION	-1.68	0.006	0.024
		BASAL CELL CARCINOMA	-1.67	0.006	0.025
		ASTHMA	-1.67	0.015	0.024
Reactome	miR-146a-5p	TRANSCRIPTION	2.96	0.000	0.000
(Curated	over-expressing	TRANSLATION	2.85	0.000	0.000
pathway	cells	LATE PHASE OF HIV LIFE CYCLE	2.83	0.000	0.000
database)		INFLUENZA LIFE CYCLE	2.80	0.000	0.000
		RNA POL II PRE TRANSCRIPTION EVENTS	2.78	0.000	0.000
		METABOLISM OF RNA	2.77	0.000	0.000
		MITOTIC M M G1 PHASES	2.77	0.000	0.000

	RNA POL II TRANSCRIPTION	2.72	0.000	0.000
	RESPIRATORY ELECTRON TRANSPORT ATP SYNTHESIS BY CHEMIOSMOTIC COUPLING AND HEAT PRODUCTION BY UNCOUPLING PROTEINS	2.71	0.000	0.000
	PROCESSING OF CAPPED INTRON CONTAINING PRE MRNA	2.71	0.000	0.000
	RESPIRATORY ELECTRON TRANSPORT	2.70	0.000	0.000
	DNA REPLICATION	2.68	0.000	0.000
	RNA POL I RNA POL III AND MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION	2.68	0.000	0.000
	HIV LIFE CYCLE	2.67	0.000	0.000
	RNA POL II TRANSCRIPTION PRE INITIATION AND PROMOTER OPENING	2.66	0.000	0.000
	INFLUENZA VIRAL RNA TRANSCRIPTION AND REPLICATION	2.65	0.000	0.000
	3 UTR MEDIATED TRANSLATIONAL REGULATION	2.65	0.000	0.000
	MRNA PROCESSING	2.65	0.000	0.000
	TCA CYCLE AND RESPIRATORY ELECTRON TRANSPORT	2.65	0.000	0.000
	CELL CYCLE	2.64	0.000	0.000
Control cells	OLFACTORY SIGNALING PATHWAY	-2.34	0.000	0.000
	GPCR LIGAND BINDING	-2.23	0.000	0.000
	CLASS A1 RHODOPSIN LIKE RECEPTORS	-2.22	0.000	0.000
	COLLAGEN FORMATION	-2.21	0.000	0.000
	NCAM1 INTERACTIONS	-2.21	0.000	0.000

CHEMOKINE RECEPTORS BIND CHEMOKINES	-2.15	0.000	0.000
EXTRACELLULAR MATRIX ORGANIZATION	-2.16	0.000	0.000
PEPTIDE LIGAND BINDING RECEPTORS	-2.18	0.000	0.000
POTASSIUM CHANNELS	-2.11	0.000	0.000
NCAM SIGNALING FOR NEURITE OUT GROWTH	-2.05	0.000	0.001
G ALPHA I SIGNALLING EVENTS	-1.97	0.000	0.003
VOLTAGE GATED POTASSIUM CHANNELS	-1.94	0.002	0.005
NEURONAL SYSTEM	-1.89	0.000	0.009
INTERFERON GAMMA SIGNALING	-1.88	0.000	0.010
INTERFERON ALPHA BETA SIGNALING	-1.86	0.002	0.012
ANTIGEN PRESENTATION FOLDING ASSEMBLY AND PEPTIDE LOADING OF CLASS I MHC	-1.85	0.002	0.013
CLASS B 2 SECRETIN FAMILY RECEPTORS	-1.84	0.000	0.013
A TETRASACCHARIDE LINKER SEQUENCE IS REQUIRED FOR GAG SYNTHESIS	-1.81	0.003	0.018
AXON GUIDANCE	-1.80	0.000	0.018
CHONDROITIN SULFATE BIOSYNTHESIS	-1.81	0.002	0.019

^aGene sets with FDR <0.25 or top 20 are shown. NES: normalized enrichment score, FDR: false discovery rate.

Discussion et perspectives

Malgré de nombreuses études depuis plus de 20 ans, le HCV et son cycle viral restent peu connus. Nous avons durant ces trois années, initié un projet de grande envergure qui permettra de comprendre et de cartographier d'une façon générale les interactions entre le HCV et les miRs exprimés par la cellule hôte. Nous avons choisi d'explorer le rôle des miRs dans le cycle répliatif du virus, mais également dans l'évolution de la cellule suite à son infection par le HCV. Ainsi, les miRs cellulaires peuvent avoir un rôle direct dans la réplication virale en la favorisant, tel que miR-122 (Jopling *et al.*, 2005), ou en l'inhibant, tel que les miRs de la famille des let-7 (Cheng *et al.*, 2013). D'autre part, des miRs cellulaires modulés lors de l'infection par le HCV peuvent favoriser la propagation du virus, en inhibant l'immunité innée de la cellule, ou encore contribuer à la pathogenèse de l'hépatite C en induisant le développement de lésions au sein du tissu hépatique (Chen *et al.*, 2013).

1. Rôle des miRs dans le cycle viral du HCV

Un grand nombre de pathogènes, dont les virus, ont au cours du temps développé de nombreux mécanismes leur permettant de conserver une infection efficace. Etant donné le rôle majeur des miRs dans la régulation de l'expression génique et leur implication dans de nombreux processus biologiques, l'hypothèse selon laquelle les miRs auraient un rôle essentiel dans l'interaction entre l'hôte et le pathogène semble particulièrement intéressante à approfondir. En effet, les miRs ont été décrits comme ayant un rôle dans l'immunité en réponse à l'infection par des pathogènes chez la plante ou le vertébré (Eulalio *et al.*, 2012; Singaravelu *et al.*, 2015). Dans la relation entre les miRs de l'hôte et les virus, le cas du HCV est particulièrement intéressant. En effet, le HCV a une interaction très particulière avec les miRs de sa cellule cible, notamment avec miR-122 (Jopling *et al.*, 2005b). D'autre part, il utilise la modulation de l'expression des cibles du miR-21 afin d'échapper à l'immunité innée de la cellule ce qui en fait un cas d'étude particulièrement intéressant (Chen *et al.*, 2013). La mise au point de nouvelles technologies, incluant les HCVcc exprimant un gène rapporteur, nous a permis d'étudier de façon systématique l'effet de la sur-expression des miRs humains sur l'efficacité de l'infection virale. Cette étude nous permet de cartographier les miRs qui ont un rôle proviral ou antiviral, ainsi que les mécanismes découlant de cette interaction, incluant les mécanismes moléculaires par lesquels le HCV exploite les facteurs de l'hôte pour favoriser sa propre propagation.

Nous avons utilisé un protocole en deux parties permettant l'étude des phases précoces et des phases tardives du cycle viral. Des études utilisant un protocole similaire avaient déjà été décrites auparavant dans la littérature (Li *et al.*, 2009, 2014; Poenisch *et al.*, 2015) mais, à ce jour, aucun criblage fonctionnel évaluant le rôle des miRs cellulaires dans le cycle répliatif du HCV n'a été publié. En effet, les deux équipes citées précédemment ont réalisé des criblages fonctionnels de perte de fonction en utilisant l'ARN interférence. Ainsi, l'équipe du Dr Liang a analysé 205 gènes (identifiés suite à un criblage de l'intégralité des gènes du génome humain) et leur implication dans le cycle viral afin d'identifier de nouveaux facteurs de l'hôte impliqué dans le cycle viral. Sur les 205 cibles testées, 159 ont montré un effet significatif sur le cycle viral. Cette équipe a utilisé un schéma d'expériences spécifique à chacune des étapes du cycle viral, afin d'y identifier les facteurs de l'hôte important. Ainsi ils ont utilisé des HCVpp, réalisé des expériences de fixation d'HCVcc, ainsi que d'infection en un seul cycle utilisant des HCVcc pour déterminer l'effet de l'interférence des 205 gènes sur l'entrée. Les étapes de traduction et de répliation ont été dans un premier temps analysées à l'aide d'une infection avec des HCVcc en une étape. La traduction a également été analysée grâce à l'utilisation d'un reporteur dépendant de l'IRES du HCV, et des expériences utilisant un réplicon subgénomique dans l'analyse de l'étape de répliation. Enfin, l'assemblage et la libération des virions ont été analysés grâce à un protocole d'infection des HCVcc en deux étapes. A l'aide de ce schéma expérimental complet, ils ont identifié 6 protéines impliquées dans l'entrée dont une plus spécifiquement dans l'attachement, 12 autres protéines impliquées dans l'entrée selon des mécanismes en commun au VSV, 19 protéines intervenant dans la traduction IRES spécifique, 54 protéines impliquées dans la répliation virale, 66 protéines impliquées dans l'assemblage et la sécrétion et 9 protéines dont l'étape dans laquelle elles sont impliquées n'a pas pu être identifiée. Leur criblage a été réalisé sur des cellules Huh7.5.1 infectées par des HCVcc JFH-1 de génotype 2a. Cette équipe a identifié l'effet de l'interférence à ARN sur l'efficacité de l'infection virale par visualisation de la protéine virale core au sein des cellules. De son côté, l'équipe du Dr Bartenschlager s'est concentrée sur les protéines ayant un impact sur les étapes tardives du cycle répliatif du HCV. De la même façon, l'équipe a appliqué un protocole en deux étapes sur des cellules Huh7.5.1 infectées avec des HCVcc JcR2a de génotype 2a. L'efficacité d'infection a pu être définie à l'aide de la lecture du signal luminescent provenant du gène rapporteur de la luciférase *Renilla* présent en amont du génome viral. De façon intéressante, 25 protéines ont été identifiées dans ces deux criblages dont des protéines connues pour avoir un rôle dans les

étapes précoces et tardives du cycle viral, telles que CD81 et ApoE, validant ainsi l'approche du criblage suivant un protocole à deux étapes (**Tableau 8**).

ID du gène	Nom du gène	Poenisch <i>et al</i> , 2015		Li <i>et al</i> , 2014	
		Entrée/ Réplication	Assemblage/Libération	Entrée/ Réplication	Assemblage/Libération
348	APOE	x	x		x
975	CD81	x	x	x	x
1147	CHUK		x	x	x
1490	CTGF	x	x		x
8722	CTSF		x	x	x
1650	DDOST		x		x
1654	DDX3X	x	x		x
8694	DGAT1		x	x	x
10516	FBLN5		x	x	x
3190	HNRNPK	x	x	x	
3679	ITGA7	x	x		x
9020	MAP3K14		x	x	x
81788	NUAK2	x	x	x	x
5297	PIK4CA	x	x	x	x
8766	RAB11A		x	x	x
10244	RABEPK	x	x	x	x
9475	ROCK2		x	x	x
83694	RPS6KL1	x	x	x	x
64750	SMURF2	x	x	x	x
9789	SPCS2	x	x	x	x
60559	SPCS3	x	x		x
6774	STAT3	x	x		x
9524	TECR	x	x		x
55223	TRIM62	x	x	x	x
7511	XPNPEP1		x	x	x

Tableau 8 : Tableau représentant les gènes retrouvés en commun dans les deux études de Li *et al.*, 2014 et Poenisch *et al.*, 2015. Les croix rouges représentent un effet antiviral et les croix vertes représentent un effet proviral.

Grâce à notre étude gain de fonction, nous avons pu identifier 495 miRs ayant un effet significatif sur l'efficacité de l'infection par le HCV. Nous avons ainsi retrouvé des miRs, notamment les miRs de la famille let-7 et miR-27 connus pour avoir un effet sur l'efficacité des phases précoces et des phases tardives du cycle viral respectivement (Cheng *et al.*, 2013; Shirasaki *et al.*, 2013). L'équipe du Dr Yang a identifié la famille des miRs let-7 comme ayant un effet antiviral sur le HCV. Dans cette étude, les auteurs ont identifié de façon systématique la modulation des miRs suite à un traitement des cellules Huh7 avec de l'IFN- α ou IL-28B.

L'activité antivirale des miRs différentiellement exprimés a été par la suite analysée fonctionnellement en utilisant des miR-mimic ou des antago-miRs sur des cellules Huh7.5.1 infectées avec des HCVcc Jc1-Luc. Ainsi, ils ont identifié la famille des miRs-let-7, comme ayant un effet antiviral contre le HCV durant les étapes de traduction et réplication de l'ARN génomique (Cheng et al., 2013). D'autre part, l'équipe du Dr Kaneko avait précédemment remarqué que 19 miRs étaient exprimés de façon différentielle dans des biopsies hépatiques de patients ayant développé des lésions en lien avec une infection chronique par le HCV ou le HBV (Ura et al., 2009). Parmi ces miRs, miR-27a a été identifié comme ayant un rôle dans l'efficacité de l'infection par le HCV. En effet, l'effet du miR-27a a été confirmé grâce à l'utilisation de miR mimic et antago-miR dirigés contre la séquence mature sur des cellules Huh7.5 infectées par des HCVcc JFH1. L'analyse de l'effet du miR-27a a conduit les auteurs à identifier le rôle de ce miR dans la régulation du métabolisme des lipides en lien direct avec les phases tardives du cycle viral du HCV (Shirasaki et al., 2013).

Notre criblage fonctionnel nous a permis d'identifier de nombreux miRs qui ont un effet sur les phases tardives du cycle viral. Cette étape étant la moins bien décrite parmi celles du cycle viral, nous avons voulu l'étudier avec plus d'intérêt. Ainsi, nous avons identifié et validé l'effet des miRs 501-3p et 619 selon le protocole décrit précédemment. D'autres expériences complémentaires permettront de déterminer avec plus de précision quelle étape des phases tardives est impliquée ou encore si la modulation de l'efficacité de l'infection virale est en lien avec la qualité des nouvelles particules virales produites (Benga et al., 2010). A l'heure actuelle, les deux miRs 501-3p et 619 sont peu décrits dans la littérature.

Des analyses complémentaires sont actuellement en cours. Afin de déterminer les mécanismes sous-jacents l'effet de ces miRs, nous avons choisi d'identifier les cibles potentielles de ces miRs à l'aide d'outils computationnels dédiés, qui recourent les cibles validées d'un miR donné ainsi que celles qui sont prédites. Nous souhaitons à présent tester l'effet de ces cibles sur le cycle viral du HCV grâce à une stratégie de criblage de perte de fonction utilisant l'interférence à ARN. En effet, le rôle fonctionnel de ces cibles est en cours d'analyse grâce à une stratégie de criblage de perte de fonction ciblé (Poenisch et al., 2015; Zona et al., 2013). Une étude similaire faite par l'équipe du Dr Bartenschlager, discutée ci-dessus, décrit un protocole expérimental similaire au nôtre (Poenisch et al., 2015). Cependant, aucune des protéines qu'ils ont décrites comme induisant une modulation significative des

phases tardives du cycle viral n'est retrouvée dans notre liste des cibles des miR-501-3p et miR-619. Malgré tout, il est important de noter que les criblages restent des expériences à faible taux de recouvrement (Poenisch et al., 2015) ; le rôle de nos cibles sélectionnées reste donc à être démontré. A terme, ces expériences permettront peut-être d'identifier de nouveaux facteurs de l'hôte impliqués dans l'assemblage et/ou la sécrétion des particules virales.

Fait marquant, le criblage avec la banque des miRs mimic a identifié miR-146a comme ayant un impact significatif sur les phases tardives du cycle viral du HCV. Il est intéressant de noter que ce miR a également été identifié dans la cadre du projet étudiant l'effet de l'infection virale sur l'expression des miRs cellulaires. Nous avons ainsi analysé de façon plus approfondie l'effet du miR-146a sur l'efficacité de l'infection par le HCV. Dans un premier temps, cet effet a été validé par des expériences indépendantes dans des cellules Huh7.5.1. Cependant, ce protocole ne permet pas de discriminer avec précision toutes les étapes du cycle viral qui sont potentiellement touchées par la sur-expression du miR-146a. D'autres expériences sont en cours afin de déterminer plus précisément l'effet de la sur-expression et de l'inhibition du miR-146a sur les étapes d'entrée (avec l'utilisation de HCVpp), de la traduction (en analysant l'activité HCV IRES par exemple), de la réplication virale (grâce à l'utilisation de réplicons), ou encore de l'infectiosité des nouveaux virions (grâce à la détermination de l'infectivité spécifique des particules virales intracellulaires et extracellulaires) (Benga et al., 2010). Ces résultats nous permettront de conclure si le miR-146a intervient à différents niveaux du cycle viral ou bien uniquement au cours des étapes tardives comme suggéré par nos expériences préliminaires.

Dans le contexte de la compréhension globale de l'effet des miRs sur l'efficacité de l'infection par le HCV, nous avons réalisé un criblage de perte de fonction utilisant des antago-miRs. Un protocole identique à celui des miRs mimics a été utilisé. Les résultats de ce criblage sont actuellement en cours d'analyse. Dans le cadre de ce criblage, nous avons utilisé comme contrôle négatif l'antago-miR ciblant miR-67 exprimé chez *C. elegans*, n'ayant aucune cible endogène dans les cellules humaines ; comme contrôle positif l'antago-miR-122 qui diminue le taux de miR-122 endogène dans les cellules Huh7.5.1, et inhibe la réplication virale ; enfin, le siApoE a été utilisé comme contrôle de la réinfection. Une fois les analyses statistiques obtenues, il sera intéressant dans un premier temps de vérifier l'expression des miRs au sein

des cellules Huh7.5.1 afin d'éliminer les faux positifs. D'autre part, il serait intéressant de comparer les résultats des deux criblages afin d'identifier des recouvrements qui permettraient d'affiner la sélection des miRs à approfondir pour de futures analyses.

2. Impact de l'infection par le HCV sur l'expression des miRs dans les hépatocytes.

L'analyse systématique de la modulation des miRs lors de l'infection par le HCV nous permet d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents conduisant au développement des lésions hépatiques.

Nous avons choisi d'utiliser des cellules Huh7.5.1 différenciées par traitement avec du DMSO. La différenciation de cellules hépatocytaires par le DMSO permet à ces cellules de réacquérir une expression génique, un métabolisme et à long terme une morphologie proche des hépatocytes. De plus, ces cellules restent hautement permissives par les HCVcc et permettent de réaliser des expériences d'infection à long terme mimant une infection chronique. Le DMSO modifiant l'expression génique des cellules, nous avons comparé les cellules différenciées infectées par les HCVcc Jc1 par rapport à des cellules différenciées non infectées retrouvant ainsi le même profil d'expression génique basale. Il est intéressant de noter qu'un séquençage indépendant des miRs réalisé sur des cellules Huh7.5.1 non différenciées et infectées pendant 3 jours a permis d'identifier 10 miRs, dont miR-146a-5p, communs au modèle des cellules différenciées et chroniquement infectées par HCV. Ceci indique que l'induction de ces miRs par le HCV est spécifique à l'infection virale et indépendante du modèle *in vitro* utilisé.

Parmi les 74 miRs significativement modulés, nous avons retrouvé des miRs connus pour être modulés dans des tissus provenant de tumeurs de HCC de patients chroniquement infectés par le HCV. L'un des miRs les plus décrits à ce jour dans le développement du HCC est miR-21, c'est pourquoi nous l'avons utilisé comme contrôle positif tout au long de nos expériences. En effet, il est connu que miR-21 augmente l'efficacité de l'infection par le HCV, et est impliqué dans le développement de la fibrose hépatique via l'inhibition de SMAD7 (Marquez et al., 2010), et le développement du HCC via la régulation de PTEN, un gène suppresseur de tumeur (Meng et al., 2007). De ce fait, l'identification du miR-21 nous a permis de confirmer notre approche.

Nous avons dans cette étude cherché à déterminer des miRs dont la modulation d'expression causerait l'apparition des lésions hépatiques. Des recherches bibliographiques nous ont permis d'identifier des miRs connus pour avoir une implication fonctionnelle ou une expression différentielle dans différents cancers. Ceci est le cas du miR-146a-5p, qui a été décrit pour avoir un rôle dans le développement du HCC entre autres. Nous avons observé la surexpression de miR-146a-5p par le HCV à partir de 3 jours d'infection en culture cellulaire dans des cellules Huh7.5.1, dans des PHH ainsi que dans le tissu hépatique de patients chroniquement infectés par le HCV. Ceci nous a conduit à nous intéresser plus particulièrement à ce miR dans l'étude des mécanismes de pathogenèse du HCC à étiologie virale.

L'analyse de l'effet de la sur-expression du miR-146a dans des cellules Huh7.5.1 sur l'expression génique globale (*microarray*) nous a permis d'une part d'identifier les voies de signalisation modulées par cette dérégulation grâce à l'utilisation de logiciels tels qu'IPA et GSEA (cf. discussion du manuscrit).

En parallèle, nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes le miR-146a est modulé dans les cellules infectées. Ainsi, il a déjà été montré que l'infection par le HCV module des voies de signalisation en lien avec l'expression du miR-146a, notamment les voies STAT3 et NF- κ B. En effet, l'équipe du Dr Tian a montré que le miR-146a est dérégulé dans le HCC par STAT3. L'inhibition de miR-146a par STAT3 affecte la réponse immunitaire anti-tumorale (Sun *et al.*, 2015). L'équipe du Dr Baltimore a montré que le promoteur du gène codant le miR-146a répond à une stimulation par le TNF- α , le LPS et l'IL-1 β , via la voie NF- κ B. L'expression du miR-146a est augmentée en réponse à une infection inhibant ainsi la réponse immunitaire innée de la cellule en ciblant les protéines IRAK1 et TRAF6 (Taganov *et al.*, 2006). Ce mécanisme pourrait expliquer l'avantage causé par l'augmentation du miR-146a lors de l'infection par le HCV. Ainsi, le miR-146a aiderait le HCV à échapper à l'immunité innée de la cellule. Dans ce sens, nous avons identifié grâce au GSEA, que l'augmentation du miR-146a diminue l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée de la cellule. Nous souhaitons à présent comprendre avec plus de précision les mécanismes par lesquels le HCV module l'expression du miR-146a. Nous avons commencé à explorer l'effet de la stimulation ou l'inhibition de la voie NF- κ B sur l'expression du miR-146a, et à corrélérer la modulation du miR via NF- κ B avec celle obtenue suite à l'infection par le HCV. Pour ce faire, nous stimulons la voie NF- κ B avec un traitement au TNF- α , ou nous l'inhibons à l'aide d'inhibiteurs des Ikk (molécule activatrice

de NF- κ B). Afin de tenir compte de l'intégralité des processus mis en place lors de l'infection par le HCV dans le tissu hépatique, nous avons choisi de réaliser ces expériences dans les lignées cellulaires Huh7.5.1 et Huh7, cette dernière exprimant le facteur RIG-I essentiel à l'immunité innée en réponse à la présence d'un ARN exogène dans le cytoplasme cellulaire.

Afin de déterminer si la sur-expression du miR-146a suite à l'infection virale est réversible, nous souhaitons analyser la modulation de ce miR après clairance virale. Pour ce faire, nous traitons des cellules Huh7.5.1 différenciées et infectées pendant 7 jours avec des combinaisons d'antiviraux. Ces analyses nous permettront de déterminer si l'élimination du HCV de ses cellules hôte diminue l'expression du miR-146a ou si la modulation de l'expression de ce miR persiste. En effet, il est important de souligner que les patients ayant guéri de l'infection par le HCV présentent toujours un risque de développer un HCC. La compréhension des mécanismes irréversiblement modulés par le HCV dans les hépatocytes pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ou préventives afin de limiter le développement du HCC chez ces patients.

D'autre part, nous sommes actuellement en train de répéter l'analyse de l'expression génique lors de la sur-expression du miR-146a dans des cellules Huh7.5.1 différenciées par du DMSO. Cette nouvelle analyse nous permettra de comparer le profil génique des cellules Huh7.5.1 différenciées sur-exprimant le miR-146a avec des cellules Huh7.5.1 différenciées infectées par le HCV (données disponibles au laboratoire). Avec cette analyse, nous souhaitons identifier les gènes qui sont modulés de la même manière lors de l'infection virale et lors de la sur-expression du miR-146a afin d'identifier des voies de signalisation communes aux deux conditions. Par ailleurs, cette analyse nous permettra de déterminer les voies communes modulées par le miR-146a et par le HCV, et de comprendre les mécanismes mis en place suite à l'infection virale conduisant au développement de la pathogenèse hépatique en lien avec la modulation du miR-146a.

Dans une autre approche, le miR-146a a été localisé dans la mitochondrie et contrôle l'expression des gènes mitochondriaux. En effet, des études ont montré que le miR-146a est d'une part enrichi dans les mitochondries des cellules 143B 206 ρ^0 (cellules d'ostéosarcome dépourvues d'ADN mitochondrial) et d'autre part qu'il contient 19 séquences cibles chez les ARNm nucléaires qui ciblent la mitochondrie (Dasgupta et al., 2015). De façon intéressante, Dasgupta *et al.* discutent des cibles putatives du miR-146a, qui pour certaines sont des gènes

nucléaires codant des canaux ioniques impliqués dans le transfert de calcium, tels que SCN3B, CAMK2D et CASK. Ainsi, l'inhibition de l'expression de ces gènes a un impact sur la stabilité et le maintien du potentiel de la membrane mitochondriale ainsi que l'équilibre de la concentration en calcium important dans le fonctionnement mitochondrial. Il serait alors intéressant d'analyser si la modulation du miR-146a lors de l'infection par le HCV pourrait avoir un effet sur l'homéostasie mitochondriale au sein de la cellule hôte mais aussi sur le stress oxydatif généré suite à l'infection.

Une autre étude a montré l'importance du miR-146a dans la réponse au stress oxydatif. En effet, l'étude de l'équipe du Dr Li a montré que le miR-146a cible l'ARNm du gène codant la protéine SOD2, essentielle à la survie cellulaire en réponse à un stress oxydatif. D'autre part, un traitement par H₂O₂ induit l'expression du miR-146a et inhibe l'expression de SOD2 dans des cellules provenant d'un phéochromocytome de rat PC12 ou des cellules humaines d'un neuroblastome SH-SY5Y (Ji *et al.*, 2013). Cependant, nos analyses préliminaires de l'effet du miR-146a sur l'expression génique dans des cellules Huh7.5.1 différenciées n'identifient pas SOD2 comme étant une cible du miR-146a.

D'autres études ont montré que l'infection par le HCV génère un stress oxydatif via la production de ROS (pour revue (Choi *et al.*, 2014)). En effet, l'hépatite C chronique est caractérisée par une augmentation importante des produits de la peroxydation des lipides, mais aussi des acides nitriques, liée à l'augmentation de la transcription dépendante de c-Jun de la synthase d'oxyde nitrique inductible (iNOS), ainsi qu'une surcharge de fer chez les patients (Farinati *et al.*, 1995; Machida *et al.*, 2010). De plus, il a déjà été démontré que le HCV augmente la production d'espèce ROS *in vitro* dans des hépatocytes mais aussi chez les patients (Boudreau *et al.*, 2009; Valgimigli *et al.*, 2002). Les cellules infectées par le HCV montrent des anomalies dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, qui est une des sources de la production des ROS. D'autre part, la protéine virale core se localise dans la mitochondrie, augmentant la capture du calcium ainsi que la génération de superoxyde (Ivanov *et al.*, 2015). La production de ces espèces oxydantes conduit à la dégradation de l'ADN, l'inhibition de sa réparation, mais aussi à des modifications épigénétiques inhibitrices telles que la diminution de l'expression de la E cadhérine suite à un traitement à l'H₂O₂ (Lim *et al.*, 2008). Enfin, de nombreuses voies de signalisation sont altérées suite à la production de ces ROS. En effet, la production de ROS et la peroxydation des lipides permettent la production de collagène conduisant à la fibrose hépatique, et la voie TGF- β induisant

l'expression des protéines NOX4 et NOX1/Rac accélère le développement de la fibrose. D'autres mécanismes impliquant les ROS générés suite à l'infection par le HCV sont responsables du développement du HCC (pour revue (Choi *et al.*, 2014)) (**Figure 27**).

Dans notre cas, il est intéressant de considérer que l'augmentation du miR-146a suite à l'infection par le HCV pourrait induire la production d'espèces ROS qui est au cœur du développement du HCC, comme décrit précédemment. Cette partie de la régulation du développement du HCC par le HCV en lien avec la modulation du miR-146a serait très intéressante à comprendre dans le cadre d'un nouveau projet. En effet, il pourrait être

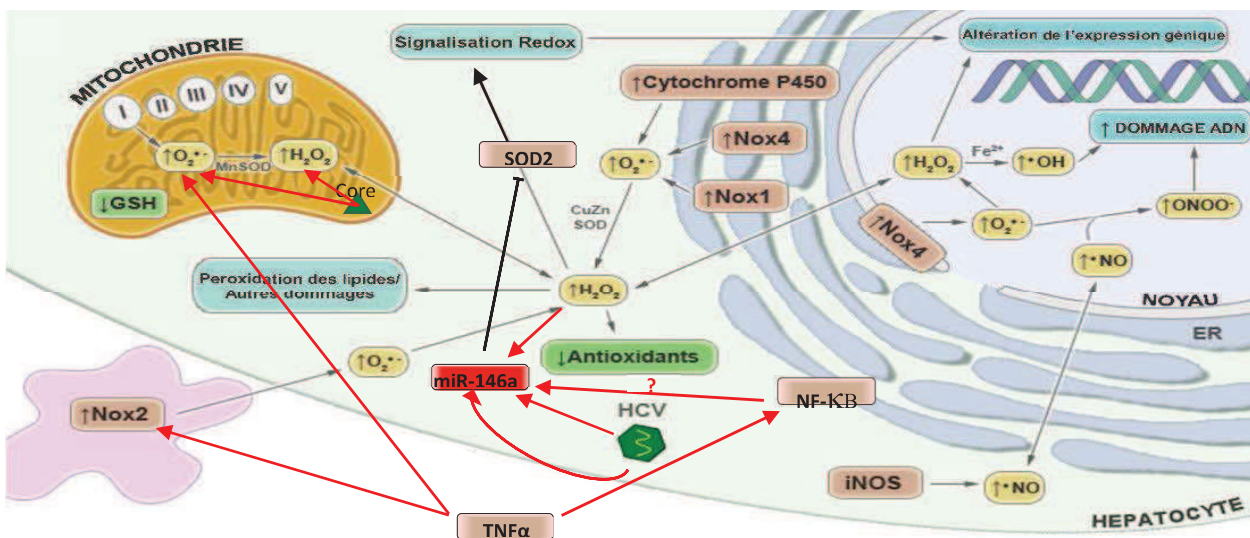


Figure 27 : Effet de l'infection par le HCV sur la génération de stress oxydant dans les hépatocytes conduisant au développement du HCC. Le miR-146a pourrait avoir un rôle central dans la génération du stress oxydant en réponse à l'infection par le HCV. Des analyses complémentaires peuvent être réalisées afin de déterminer le rôle de ce miR dans le développement du HCC en lien avec la génération de ROS (adapté de (Choi *et al.*, 2014)).

intéressant d'analyser nos données de modulation de l'expression génique globale dans les cellules qui sur-expriment le miR-146a et les cellules chroniquement infectées par le HCV, et de déterminer les voies de signalisation en lien avec la génération du stress oxydatif suite à l'infection par le HCV et leur implication dans le développement du HCC. D'autre part, de nombreuses thérapies en lien avec la génération des ROS pourraient être développées afin de prévenir l'apparition du HCC. En effet, des études ont montré que la suppression de la surcharge en fer présent dans les hépatocytes de patients chroniquement infectés par le HCV diminuait les dommages oxydatifs ainsi que l'inflammation, ralentissant ainsi la progression de la fibrose et diminuant ainsi le risque de HCC (Kato *et al.*, 2007).

3. Conclusion

Ce travail de thèse s'inscrit dans une compréhension globale des interactions qui ont lieu entre l'hôte et le HCV. En effet, notre laboratoire a pour but d'étudier et de cartographier la globalité des modulations des circuits biologiques au sein de la cellule lors de l'infection par le HCV. Notre étude s'est concentrée plus particulièrement sur les interactions hôte-virus en lien avec les ARN non codants.

Ces deux études nous ont permis de mieux comprendre les relations virus-hôte au travers de l'expression des miRs. A terme, l'identification des miRs impliqués dans le cycle réplicatif du virus et/ou modulés au cours de l'infection virale permettra de mieux caractériser les facteurs de l'hôte impliqués et de développer de nouvelles thérapies antivirales (telles que l'inhibiteur de miR-122), ou encore d'identifier de nouvelles cibles pour prévenir le développement des maladies hépatiques, y compris du HCC, suite à l'infection virale.

Bibliographie

Bibliographie

- Almeida, J., Rubenstein, D., and Stott, E.J. (1971). NEW ANTIGEN-ANTIBODY SYSTEM IN AUSTRALIA-ANTIGEN-POSITIVE HEPATITIS. *The Lancet* *298*, 1225–1227.
- Alter, H.J., and Blumberg, B.S. (1966). Further studies on a “new” human isoprecipitin system (Australia antigen). *Blood* *27*, 297–309.
- Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V., and Popper, H. (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 459–463.
- Amaratunga, D., and Cabrera, J. (2001). Analysis of Data From Viral DNA Microchips. *J. Am. Stat. Assoc.* *96*, 1161–1170.
- Asselah, T., and Marcellin, P. (2011). New direct-acting antivirals’ combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *31 Suppl 1*, 68–77.
- Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F., and Zeisel, M.B. (2015). miR-122 - A key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* *62*, 448–457.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* *136*, 215–233.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* *19*, 95–103.
- Barth, H., Liang, T.J., and Baumert, T.F. (2006). Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatol. Baltim. Md* *44*, 527–535.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003). Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J. Exp. Med.* *197*, 633–642.
- Bauhofer, O., Ruggieri, A., Schmid, B., Schirmacher, P., and Bartenschlager, R. (2012). Persistence of HCV in quiescent hepatic cells under conditions of an interferon-induced antiviral response. *Gastroenterology* *143*, 429–438.e8.
- Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T., and Liang, T.J. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J. Virol.* *72*, 3827–3836.
- Benga, W.J.A., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., et al. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatol. Baltim. Md* *51*, 43–53.
- Bentham, M.J., Marraiki, N., McCormick, C.J., Rowlands, D.J., and Griffin, S. (2014). NS2 is dispensable for efficient assembly of hepatitis C virus-like particles in a bipartite trans-encapsidation system. *J. Gen. Virol.* *95*, 2427–2441.
- Bissig, K.-D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J. Clin. Invest.* *120*, 924–930.

Bibliographie

- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* *80*, 6964–6972.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., and Rice, C.M. (2000). Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. *Science* *290*, 1972–1974.
- Boss, I.W., and Renne, R. (2011). Viral miRNAs and immune evasion. *Biochim. Biophys. Acta* *1809*, 708–714.
- Boudreau, H.E., Emerson, S.U., Korzeniowska, A., Jendrysik, M.A., and Leto, T.L. (2009). Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J. Virol.* *83*, 12934–12946.
- Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J. Gen. Virol.* *88*, 2204–2213.
- Brimacombe, C.L., Grove, J., Meredith, L.W., Hu, K., Syder, A.J., Flores, M.V., Timpe, J.M., Krieger, S.E., Baumert, T.F., Tellinghuisen, T.L., et al. (2011). Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* *85*, 596–605.
- Broderick, J.A., and Zamore, P.D. (2011). MicroRNA therapeutics. *Gene Ther.* *18*, 1104–1110.
- Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.H., and Lemon, S.M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* *20*, 5041–5045.
- Burbelo, P.D., Dubovi, E.J., Simmonds, P., Medina, J.L., Henriquez, J.A., Mishra, N., Wagner, J., Tokarz, R., Cullen, J.M., Iadarola, M.J., et al. (2012). Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J. Virol.* *86*, 6171–6178.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* *10*, 1957–1966.
- Catanese, M.T., and Dorner, M. (2015). Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology* *479–480*, 221–233.
- Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., and Rice, C.M. (2013). Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 9505–9510.
- de Chassey, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M.S., Aublin-Gex, A., Agaagué, S., Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B.F., Chantier, T., et al. (2008). Hepatitis C virus infection protein network. *Mol. Syst. Biol.* *4*, 230.
- Chekulaeva, M., and Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 452–460.
- Chen, Y., Chen, J., Wang, H., Shi, J., Wu, K., Liu, S., Liu, Y., and Wu, J. (2013). HCV-Induced miR-21 Contributes to Evasion of Host Immune System by Targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS Pathog* *9*, e1003248.

Bibliographie

- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823–828.
- Cheng, J.-C., Yeh, Y.-J., Tseng, C.-P., Hsu, S.-D., Chang, Y.-L., Sakamoto, N., and Huang, H.-D. (2012). Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2621–2633.
- Cheng, M., Si, Y., Niu, Y., Liu, X., Li, X., Zhao, J., Jin, Q., and Yang, W. (2013). High-throughput profiling of alpha interferon- and interleukin-28B-regulated microRNAs and identification of let-7s with anti-hepatitis C virus activity by targeting IGF2BP1. *J. Virol.* 87, 9707–9718.
- Choi, J., Corder, N.L.B., Koduru, B., and Wang, Y. (2014). Oxidative stress and hepatic Nox proteins in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 267–284.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., and Kuo, C. (1994). Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1294–1298.
- Chowdhury, J.B., Shrivastava, S., Steele, R., Bisceglie, A.M.D., Ray, R., and Ray, R.B. (2012). Hepatitis C Virus Infection Modulates Expression of Interferon Stimulatory Gene IFITM1 by Upregulating miR-130A. *J. Virol.* 86, 10221–10225.
- Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., and Pietschmann, T. (2009). Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* 50, 1638–1645.
- Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., and Randall, G. (2009). RNA Interference and Single Particle Tracking Analysis of Hepatitis C Virus Endocytosis. *PLoS Pathog* 5, e1000702.
- Colpitts, C.C., Lupberger, J., Doerig, C., and Baumert, T.F. (2015). Host cell kinases and the hepatitis C virus life cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 1657–1662.
- Conrad, K.D., and Niepmann, M. (2014). The role of microRNAs in hepatitis C virus RNA replication. *Arch. Virol.* 159, 849–862.
- Consortium, T.U. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43, D204–D212.
- Coulouarn, C., Factor, V.M., Andersen, J.B., Durkin, M.E., and Thorgeirsson, S.S. (2009). Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 28, 3526–3536.
- Da Costa, D., Turek, M., Felmler, D.J., Girardi, E., Pfeffer, S., Long, G., Bartenschlager, R., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2012). Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J. Virol.* 86, 11919–11925.
- Dao Thi, V.L., Granier, C., Zeisel, M.B., Guérin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R., Baumert, T.F., et al. (2012). Characterization of hepatitis C virus particle

Bibliographie

subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J. Biol. Chem.* **287**, 31242–31257.

Dasgupta, N., Peng, Y., Tan, Z., Ciruolo, G., Wang, D., and Li, R. (2015). miRNAs in mtDNA-less cell mitochondria. *Cell Death Discov.* **1**, 15004.

Donahue, J.G., Muñoz, A., Ness, P.M., Brown, D.E., Yawn, D.H., McAllister, H.A., Reitz, B.A., and Nelson, K.E. (1992). The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **327**, 369–373.

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

Dorner, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2013). Study of hepatitis C virus entry in genetically humanized mice. *Methods San Diego Calif* **59**, 249–257.

Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *J. Hepatol.* **61**, S3–S13.

Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjärn, M., Hansen, H.F., Berger, U., et al. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* **452**, 896–899.

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

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007a). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 9–22.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007b). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3970–3981.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9–14.

Eulalio, A., Schulte, L., and Vogel, J. (2012). The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol.* **9**, 742–750.

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

Everson, G.T., Sims, K.D., Rodriguez-Torres, M., Hézode, C., Lawitz, E., Bourlière, M., Loustaud-Ratti, V., Rustgi, V., Schwartz, H., Tatum, H., et al. (2014). Efficacy of an interferon- and ribavirin-free regimen of daclatasvir, asunaprevir, and BMS-791325 in treatment-naïve patients with HCV genotype 1 infection. *Gastroenterology* **146**, 420–429.

Farci, P., Alter, H.J., Govindarajan, S., Wong, D.C., Engle, R., Lesniewski, R.R., Mushahwar, I.K., Desai, S.M., Miller, R.H., and Ogata, N. (1992). Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258**, 135–140.

Bibliographie

- Farinati, F., Cardin, R., De Maria, N., Della Libera, G., Marafin, C., Lecis, E., Burra, P., Floreani, A., Cecchetto, A., and Naccarato, R. (1995). Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J. Hepatol.* *22*, 449–456.
- Farquhar, M.J., Harris, H.J., Diskar, M., Jones, S., Mee, C.J., Nielsen, S.U., Brimacombe, C.L., Molina, S., Toms, G.L., Maurel, P., et al. (2008). Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity. *J. Virol.* *82*, 8797–8811.
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., Baumert, T.F., Rappoport, J.Z., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2012). Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. *J. Virol.* *86*, 4305–4316.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., and Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 331–341.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* *9*, 102–114.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806–811.
- Fofana, I., Xiao, F., Thumann, C., Turek, M., Zona, L., Tawar, R.G., Grunert, F., Thompson, J., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2013). A novel monoclonal anti-CD81 antibody produced by genetic immunization efficiently inhibits Hepatitis C virus cell-cell transmission. *PLoS One* *8*, e64221.
- Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B.B., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M., Fattori, E., et al. (2006). A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat. Med.* *12*, 190–197.
- Frank, C., Mohamed, M.K., Strickland, G.T., Lavanchy, D., Arthur, R.R., Magder, L.S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E.S., Anwar, W., et al. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* *355*, 887–891.
- Frelin, L., Brenndörfer, E.D., Ahlén, G., Weiland, M., Hultgren, C., Alheim, M., Glaumann, H., Rozell, B., Milich, D.R., Bode, J.G., et al. (2006). The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor α mediated liver disease. *Gut* *55*, 1475–1483.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* *75*, 12047–12057.
- Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Gonçalves, F.L., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., et al. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* *347*, 975–982.
- Friedman, S.L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* *275*, 2247–2250.
- Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.-H., Xu, J., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2012). Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* *151*, 533–546.

Bibliographie

- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M.M.C. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J. Virol.* *78*, 3480–3488.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* *82*, 2120–2129.
- Gebert, L.F.R., Rebhan, M.A.E., Crivelli, S.E.M., Denzler, R., Stoffel, M., and Hall, J. (2014). Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Res.* *42*, 609–621.
- Gottwein, J.M., Jensen, T.B., Mathiesen, C.K., Meuleman, P., Serre, S.B.N., Lademann, J.B., Ghanem, L., Scheel, T.K.H., Leroux-Roels, G., and Bukh, J. (2011). Development and Application of Hepatitis C Reporter Viruses with Genotype 1 to 7 Core-Nonstructural Protein 2 (NS2) Expressing Fluorescent Proteins or Luciferase in Modified JFH1 NS5A. *J. Virol.* *85*, 8913–8928.
- Gouttenoire, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2010). Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev. Med. Virol.* *20*, 117–129.
- Graves, P., and Zeng, Y. (2012). Biogenesis of Mammalian MicroRNAs: A Global View. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *10*, 239–245.
- Grey, F., Meyers, H., White, E.A., Spector, D.H., and Nelson, J. (2007). A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog.* *3*, e163.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* *466*, 835–840.
- Gupta, E., Bajpai, M., and Choudhary, A. (2014). Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J. Transfus. Sci.* *8*, 19–25.
- Halfon, P., Ouzan, D., Cattan, L., and Cacoub, P. (2004). [The prognostic tools of hepatitis C virus infections]. *Presse Médicale Paris Fr.* *1983* *33*, 542–543.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* *125*, 887–901.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., et al. (2008). CD81 and Claudin 1 Coreceptor Association: Role in Hepatitis C Virus Entry. *J. Virol.* *82*, 5007–5020.
- Harris, H.J., Clerte, C., Farquhar, M.J., Goodall, M., Hu, K., Rassam, P., Dosset, P., Wilson, G.K., Balfe, P., IJzendoorn, S.C., et al. (2013). Hepatoma polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell. Microbiol.* *15*, 430–445.
- Haudecoeur, R., Peuchmaur, M., Ahmed-Belkacem, A., Pawlotsky, J.-M., and Boumendjel, A. (2013). Structure-activity relationships in the development of allosteric hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: ten years of research. *Med. Res. Rev.* *33*, 934–984.
- Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (1999). Translation of hepatitis C virus RNA. *J. Viral Hepat.* *6*, 79–87.

Bibliographie

- Hemler, M.E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 801–811.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* *27*, 3300–3310.
- Hikosaka, K., Noritake, H., Kimura, W., Sultana, N., Sharkar, M.T.K., Tagawa, Y.-I., Uezato, T., Kobayashi, Y., Wakita, T., and Miura, N. (2011). Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* *32*, 143–150.
- Hildebrandt-Eriksen, E.S., Aarup, V., Persson, R., Hansen, H.F., Munk, M.E., and Ørum, H. (2012). A locked nucleic acid oligonucleotide targeting microRNA 122 is well-tolerated in cynomolgus monkeys. *Nucleic Acid Ther.* *22*, 152–161.
- Hoffman, B., and Liu, Q. (2011). Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *31*, 1449–1467.
- Horwitz, J.A., Dorner, M., Friling, T., Donovan, B.M., Vogt, A., Loureiro, J., Oh, T., Rice, C.M., and Ploss, A. (2013). Expression of heterologous proteins flanked by NS3-4A cleavage sites within the hepatitis C virus polyprotein. *Virology* *439*, 23–33.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 7271–7276.
- Hsu, S., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., Kutay, H., Yu, L., Bai, S., La Perle, K., Chivukula, R.R., et al. (2012). Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J. Clin. Invest.* *122*, 2871–2883.
- Hu, W., Wang, X., Ding, X., Li, Y., Zhang, X., Xie, P., Yang, J., and Wang, S. (2012). MicroRNA-141 Represses HBV Replication by Targeting PPARA. *PLoS ONE* *7*, e34165.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Ivanov, A.V., Smirnova, O.A., Petrushanko, I.Y., Ivanova, O.N., Karpenko, I.L., Alekseeva, E., Sominskaya, I., Makarov, A.A., Bartosch, B., Kochetkov, S.N., et al. (2015). HCV core protein uses multiple mechanisms to induce oxidative stress in human hepatoma Huh7 cells. *Viruses* *7*, 2745–2770.
- Jackowiak, P., Kuls, K., Budzko, L., Mania, A., Figlerowicz, M., and Figlerowicz, M. (2014). Phylogeny and molecular evolution of the hepatitis C virus. *Infect. Genet. Evol.* *21*, 67–82.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1685–1694.
- Ji, G., Lv, K., Chen, H., Wang, T., Wang, Y., Zhao, D., Qu, L., and Li, Y. (2013). MiR-146a Regulates SOD2 Expression in H2O2 Stimulated PC12 Cells. *PLoS ONE* *8*, e69351.

Bibliographie

- Jiang, J., Wu, X., Tang, H., and Luo, G. (2013). Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. *PLoS One* *8*, e67982.
- Jong, Y.P. de, Dorner, M., Mommersteeg, M.C., Xiao, J.W., Balazs, A.B., Robbins, J.B., Winer, B.Y., Gerges, S., Vega, K., Labitt, R.N., et al. (2014). Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection. *Sci. Transl. Med.* *6*, 254ra129–ra254ra129.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005a). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* *309*, 1577–1581.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005b). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* *309*, 1577–1581.
- Jopling, C.L., Schütz, S., and Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* *4*, 77–85.
- Kamiya, N., Iwao, E., Hiraga, N., Tsuge, M., Imamura, M., Takahashi, S., Miyoshi, S., Tateno, C., Yoshizato, K., and Chayama, K. (2010). Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J. Gen. Virol.* *91*, 1668–1677.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Scheel, T.K.H., Hjelle, B., Cullen, J.M., Burbelo, P.D., Chauhan, L.V., Duraisamy, R., Sanchez Leon, M., Jain, K., et al. (2013). Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *mBio* *4*, e00216–00213.
- Kato, J., Miyanishi, K., Kobune, M., Nakamura, T., Takada, K., Takimoto, R., Kawano, Y., Takahashi, S., Takahashi, M., Sato, Y., et al. (2007). Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol.* *42*, 830–836.
- Kawamura, T., Furusaka, A., Koziel, M.J., Chung, R.T., Wang, T.C., Schmidt, E.V., and Liang, T.J. (1997). Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology* *25*, 1014–1021.
- Kim, C.S., Seol, S.K., Song, O.-K., Park, J.H., and Jang, S.K. (2007). An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J. Virol.* *81*, 3852–3865.
- Koike, K., Moriya, K., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Suzuki, T., Saito, I., Iino, S., Kurokawa, K., and Miyamura, T. (1995). Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *J. Gen. Virol.* *76*, 3031–3038.
- Kolykhalov, A.A., Mihalik, K., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J. Virol.* *74*, 2046–2051.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *J. Virol.* *80*, 5308–5320.
- Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., et al. (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* *51*, 1144–1157.

Bibliographie

Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 597–610.

Kulkarni, M., Ozgur, S., and Stoecklin, G. (2010). On track with P-bodies. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 242–251.

Kushima, Y., Wakita, T., and Hijikata, M. (2010). A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.* *84*, 9118–9127.

Lavillette, D., Pécheur, E.-I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F., and Cosset, F.-L. (2007). Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol.* *81*, 8752–8765.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.

Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* *25*, 522–532.

Lefèvre, M., Felmlee, D.J., Parnot, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2014). Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One* *9*, e95550.

Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S., Weinman, S.A., et al. (2002). Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* *122*, 352–365.

Li, Q., Brass, A.L., Ng, A., Hu, Z., Xavier, R.J., Liang, T.J., and Elledge, S.J. (2009). A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16410–16415.

Li, Q., Zhang, Y.-Y., Chiu, S., Hu, Z., Lan, K.-H., Cha, H., Sodroski, C., Zhang, F., Hsu, C.-S., Thomas, E., et al. (2014). Integrative functional genomics of hepatitis C virus infection identifies host dependencies in complete viral replication cycle. *PLoS Pathog.* *10*, e1004163.

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

Li, Y., Yamane, D., Masaki, T., and Lemon, S.M. (2015). The yin and yang of hepatitis C: synthesis and decay of hepatitis C virus RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 544–558.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* *433*, 769–773.

Lim, S.-O., Gu, J.-M., Kim, M.S., Kim, H.-S., Park, Y.N., Park, C.K., Cho, J.W., Park, Y.M., and Jung, G. (2008). Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology* *135*, 2128–2140, 2140.e1–e8.

Bibliographie

- Lindenbach, B.D. (2013). Virion assembly and release. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 199–218.
- Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., Lanford, R.E., Feinstone, S.M., Major, M.E., Leroux-Roels, G., et al. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3805–3809.
- Liu, S., Chen, R., and Hagedorn, C.H. (2014). Direct visualization of hepatitis C virus-infected Huh7.5 cells with a high titre of infectious chimeric JFH1-EGFP reporter virus in three-dimensional Matrigel cell cultures. *J. Gen. Virol.* *95*, 423–433.
- Liu, Z., Yang, F., Robotham, J.M., and Tang, H. (2009). Critical Role of Cyclophilin A and Its Prolyl-Peptidyl Isomerase Activity in the Structure and Function of the Hepatitis C Virus Replication Complex. *J. Virol.* *83*, 6554–6565.
- Lohmann, V. (2013). Hepatitis C virus RNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 167–198.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* *285*, 110–113.
- Long, G., Hiet, M.-S., Windisch, M.P., Lee, J.-Y., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2011). Mouse hepatic cells support assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Gastroenterology* *141*, 1057–1066.
- Lu, S., and Cullen, B.R. (2004). Adenovirus VA1 Noncoding RNA Can Inhibit Small Interfering RNA and MicroRNA Biogenesis. *J. Virol.* *78*, 12868–12876.
- Luna, J.M., Scheel, T.K.H., Danino, T., Shaw, K.S., Mele, A., Fak, J.J., Nishiuchi, E., Takacs, C.N., Catanese, M.T., de Jong, Y.P., et al. (2015). Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR-122. *Cell* *160*, 1099–1110.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* *17*, 589–595.
- Ma, S., Boerner, J.E., TiongYip, C., Weidmann, B., Ryder, N.S., Cooreman, M.P., and Lin, K. (2006). NIM811, a Cyclophilin Inhibitor, Exhibits Potent In Vitro Activity against Hepatitis C Virus Alone or in Combination with Alpha Interferon. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 2976–2982.
- Machida, K., McNamara, G., Cheng, K.T.-H., Huang, J., Wang, C.-H., Comai, L., Ou, J.-H.J., and Lai, M.M.C. (2010). Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 6985–6998.
- Machlin, E.S., Sarnow, P., and Sagan, S.M. (2011). Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3193–3198.
- Magnius, L.O., and Espmark, J.Å. (1972). New Specificities in Australia Antigen Positive Sera Distinct from the Le Bouvier Determinants. *J. Immunol.* *109*, 1017–1021.
- Mailly, L., Robinet, E., Meuleman, P., Baumert, T.F., and Zeisel, M.B. (2013). Hepatitis C virus infection and related liver disease: the quest for the best animal model. *Front. Microbiol.* *4*.

Bibliographie

- Mailly, L., Xiao, F., Lupberger, J., Wilson, G.K., Aubert, P., Duong, F.H.T., Calabrese, D., Leboeuf, C., Fofana, I., Thumann, C., et al. (2015). Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat. Biotechnol.* *33*, 549–554.
- Majid, S., Dar, A.A., Saini, S., Yamamura, S., Hirata, H., Tanaka, Y., Deng, G., and Dahiya, R. (2010). MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer* *116*, 5637–5649.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1102–1107.
- Marquez, R.T., Wendlandt, E., Galle, C.S., Keck, K., and McCaffrey, A.P. (2010). MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF-kappaB signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G535–G541.
- Martin, D.N., and Uprichard, S.L. (2013). Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 10777–10782.
- Masaki, T., Arend, K.C., Li, Y., Yamane, D., McGivern, D.R., Kato, T., Wakita, T., Moorman, N.J., and Lemon, S.M. (2015). miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation. *Cell Host Microbe* *17*, 217–228.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* *317*, 1764–1767.
- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S., and Albrecht, J.K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* *339*, 1485–1492.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* *21*, 3980–3988.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* *431*, 343–349.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* *133*, 647–658.
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., et al. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* *7*, 927–933.
- Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., and Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* *61*, 77–87.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H., and Leroux-Roels, G. (2008). Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatol. Baltim. Md* *48*, 1761–1768.

Bibliographie

- Meuleman, P., Catanese, M.T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C.T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R., Rice, C.M., et al. (2012). A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology*. Baltimore, Md 55, 364–372.
- Michalak, J.P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.C., Ung, S., Rice, C.M., and Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 9), 2299–2306.
- Moradpour, D., and Penin, F. (2013). Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 369, 113–142.
- Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., and Moradpour, D. (2011). Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* 18, 305–315.
- Mosteller, F. (1977). *Data Analysis and Regression: A Second Course in Statistics* (Addison-Wesley Publishing Company).
- Murakami, Y., Aly, H.H., Tajima, A., Inoue, I., and Shimotohno, K. (2009). Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J. Hepatology*. 50, 453–460.
- Nakao, K., Miyaaki, H., and Ichikawa, T. (2014). Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* 49, 589–593.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell Online* 2, 279–289.
- Nathans, R., Chu, C., Serquina, A.K., Lu, C.-C., Cao, H., and Rana, T.M. (2009). Cellular microRNA and P-bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Mol. Cell* 34, 696–709.
- Niepmann, M. (2013). Hepatitis C Virus RNA Translation. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy Current Topics in Microbiology and Immunology*,.
- Ohara, E., Hiraga, N., Imamura, M., Iwao, E., Kamiya, N., Yamada, I., Kono, T., Onishi, M., Hirata, D., Mitsui, F., et al. (2011). Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J. Hepatology*. 54, 872–878.
- Okusaka, T., Aramaki, T., Inaba, Y., Nakamura, S., Morimoto, M., Moriguchi, M., Sato, T., Ikawa, Y., Ikeda, M., and Furuse, J. (2015). Phase I study of tivantinib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma: Distinctive pharmacokinetic profiles from other solid tumors. *Cancer Sci.* 106, 611–617.
- Orland, J.R., Wright, T.L., and Cooper, S. (2001). Acute hepatitis C. *Hepatology*. Baltimore, Md 33, 321–327.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30, 460–471.
- Ottosen, S., Parsley, T.B., Yang, L., Zeh, K., van Doorn, L.-J., van der Veer, E., Raney, A.K., Hodges, M.R., and Patick, A.K. (2015). In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 599–608.

Bibliographie

- Pang, P.S., Jankowsky, E., Planet, P.J., and Pyle, A.M. (2002). The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J.* *21*, 1168–1176.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* *25*, 635–646.
- Pasquinelli, C., Shoenberger, J.M., Chung, J., Chang, K.M., Guidotti, L.G., Selby, M., Berger, K., Lesniewski, R., Houghton, M., and Chisari, F.V. (1997). Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology* *25*, 719–727.
- Paul, D., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2014). Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land. *Cell Host Microbe* *16*, 569–579.
- Pawlotsky, J.-M., Feld, J.J., Zeuzem, S., and Hoofnagle, J.H. (2015). From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J. Hepatol.* *62*, S87–S99.
- Payen, J.-L. (2002). Histoire des hépatites II. Individualisation de l'hépatite épidémique et grandes hypothèses pathogéniques. 2097–2100.
- Payen, J.-L. (2003a). Histoire des hépatites III L'ère des antigènes et de la microscopie électronique.
- Payen, J.-L. (2003b). Histoire des hépatites IV Le miracle de la biologie moléculaire: la découverte des virus des hépatites C et E.
- Payen, J.-L. (2009). De la jaunisse à l'hépatite C (EDK).
- Pedersen, I.M., Cheng, G., Wieland, S., Volinia, S., Croce, C.M., Chisari, F.V., and David, M. (2007). Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* *449*, 919–922.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.-M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* *39*, 5–19.
- Perz, J.F., Armstrong, G.L., Farrington, L.A., Hutin, Y.J.F., and Bell, B.P. (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.* *45*, 529–538.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., and Hellen, C.U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* *12*, 67–83.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* *304*, 734–736.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* *282*, 938–941.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* *457*, 882–886.
- Ploss, A., Khetani, S.R., Jones, C.T., Syder, A.J., Trehan, K., Gaysinskaya, V.A., Mu, K., Ritola, K., Rice, C.M., and Bhatia, S.N. (2010). Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3141–3145.

Bibliographie

- Poenisch, M., Metz, P., Blankenburg, H., Ruggieri, A., Lee, J.-Y., Rupp, D., Rebhan, I., Diederich, K., Kaderali, L., Domingues, F.S., et al. (2015). Identification of HNRNPK as Regulator of Hepatitis C Virus Particle Production. *PLoS Pathog* *11*, e1004573.
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Héliot, L., Rouillé, Y., et al. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.* *7*, e1001278.
- Prince, A.M., Brotman, B., Huima, T., Pascual, D., Jaffery, M., and Inchauspé, G. (1992). Immunity in hepatitis C infection. *J. Infect. Dis.* *165*, 438–443.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA N. Y. N* *11*, 1640–1647.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* *9*, 32–45.
- Rizzetto, M. (1983). The delta agent. *Hepatol. Baltim. Md* *3*, 729–737.
- Roberts, A.W., Advani, R.H., Kahl, B.S., Persky, D., Sweetenham, J.W., Carney, D.A., Yang, J., Busman, T.B., Enschede, S.H., Humerickhouse, R.A., et al. (2015). Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics, and antitumour activity of the BCL2 inhibitor navitoclax in combination with rituximab in patients with relapsed or refractory CD20+ lymphoid malignancies. *Br. J. Haematol.* *170*, 669–678.
- Rosenquist, Å., Samuelsson, B., Johansson, P.-O., Cummings, M.D., Lenz, O., Raboisson, P., Simmen, K., Vendeville, S., de Kock, H., Nilsson, M., et al. (2014). Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor. *J. Med. Chem.* *57*, 1673–1693.
- Sainz, B., and Chisari, F.V. (2006). Production of Infectious Hepatitis C Virus by Well-Differentiated, Growth-Arrested Human Hepatoma-Derived Cells. *J. Virol.* *80*, 10253–10257.
- Sainz, B., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., et al. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* *18*, 281–285.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* *21*, 5017–5025.
- Schmitt, M., Scrima, N., Radujkovic, D., Caillet-Saguy, C., Simister, P.C., Friebe, P., Wicht, O., Klein, R., Bartenschlager, R., Lohmann, V., 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. *J. Virol.* *85*, 2565–2581.
- Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R.K., Kempf, B.J., Spaniel, C., Barton, D.J., and Lemon, S.M. (2012). Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 941–946.

Bibliographie

- Shirasaki, T., Honda, M., Shimakami, T., Horii, R., Yamashita, T., Sakai, Y., Sakai, A., Okada, H., Watanabe, R., Murakami, S., et al. (2013). MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J. Virol.* *87*, 5270–5286.
- Singaravelu, R., O'Hara, S., Jones, D.M., Chen, R., Taylor, N.G., Srinivasan, P., Quan, C., Roy, D.G., Steenbergen, R.H., Kumar, A., et al. (2015). MicroRNAs regulate the immunometabolic response to viral infection in the liver. *Nat. Chem. Biol.*
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* *18*, 175–189.
- Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* *3*, Article3.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J. Virol.* *80*, 11579–11588.
- Sourisseau, M., Michta, M.L., Zony, C., Israelow, B., Hopcraft, S.E., Narbus, C.M., Parra Martín, A., and Evans, M.J. (2013). Temporal Analysis of Hepatitis C Virus Cell Entry with Occludin Directed Blocking Antibodies. *PLoS Pathog* *9*, e1003244.
- Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* *291*, 1959–1962.
- Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* *2*, 2078–2095.
- Steinmann, D., Barth, H., Gissler, B., Schürmann, P., Adah, M.I., Gerlach, J.T., Pape, G.R., Depla, E., Jacobs, D., Maertens, G., et al. (2004). Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *J. Virol.* *78*, 9030–9040.
- Suffert, G., Malterer, G., Hausser, J., Viiliäinen, J., Fender, A., Contrant, M., Ivacevic, T., Benes, V., Gros, F., Voinnet, O., et al. (2011). Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. *PLoS Pathog.* *7*, e1002405.
- Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M., and Ganem, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* *435*, 682–686.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* *79*, 2689–2699.
- Sun, X., Zhang, J., Hou, Z., Han, Q., Zhang, C., and Tian, Z. (2015). miR-146a is directly regulated by STAT3 in human hepatocellular carcinoma cells and involved in anti-tumor immune suppression. *Cell Cycle Georget. Tex* *14*, 243–252.
- Tabor, E., Gerety, R.J., Drucker, J.A., Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H., Jackson, D.R., April, M., Barker, L.F., and Pineda-Tamondong, G. (1978). Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 463–466.

Bibliographie

- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 12481–12486.
- Tarang, S., and Weston, M.D. (2014). Macros in microRNA target identification: a comparative analysis of in silico, in vitro, and in vivo approaches to microRNA target identification. *RNA Biol.* *11*, 324–333.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* *435*, 374–379.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* *4*, e1000032.
- Tétreault, N., and De Guire, V. (2013). miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin. Biochem.* *46*, 842–845.
- Thorwald, J. (1962). *Histoire de la médecine dans l'antiquité*.
- Timpe, J.M., Stamatakis, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M.J., Harris, H.J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G.L., Balfe, P., et al. (2008). Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* *47*, 17–24.
- Tsai, W.-C., Hsu, S.-D., Hsu, C.-S., Lai, T.-C., Chen, S.-J., Shen, R., Huang, Y., Chen, H.-C., Lee, C.-H., Tsai, T.-F., et al. (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.* *122*, 2884–2897.
- Turner, N.C., Ro, J., André, F., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., Harbeck, N., Loibl, S., Huang Bartlett, C., Zhang, K., et al. (2015). Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* *373*, 209–219.
- Ura, S., Honda, M., Yamashita, T., Ueda, T., Takatori, H., Nishino, R., Sunakozaka, H., Sakai, Y., Horimoto, K., and Kaneko, S. (2009). Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *49*, 1098–1112.
- Valgimigli, M., Valgimigli, L., Trerè, D., Gaiani, S., Pedulli, G.F., Gramantieri, L., and Bolondi, L. (2002). Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation. *Free Radic. Res.* *36*, 939–948.
- Vogt, A., Scull, M.A., Friling, T., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Dorner, M., Gerold, G., Labitt, R.N., Rice, C.M., and Ploss, A. (2013). Recapitulation of the hepatitis C virus life-cycle in engineered murine cell lines. *Virology* *444*, 1–11.
- Voisset, C., and Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *96*, 413–420.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* *11*, 791–796.
- Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* *67*, 3338–3344.

Bibliographie

- Wang, X., Xu, X., Ma, Z., Huo, Y., Xiao, Z., Li, Y., and Wang, Y. (2011). Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA N. Y. N* 17, 1511–1528.
- Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* 140, 1334–1344.
- Webster, D.P., Klenerman, P., and Dusheiko, G.M. (2015). Hepatitis C. *Lancet* 385, 1124–1135.
- Westbrook, R.H., and Dusheiko, G. (2014). Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.* 61, S58–S68.
- Wieland, S., Makowska, Z., Campana, B., Calabrese, D., Dill, M.T., Chung, J., Chisari, F.V., and Heim, M.H. (2014). Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatol. Baltim. Md* 59, 2121–2130.
- Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H.R., Kauppinen, S., and Plasterk, R.H.A. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309, 310–311.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Witkos, T.M., Koscianska, E., and Krzyzosiak, W.J. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr. Mol. Med.* 11, 93–109.
- Witteveldt, J., Evans, M.J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A.M., Angus, A.G.N., Keck, Z.-Y., Fong, S.K.H., Pietschmann, T., Rice, C.M., et al. (2009). CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J. Gen. Virol.* 90, 48–58.
- Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog.* 6, e1001087.
- Xiao, F., Fofana, I., Heydmann, L., Barth, H., Soulier, E., Habersetzer, F., Doffoël, M., Bukh, J., Patel, A.H., Zeisel, M.B., et al. (2014). Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog.* 10, e1004128.
- Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P., and Prieto, J. (1998). Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244, 513–520.
- Xu, X., Chen, H., Cao, X., and Ben, K. (2007). Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. *J. Gen. Virol.* 88, 2504–2512.
- Zahid, M.N., Turek, M., Xiao, F., Thi, V.L.D., Guérin, M., Fofana, I., Bachellier, P., Thompson, J., Delang, L., Neyts, J., et al. (2013). The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatol. Baltim. Md* 57, 492–504.
- Zeisel, M.B., Cosset, F.-L., and Baumert, T.F. (2008). Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatol. Baltim. Md* 48, 299–307.
- Zeisel, M.B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., and Baumert, T.F. (2011). Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J. Hepatol.* 54, 566–576.

Bibliographie

- Zeisel, M.B., Pfeffer, S., and Baumert, T.F. (2013a). miR-122 acts as a tumor suppressor in hepatocarcinogenesis in vivo. *J. Hepatol.* *58*, 821–823.
- Zeisel, M.B., Lupberger, J., Fofana, I., and Baumert, T.F. (2013b). Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges. *J. Hepatol.* *58*, 375–384.
- Zeisel, M.B., Felmlee, D.J., and Baumert, T.F. (2013c). Hepatitis C virus entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *369*, 87–112.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* *32*, 4776–4785.
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* *24*, 138–148.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9294–9299.
- Zhu, Y.-Z. (2014). How hepatitis C virus invades hepatocytes: The mystery of viral entry. *World J. Gastroenterol.* *20*, 3457.
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H.J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R.G., Xiao, F., Turek, M., et al. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* *13*, 302–313.

Sophie PERNOT

Curriculum Vitae

DIPLOMES ET FORMATIONS UNIVERSITAIRES

- 2012/2015** : Doctorat Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie - Université de Strasbourg (**Soutenance prévue en Octobre 2015**)
- 2011/2012** : Master 2 Biochimie, Biologie Moléculaire & Cellulaire parcours Biologie et Génétique Moléculaire - Université de Strasbourg (Mention Bien, classée 2^{ème} sur 20)
- 2010/2011** : Master 1 Biochimie, Biologie Moléculaire Régulation Cellulaire - Université de Lorraine Nancy. (Mention Assez Bien, classée 7^{ème} sur 21)
- 2009/2010** : Licence Biologie Moléculaire et Biochimie - Université de Lorraine. (juillet 2010 - Mention Assez Bien, classée 36^{ème} sur 217)
- 2008/2009** DEUG Biologie Moléculaire – Université de Lorraine Nancy
- 2008** 1^{ère} année de licence sciences du vivant Passerelle S2 Bis Université de Lorraine Nancy
- 2007/2008** 1^{er} semestre de PCEM1 - Université Henri Poincaré Nancy
- 2007** Obtention du Bac S option science de la vie et de la terre – Lycée La Malgrange – Jarville (Mention Assez Bien)

STAGE ET EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

Oct. 2012 / Sept. 2015 : Doctorat en Biologie.

Bénéficiaire d'une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Thèse de recherche dans l'unité INSERM U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Université de Strasbourg. Directeurs de Thèse : Thomas BAUMERT et Mirjam ZEISEL

Rôle des micro-ARNs humains dans l'infection par le virus de l'hépatite C

Janvier 2015 : Journée d'observation au **service d'hépatogastro entérologie** avec le Dr HABERSETZER (Consultations et visite avec les internes) NHC Strasbourg

Depuis 2012 : Encadrement et formation de stagiaires de Licence M1 et M2 dans le cadre de la thèse de doctorat

Janvier-Juin 2012 : Stage de recherche de 6 mois dans le cadre du M2 à l'**IBMC CNRS-UPR 9002** dans l'unité Architecture et Réactivité de l'ARN, équipe Rétrovirus et virus à ARN Université de Strasbourg. Tuteur : Jean-Christophe PAILLART
Etude biochimiques des complexes traductionnels formés en présence des protéines Vif (VIH-1) et APOBEC-3G

Juillet-Aout 2011 : Stage de recherche volontaire de 2 mois à l'**IBMC CNRS-UPR 9002** dans l'unité Architecture et Réactivité de l'ARN, équipe Rétrovirus et virus à ARN, Université de Strasbourg. Tuteur : Catherine ISEL
Encapsidation et réassortiment des segments d'ARNg du virus influenza



135 route
d'Oberhausbergen,
67200 Strasbourg

Tél. 06.71.45.50.62

Email :

sophie.pernot3@gmail.com

Née le 17/03/1988

26 ans

Célibataire

Permis B

Janvier-Février 2011 : Stage de recherche de 2 mois dans le cadre du M1, dans l'unité des hépatites virales, à l'**Institut Pasteur du Maroc**, Casablanca.

Tuteur : Soumaya BENJELLOUN

Diagnostic et déterminations des souches virales dans l'infection par les virus du VHC et VHB

Juin-Juillet 2010 : Stage de recherche volontaire de 2 mois, unité AREMS, Université de Lorraine.

Tuteur : Lilia AYADI

Réalisation de constructions génétiques permettant l'étude de la traduction de la protéine Tat (VIH-1)

Juin-Août 2008 : Animatrice au Camp de vacance Cedar Lodge - Lawrence (MI-USA)

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Compétences linguistiques et informatiques

- Anglais: lu, écrit, parlé
- Espagnol: intermédiaire
- Maîtrise de Word, Excel, Power Point, Pub-Med, logiciel analyse de voie de signalisation cellulaire (miRsysteme, IPA), Banque de données miR (miRbase,miRDB), gène et protéines (NCBI)

Intérêt

- Sciences, équitation, taekwondo
- Jeu en ligne, jeu de société, cinéma, univers de Tolkien, voyages, cultures étrangères

PUBLICATIONS

2012 : R. MARQUET, S.X GUERRERO, S. BERNACCHI, **S. PERNOT**, J. BATISSE, J.C. PAILLART. Un facteur de transcription se fait complice du VIH-1 pour détruire les défenses cellulaires. *Medecine/Science, (News and Views)* Avril 2012

RESUME SELECTIONES POUR PRESENTATION POSTERS

2014: AASLD (Boston): **S. PERNOT**, S. BANDIERA, E. GIRARDI, A. WEISS, S. DURAND, W. RAFFELSBERGER, L. BRINO, S. PFEFFER, T.F. BAUMERT, M.B. ZEISEL. "Systematic identification of microRNAs functionally involved in the HCV life cycle"

2015: ANRS (Paris): **S. PERNOT**, S. BANDIERA, E. GIRARDI, A. WEISS, S. DURAND, W. RAFFELSBERGER, L. BRINO, S. PFEFFER, T.F. BAUMERT, M.B. ZEISEL. "Identification systématique des micro-ARNs impliqués dans le cycle viral du HCV"

2015: HCV meeting (Strasbourg)): **S. PERNOT**, S. BANDIERA, E. GIRARDI, A. WEISS, S. DURAND, W. RAFFELSBERGER, L. BRINO, S. PFEFFER, T.F. BAUMERT, M.B. ZEISEL. "Systematic identification of microRNAs functionally involved in the HCV life cycle"

RESUME SELECTIONES POUR PRESENTATION ORALE

2015: HCV meeting (Strasbourg): **S. PERNOT***, S. BANDIERA*, S. DURAND, T. YE, C. THUMANN, I. FOFANA, M.H. HEIM, S. PFEFFER, T. F. BAUMERT, M. B. ZEISEL "MicroRNA profiling in liver cells unravels HCV-induced up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes" * contribute equally.

Identification systématique des microARNs impliqués dans les relations virus-hôte au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C (HCV) est responsable de maladies chroniques du foie et l'une des principales causes de développement du carcinome hépatocellulaire (HCC). Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettent le développement d'un HCC suite à une infection chronique par le HCV restent incompris. Les microARN (miR), de petits ARNs non codants qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, sont connus pour jouer un rôle important dans l'homéostasie cellulaire du foie. De plus en plus d'études suggèrent que l'infection par le HCV induit la modification de réseaux intracellulaires impliquant les miRs hépatiques contribuant au développement des lésions du foie, y compris le HCC. En utilisant des techniques d'analyse systématiques, nous avons identifié des miRs qui modulent le cycle viral du HCV mais également des miRs modulés lors de l'infection par le HCV. Cette analyse globale des interactions entre les miRs de l'hôte et le HCV améliore les connaissances actuelles sur les interactions entre le HCV et l'hôte qui contribuent vraisemblablement à la tumorigenèse dans le foie, et ouvre des perspectives pour de potentielles nouvelles approches pour prévenir et/ou traiter le HCC chez les patients infectés par le HCV.

Mots-clés : virus de l'hépatite C, microARN, carcinome hépatocellulaire

Hepatitis C virus (HCV)-induced chronic liver disease is one of the leading causes of hepatocellular carcinoma (HCC). However, the molecular mechanisms that enable HCC development following chronic HCV infection remain poorly understood. MicroRNAs (miRs), small non coding RNAs that regulate gene expression at a post-transcriptional level have been reported to play an important role in cellular homeostasis within the liver. Increasing evidence suggests that HCV infection induces alteration of intrahepatic miR networks and that deregulation of miRs contributes to liver disease including HCC. Using high-throughput screening and RNA sequencing, we identified miRs that modulate the HCV life cycle and miRs that are modulated upon HCV infection. This comprehensive analysis of the HCV-host miR network improves the current knowledge of the HCV-host interactions that likely contribute to tumorigenesis in the liver and opens perspectives for novel potential approaches to prevent and/or treat HCC in HCV-infected patients.

Keywords: hepatitis C virus, microRNA, hepatocellular carcinoma