

THÈSE DE DOCTORAT

Délivrée par : *l'Université de Lille*
Discipline ou spécialité : Virologie
Ecole doctorale de biologie Santé de Lille

Etude sur l'interaction entre le virus de l'hépatite C et le facteur cellulaire proviral GBF1

Présentée et soutenue publiquement par :

LEBSIR Nadjat

Le : 19 Décembre 2018

Membres du JURY

Pr. Didier HOBER	Président
Dr. François HELLE	Rapporteur
Dr. Emmanuelle BLANCHARD	Rapporteur
Dr. Cathy JACKSON	Examinatrice
Dr. Yves ROUILLÉ	Directeur de thèse

Ecole doctorale : Ecole doctorale de biologie Santé de Lille
Unité de recherche : CNRS UMR8204 – Inserm U1019
Équipe : Virologie moléculaire et cellulaire dirigée par Dr. Jean DUBUISSON



Remerciements

A la fin de la rédaction de cette thèse, j'étais convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. La réalisation de ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bienveillance et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser autant que « future-chercheuse ».

Aux membres de mon jury, Didier Hober, Cathy Jackson, François Helle, Emmanuelle Blanchard,

Pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail

Pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Sincères remerciements.

A Jean Dubuisson,

Merci de m'avoir accueillie chaleureusement dans ton laboratoire, j'y ai passé de très bons moments tant au niveau professionnel que relationnel. Je te remercie pour ta bienveillance attentive et pour ta disponibilité.

A Yves Rouillé, mon directeur de thèse,

Un immense merci...

De la confiance que tu m'as accordé dès le début de ma thèse,

Des précieux conseils dans les réflexions et expériences scientifiques tout au long de ma thèse, qui ont fondé la base de mes compétences scientifiques,

De m'avoir guidée et encouragée dans la réalisation de ce travail,

D'avoir été le précurseur (sans faire exprès certainement) d'une relation qui va aboutir, très prochainement, au mariage qui attend la fin de cette thèse pour avoir lieu (PS : t'y es invité au 1eres loges)

A "la dream team", Sophana, Maliki et Czes,

Lorsque je rembobine la pellicule des meilleurs moments et la pellicule du bâtisseur de ces trois années de thèse, c'est certainement vous que je retrouve.

A Sophana, Je ne cesserais de te remercier pour ta gentillesse, ta bienveillance, ta présence, ton soutien, ta bonne humeur, ton humour parfois décalé, tes conseils, ton oreille attentive, etc. T'as été à la fois l'ami confident, le père bienveillant, le pote avec qui on ne cesse de rigoler. Merci pour tout.

A Maliki, mon binôme de bataille, mon coéquipier qui a partagé les meilleurs et les pires moments de ces trois années. Comment aurait été cette période si tu n'étais pas ? Je te remercie infiniment pour ton soutien, ta présence, ta sympathie. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

A Czeslaw, même si tu me faisais peur au début avec ton allure imposante, très vite je me suis rendue compte que t'es, en réalité, le vrai père Noël. Mais alors quelle chance de déjeuner tous les jours avec le père Noël et de prendre la pause-café avec. Surtout que tous les jours le cadeau que tu m'offrais était de me donner le sourire parfois des fous-rires, lorsque même tout n'allait plus bien. Je t'en remercie beaucoup.

A « la team des mamans », Nathalie, Muriel, Claire, Cécile-Marie, Karine, Anne,

Vous étiez la source de douceur pour moi, toujours serviables, et disponibles lorsque j'en avais besoin. Je n'hésitais pas à venir vous voir si j'avais des questions ponctuelles, vous me mettiez toujours à l'aise. Très attentives et soucieuses si j'avais un souci ou si je tombais malade. Je vous remercie infiniment de votre soutien et encouragement.

A Laurence,

Je tiens particulièrement à te remercier pour ton soutien et tes nombreux conseils, pour les discussions, qu'on a partagé ensemble, scientifiques ou personnelles. Tu me rappelais beaucoup ma mère avec ta bienveillance et aussi le parfum que tu portes. Merci beaucoup pour tes encouragements et pour ta sympathie.

A Sandrine,

Tu étais la personne que je pouvais demander conseil si Yves était absent. Tu as toujours été disponible, réactive et serviable quand j'en avais besoin. Mes vifs remerciements.

A « la team des super Nanas », Rehab, Ariane, Anabelle, Adeline, Cyrine, Loweise, Marie, Lydia, Juliette, Laura et Laure,

Vous étiez vraiment les personnes qui apportaient de la bonne ambiance au labo. J'adorais les pauses thé qu'on prenaient ensemble. Vous avez rendu mes années de thèse aussi sucrées que les gâteaux que vous rameniez souvent. Je vous en remercie.

A « la team des supermen », Juliano, Kévin, Thibaut, Martin, Thomas...

Je vous remercie pour votre sympathie et votre soutien. Je savais que je pouvais compter sur vous si j'avais besoin de quelque chose ou d'un gros carton à soulever ou d'un élément très haut sur une étagère. Merci pour les réunions entre collègues que vous organisiez en dehors du labo qui me permettaient de décompresser. Merci pour tout.

A mes amis, Lina, Carla, Nabil, Pauline,

Je vous adresse toute ma gratitude pour votre présence, pour votre sympathie, pour vos encouragements.

A Rayan, mon futur-époux,

Je te dédie cette thèse.

Je te remercie et je t'en suis reconnaissante, d'abord pour ta patience quand je perdais patience, de ton soutien lorsque je manquais de confiance, de tes encouragements lorsque j'étais à court de motivation. Je ne te remercierais jamais assez pour ta présence durant toutes ces années, tu as partagé chaque moment de cette thèse avec moi. Tu as vécu cette thèse comme si c'était la tienne. Cette thèse était pour nous une belle épreuve en même temps dure, qu'on a bien surmonter ensemble et qui nous a fait gagner beaucoup de maturité. Mille mercis.

A mes sœurs, Amel et Soumia,

Un immense merci à mes sœurs qui ont toujours su me rendre le sourire lorsqu'il m'arrivait de le perdre, qui ont toujours trouver les mots pour me motiver et m'encourager. Je vous passe le flambeau et je vous souhaite de la réussite pour votre carrière et de l'épanouissement dans votre vie.

A mes parents,

Sans eux je n'aurais pas été ce que je suis aujourd'hui. Mes remerciements les plus profonds à mes parents qui ont toujours cru en moi. Merci pour votre soutien et votre présence qui brisent la distance. Je vous dédie cette thèse car je sais combien elle a de valeur pour vous. C'est un honneur pour moi de vous honorer.

Résumé

Etude sur l'interaction entre le virus de l'hépatite C et le facteur cellulaire proviral GBF1

GBF1 a émergé autant que facteur cellulaire nécessaire pour la réplication de plusieurs virus à ARN. Au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC), GBF1 est essentiel pour les étapes précoces de la réplication, bien qu'il soit dispensable lorsque celle-ci est établie. Afin de mieux comprendre la fonction de GBF1 dans la régulation de l'infection par le VHC, nous avons tenté d'explorer les interactions entre GBF1 et les protéines du VHC. Ainsi, grâce à l'approche du double hybride en levure et par co-immunoprécipitation et par PLA (*proximity ligation assay*), nous avons pu montrer que NS3 interagit avec GBF1. De plus, NS3 semble interférer avec la localisation subcellulaire de GBF1 dans des cellules exprimant NS3. Cette interaction a été retrouvée entre le domaine protéase de NS3 et Sec7, le domaine catalytique de GBF1. Un crible sur des mutations altérant l'interaction GBF1-NS3, par double hybride en levure, a permis révéler un mutant NS3 (N77D de la souche Con1) qui est non-réplicatif malgré une activité protéase bien conservée. De plus, le résidu muté est exposé à la surface, ce qui suggère qu'il pourrait appartenir à la zone d'interaction de NS3 avec GBF1. La mutation correspondante dans la souche JFH1 produit le même phénotype que la souche Con1 du VHC. L'ensemble des résultats révèlent l'existence d'une interaction entre GBF1 et NS3 et suggèrent qu'une altération de cette interaction est délétère pour la réplication du VHC.

MOTS CLÉS : GBF1, ADP-ribosylation factor, virus de l'hépatite C, réplication vira

Abstract

Exploring interactions between hepatitis C virus proteins and the proviral cellular factor GBF1

GBF1 has emerged as a host factor required for the replication of RNA viruses of different families. During the hepatitis C virus (HCV) life cycle, GBF1 performs a critical function at the onset of replication, but is dispensable when the replication is established. To better understand how GBF1 regulates HCV infection, we have looked for interactions between GBF1 and HCV proteins. NS3 was found to interact with GBF1 in yeast two-hybrid, in co-immunoprecipitation and in proximity ligation assays, and to interfere with GBF1 function and alter GBF1 intracellular localization in cells expressing NS3. The interaction was mapped to the Sec7 domain of GBF1 and the protease domain of NS3. A yeast two-hybrid screen for mutations altering NS3-GBF1 interaction yielded an NS3 mutant (N77D, Con1 strain) that is non-replicative despite conserved protease activity. The mutated residue is exposed at the surface of NS3, suggesting it could be part of the domain of NS3 that interacts with GBF1. The corresponding mutation in JFH-1 strain (S77D) produces the same phenotype. Our results provide evidence for an interaction between NS3 and GBF1 and suggest that an alteration of this interaction is detrimental to HCV replication.

KEYWORDS: GBF1, ADP-ribosylation factor, hepatitis C virus, viral replication

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Résumé.....	4
Abstract.....	5
TABLE DES MATIERES	6
TABLES DES FIGURES.....	9
Liste d'abréviations.....	10
<i>Introduction.....</i>	<i>14</i>
I. HEPATITE C.....	15
1. Histoire.....	15
2. Epidémiologie	15
3. Transmission.....	17
4. Pathogénèse et évolution de la maladie.....	18
4.1. Hépatite C aiguë.....	18
4.2. Hépatite C chronique	19
5. Diagnostic.....	20
5.1. Tests indirects.....	21
5.2. Tests directs.....	21
6. Génotypage.....	22
7. Réponse immunitaire contre le VHC	22
7.1. Réponse immunitaire innée	23
7.2. Réponse immunitaire adaptative.....	24
7.2.1. La réponse immunitaire cellulaire :	25
7.2.2. La réponse immunitaire humorale :	25
7.3. Echappement immunitaire :	26
8. Traitements	28
Evolution des traitements.....	28
9. Perspectives de vaccination.....	30
II. LE VIRUS DE L'HEPATITE C :	32

1.	Classification et distribution génétique	32
2.	La particule virale.....	33
3.	Organisation génomique.....	35
3.1.	5'UTR et l'IRES du VHC	35
3.2.	3'UTR	36
4.	Les protéines virales.....	37
4.1.	La protéine core	37
4.2.	La protéine ARFP	38
4.3.	Les glycoprotéines d'enveloppe.....	39
4.4.	La protéine p7	41
4.5.	La protéine NS2	42
4.6.	La protéine NS3-4A.....	44
4.6.1.	NS3-protéase.....	44
4.6.2.	NS3-hélicase.....	46
4.7.	La protéine NS4B	47
4.8.	La phosphoprotéine NS5A.....	49
4.9.	La protéine NS5B	51
5.	Modèles d'étude	52
5.1.	Les systèmes de culture <i>in vitro</i>	52
5.1.1.	Système de réplicon	52
5.1.2.	Particules rétrovirales pseudotypées (VHCpp)	53
5.1.3.	Le système de culture cellulaire (VHCcc).....	55
5.2.	Modèles animaux.....	56
5.2.1.	Chimpanzés	56
5.2.2.	Les souris génétiquement humanisées.....	57
5.2.3.	Les souris chimériques xénotransplantées.....	58
6.	Cycle viral	59
6.1.	Attachement, entrée et fusion	59
6.2.	Traduction et maturation.....	60
6.3.	Réplication.....	60
6.3.1.	Passage de la traduction à la réplication	61
6.3.2.	Régulation de la réplication par les facteurs viraux	61
6.3.3.	Régulation de la réplication par les facteurs cellulaires.....	62
6.3.4.	Structure et organisation du <i>membranous web</i>	64
6.4.	Assemblage et sécrétion	65

III. DYNAMIQUE MEMBRANAIRE ET RÉPLICATION VIRALE.....	68
La régulation du trafic vésiculaire dans la cellule	68
1. Le rôle de la superfamille Ras dans la régulation du trafic vésiculaire.....	70
1.1. Les protéines G de la famille Arf	71
1.2. Le rôle des GEF dans l'échange nucléotidique.....	72
1.3. Le rôle des GAP dans la régulation des Arf	74
1.4. Inhibiteurs des voies de signalisation des Arf	75
1.4.1. La bréfeldine A (BFA)	75
1.4.2. Le Golgicide A (GCA)	76
1.4.3. QS11.....	77
2. La régulation de GBF1 et ArfGAP1 au niveau des membranes.....	77
3. L'effet de la BFA sur les infections virales	78
<i>Objectifs</i>	81
<i>Résultats</i>	84
<i>Discussion & conclusions</i>	89
Références bibliographiques	95
<i>Annexe</i>	126

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence globale de l'infection par le virus de l'hépatite C et la répartition des différents génotypes du VHC à travers le monde. _____	17
Figure 2 : Evolution de l'infection par le HCV _____	19
Figure 3 Les étapes d'une réponse immunitaire innée antivirale contre le VHC. _____	27
Figure 4: Evolution des traitements depuis l'identification du virus HCV. _____	29
Figure 5:Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du VHC. _____	33
Figure 6 : Représentation schématique de la particule VHC. _____	34
Figure 7 : Représentation schématique du génome et de la polyprotéine du HCV. _____	36
Figure 8 : Représentation structurelle et fonctionnelle de la protéine Core du VHC. _____	38
Figure 9 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC. _____	40
Figure 10 : La protéine p7 du VHC. _____	42
Figure 11 : Structure de NS2 du VHC. _____	43
Figure 12 : Modèle représentatif de la protéine NS3/4A associée à la membrane du RE. _____	44
Figure 13 : Représentation schématique de la NS4B associée à membrane du RE. _____	49
Figure 14 : Structure de la protéine NS5A associée à la membrane du RE. _____	50
Figure 15 : Structure de la polymérase NS5B. _____	52
Figure 16 : Principe de la génération du système réplicon du HCV. _____	53
Figure 17 : Représentation schématique du système HCVpp. _____	54
Figure 18 : Principe de génération du système de culture HCVcc. _____	56
Figure 19 : Structure en 3D des réarrangements membranaires induits par la réplication du VHC 16h post-infection. _____	65
Figure 20 : Les étapes du cycle viral du VHC. _____	67
Figure 21 : Les voies de transport vésiculaire et les protéines de manteau. _____	69
Figure 22 : Formation des vésicules, transport et fusion. _____	70
Figure 23 : Les protéines de la famille Arf. _____	72
Figure 24 : Les différentes GEF ou GAP régulant les Arf. Le domaine sec7 est commun pour les GEF tandis que les GAP possèdent un domaine GAP. _____	73
Figure 25 : Changement morphologique de la protéine Arf suite à son activation. _____	74
Figure 26 : Schéma illustratif de l'inhibition des protéines Arf par la BFA. _____	76
Tableau 1: Caractéristiques des DAA de la deuxième génération _____	30
Tableau 2 : Les virus inhibés par la BFA. _____	80

Liste d'abréviations

A

ALAT	Alanine aminotransférase
Alb-uPA	Albumin-urokinase Plasminogen Activator
ALPS	Amphipathic Lipid Packing Sensor
AP	Adaptor protein
AP	Clathrin adaptor protein
ApoB	Apolipoprotéine B
ApoE	Apolipoprotéine E
ARF	ADP Ribosylation Factor
ArfGAP1	Arf GTPase-activating protein 1
ARFP	Alternative Reading Frame Protein
Arl	ARF like protein
ATGL	Adipose triglyceride lipase

B

BARS	Brefeldin A-dependent ADP Ribosylated Substrate
bDNA	Branched DNA
BFA	Bréfeldine A
BIG1	Brefeldin A-inhibited Guanine exchange factor 1
BIG2	Brefeldin A-inhibited Guanine exchange factor 2

C

CERT	Ceramide-transfer protein
CIDEB	Cell death-Inducing DFFA-like Effector B
CLDN-1	Claudine 1
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMS	Cellule Mononucléée du Sang
COP-I / COP-II	Coat protein-I/II
CVB3	Coxsackievirus B3

D

DAA	Direct acting antivirals
DAG	Diacylglycérol
DC	Dendritic cells
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing
DExH	DEAH box helicase
DMV	Vésicules à double membrane

E

EEA1	Early Endosome Antigen 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EIA	Enzyme ImmunoAssay
eIF2	Eukaryotic Initiation Factor 2
eIF3	Eukaryotic Initiation Factor 3
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV	Virus de l'encéphalomyocardite
EWI-2wint	EWI-2 without its N-terminus

F

FAH Fumarylacetoacetate hydrolase
FAS Fatty acid synthase
FKBP8 FK506-binding protein
FRG Fah/Rag2/Il2rg

G

GAP Facteur d'activité GTPasique
GBF1 Golgi-associated Brefeldin A-resistant Factor 1
GCA Golgicide A
GEF Facteur d'échange nucléotidique
GFLV Grapevine Fanleaf Virus
GFP Protéine verte fluorescente
GGA Golgi-localised Gamma-ear containing ARF binding protein
GL Gouttelette Lipidique

H

HDL Lipoprotéine de forte densité
HMG-CoA 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A
HNANB Hepatitis non-A, non-B
HSH Rapports sexuels avec des hommes
Hsp90 Heat Shock Protein 90
HSV Herpes Simplex Virus
HVR1 Hypervariable Region 1

I

IFN Interféron
IL-12 interleukin-12
IPS-1 Interferon Promoter Stimulator protein 1
IRES Site interne d'entrée des ribosomes
IRF3 Interferon regulatory factor 3,
ISG IFN-stimulated genes
ITAF IRES-TransActing Factors

L

L-SIGN Liver/lymph node-Specific Intracellular adhesion molecule-3-
LD Lipid droplet
LDL Lipoprotéine de faible densité
LDL-R Récepteur des lipoprotéines de faible densité
LEL Large boucle extracellulaire
LPL Lipoprotéine lipase
LTR Long Terminal Repeat
LVP Lipo-viro particles

M

MAVS Mitochondrial Antiviral Signaling protein
MDA5 Melanoma Differentiation-Associated protein 5
mDC Myeloid dendritic cells
MHV Virus de l'hépatite murine
MLV Virus de la leucémie murine
MTP Protéine microsomale de transfert
MW membranous web

N

NAT Tests d'amplification d'acides nucléiques
NK Natural Killer
NRK Normal Rat Kidney
NTP Nucleoside triphosphate

O

OCLN Occludine
ORF Cadre de lecture ouvert
OSBP Oxystérol binding protein

P

PAMP Pathogen-associated molecular patterns
PBS Primer Binding Site
pDC plasmacytoid dendritic cells
PEG Polyéthylène-Glycol
pFP putative fusion peptide
PH Pleckstrin Homology
PHH hépatocytes primaires humains
PI4K Phosphatidylinositol 4-Kinase
PI4P Phosphatidylinositol 4-Phosphate
PIP5K Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase
PKR Protein-kinase R
PLD Phospholipase D
PPlase Peptidyl-Prolyl cis-trans-Isomérase
PPT Polypurine Tract
PRR Pattern recognition receptors
PTB Polypyrimidine-Tract-Binding protein
PV Poliovirus

R

RE Reticulum Endoplasmique
RIG-I Retinoic acid-Inducible Gene-I
RMN Résonance magnétique nucléaire
RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction

S

SAA Serum Amyloide A
SCID Severe Combined ImmunoDeficiency
SFV Virus de la forêt de Semliki
SIDA Syndrome d'immunodéficience acquise
SM Sphingomyéline
SMV Vésicules à simple membrane
SNARE Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
SR-BI Scavenger Receptor type B class I
SREBP Sterol regulatory element-binding protein
STAT-C Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV
STING Stimulator of interferon genes
SVR Sustained virological response

T

TBC1D20 TBC1 domain family, member 20
TGN Trans-Golgi Network
Th T helper
TLR3 Toll-Like Receptor 3
TMA Transcription-Mediated Amplification
TMD Domaine transmembranaire

TRIF Toll/IL-1 Receptor domain-containing adapter inducing interferon β

U

UPR Unfolded Protein Response

V

VAP-A/B Vesicle-Associated membrane protein-associated Protein-A/B

VHA Virus de l'Hépatite A

VHB Virus de l'Hépatite B

VHC Virus de l'Hépatite C

VHCcc Virus de l'Hépatite C produit en culture cellulaire

VHCpp Pseudoparticules du virus de l'hépatite C

VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine

VISA Virus-Induced-Signaling Adapter

LDL Lipoprotéine de très faible densité

VLP Virus-Like Particle

VSV Virus de la Stomatite Vésiculaire

W

W.H.O. World Health Organization

3'NC 3' non-codante

4hEF quatre récepteurs d'entrée humains

5'NC 5' non-codante

Introduction

I. HEPATITE C

1. Histoire

Avec l'arrivée des tests sérologiques, dans les années 70, permettant de détecter les hépatites A et B, il était surprenant de retrouver que plus de 75% de cas d'hépatites post-transfusionnelles ne soient dus ni à une infection par le VHA ni par le VHB (Feinstone et al., 1975)(Alter et al., 1975). Dès lors émergea la notion de l'hépatite non-A non-B (HNANB)(Berman et al., 1979), une maladie qui s'avérait être responsable de l'apparition de lésions hépatiques dans la majorité des cas et qui engendrait une cirrhose hépatique dans 20% des cas d'infections chroniques (Houghton, 2009). Cette terminologie provisoire de HNANB a duré 15 ans avant d'aboutir à la découverte de deux agents viraux responsables de ces hépatites non-A non-B. Ce fut en 1989 qu'un virus responsable d'hépatite non-A non-B transmise par voie parentérale a été identifié et a été nommé virus de l'hépatite C (Choo et al., 1989). Peu de temps après, fut identifié le deuxième agent infectieux des HNANB transmises par voie entérale et désigné virus de l'hépatite E(Reyes et al., 1990).

Le début de la recherche sur l'hépatite C s'est porté sur des chimpanzés et a permis de montrer dans un premier temps qu'il s'agissait d'un virus enveloppé induisant des vésicules membranaires caractéristiques au sein du cytoplasme des hépatocytes de chimpanzés infectés(Shimizu et al., 1979)(Bradley et al., 1985). Une approche moléculaire ambitieuse a permis de cloner le virus. L'équipe de Dr Houghton a utilisé des sérums de chimpanzés avec de grands titres infectieux pour établir une banque de cDNA en phages bactériens. Un immunocriblage de cette banque a été réalisé avec un sérum de patient infecté. Un seul clone a été isolé parmi un million de clones criblés, puis identifié par sa séquence comme étant un nouveau virus de la famille *Flaviviridae*. Ce virus a été nommé virus de l'hépatite C (Choo et al., 1989)

2. Epidémiologie

L'hépatite C compte aujourd'hui une grande prévalence mondiale et est considérée comme la 7^{ème} cause de mortalité dans le monde. Il y a un peu moins d'une décennie on estimait encore qu'environ 180 millions de personnes étaient infectées dans le monde. Le dernier rapport épidémiologique établi par l'organisation mondiale de la santé estime aujourd'hui une prévalence de 71 millions de personnes infectées soit 1% de la population mondiale (figure1) (Blach et al., 2017). Bien que le nombre de personnes infectées par le VHC ait globalement baissé ces dix

dernières années, l'incidence des complications qui en résulte, dont les cirrhoses et les cancers, risque encore d'augmenter dans la prochaine décennie. Cette chute de prévalence est en partie due à l'augmentation de la mortalité en raison de complications hépatiques liées à l'hépatite C, en Afrique notamment et principalement chez les personnes âgées (Blach et al., 2017). L'hépatite C continue donc à être un problème majeur de santé publique avec une prévalence 7 fois supérieure à celle du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) et avec un nombre de décès par an estimé à environ 1,3 millions, ce qui est un taux comparable à celui du SIDA et de la tuberculose.

Ceci s'explique notamment par le fait que les sujets infectés ne présentent souvent pas de symptômes durant les premières 20 à 30 années d'infection. D'autre part, le système de surveillance de l'infection par le VHC est peu performant et la politique de dépistage systématique a tendance à négliger les populations marginalisées dont font partie les sans-abris, les migrants, les toxicomanes, etc.

La prévalence de l'hépatite C est distribuée de manière hétérogène autour du monde. Une plus grande prévalence est estimée dans la région de la méditerranée orientale (2,3%) dont la majeure cause de transmission de l'infection demeure le mode d'injections insécurisées. En Europe, environ 1,5% de la population, soit 5,6 millions de personnes, seraient chroniquement infectées. Concernant l'Europe, la plus grande prévalence concerne les consommateurs actifs de drogues injectables (la toxicomanie intraveineuse) qui est estimée de 44%. Les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) et les professionnels du sexe ont une prévalence qui aujourd'hui est estimée de 4% et 11%, respectivement. (Hope et al., 2014)(Papatheodoridis et al.)

En ce qui concerne la France, environ 192 700 personnes seraient infectées par le virus soit une prévalence de 0,42% de la population générale, ce qui ne fait pas de la France un pays de forte endémie (Brouard et al., 2017).

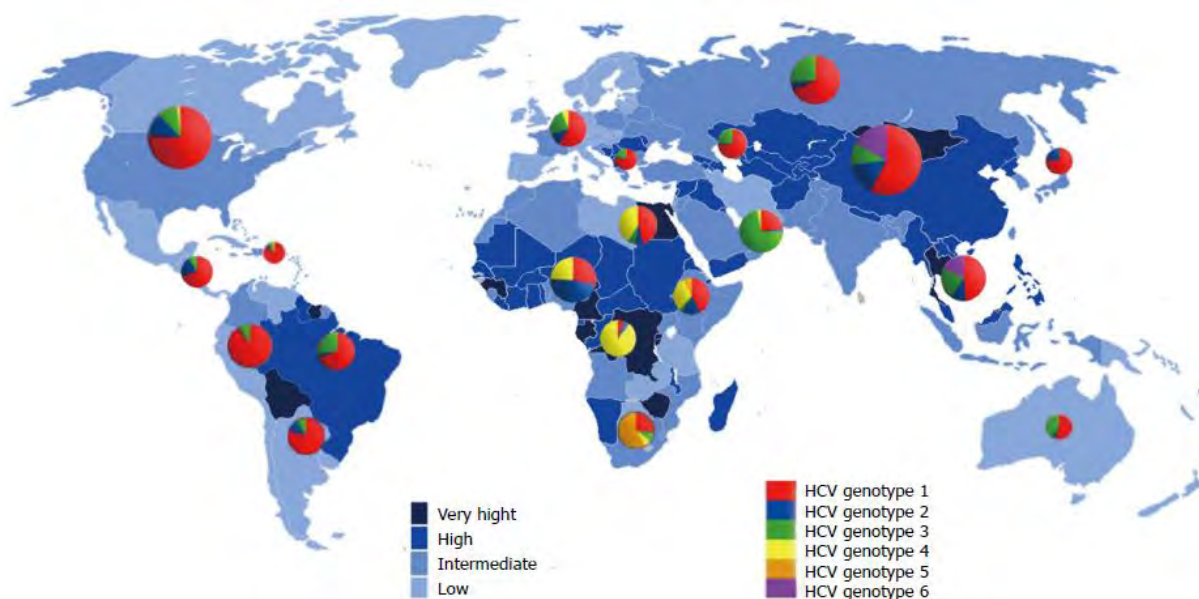


Figure 1 : Prévalence globale de l'infection par le virus de l'hépatite C et répartition des différents génotypes du VHC à travers le monde.

(Daw et al., 2016)

3. Transmission

Les différents modes de transmission varient d'un pays à l'autre et cela est fortement lié aux pratiques culturelles et à l'efficacité et la qualité des procédures médicales en matière d'hygiène et de sécurité sanitaires.

La transmission iatrogénique a été à l'origine d'une épidémie sans précédent à travers les transfusions sanguines avant la découverte du virus, ce qui est la principale cause de la haute prévalence dans la population plus âgée, notamment dans les pays de la méditerranée. Par exemple, l'Égypte connaît actuellement la plus grande prévalence en raison d'une transmission iatrogène suite à une campagne nationale de traitement contre la schistosomiase qui s'est déroulée dans des conditions d'hygiène déplorables en utilisant du matériel contaminé. La contamination nosocomiale demeure encore prédominante dans les pays en voie de développement et les pays pauvres (Lavanchy, 2009)(Blach et al., 2017)

La mise en place de méthodes de prévention et l'amélioration de sécurité du système d'approvisionnement en sang vers les années 90 a limité la transmission du VHC parmi les cohortes des plus jeunes, cependant l'utilisation commune de matériel d'injection contaminé par les consommateurs de drogues injectables est aujourd'hui considéré comme le principal mode de transmission du VHC notamment dans les pays industrialisés (Lavanchy, 2009) (Santos and Herrine, 2010) (Ansaldi et al., 2014)(Preciado et al., 2014).

La transmission sexuelle du VHC ne survient pas fréquemment contrairement au virus de l'hépatite B qui peut être contracté par voie mucosale. Le risque d'une contamination par voie périnatale est très faible. Néanmoins, une co-infection avec le VIH peut augmenter ce risque de transmission verticale lors de l'accouchement. (Lavanchy) (Alter, 2007)

4. Pathogénèse et évolution de la maladie

L'hépatite C est une maladie évolutive à long terme. La transition de la phase aiguë de l'infection vers la phase chronique est le plus souvent asymptomatique. L'hépatite C conduit dans la majorité des cas (75-80%) à une persistance de l'infection et peut progresser vers la chronicité, évoluer en cirrhose dans 10 à 20% des cas sur une période d'environ 20 à 30 ans et peut aboutir dans certains cas à un carcinome hépatocellulaire (Dhingra et al., 2016). (Figure 2)

4.1. Hépatite C aiguë

La phase aiguë de l'infection par le VHC est le plus souvent asymptomatique, son diagnostic est par conséquent relativement difficile à établir. Toutefois, pour les personnes dont la phase aiguë est symptomatique, les signes cliniques sont dans la majorité des cas aspécifiques d'une atteinte au niveau du foie et se manifestent plutôt par symptômes pseudo-grippaux tel qu'une fatigue importante, des nausées, des douleurs abdominales, une perte d'appétit, de la fièvre etc. (Westbrook and Dusheiko, 2014), Dans d'autres cas, certaines personnes développent des signes plus apparents comme une jaunisse et des urines foncées, des symptômes plus spécifiques d'un dysfonctionnement du foie (Deterding et al., 2009)(Loomba et al.). Les cas d'une hépatite fulminante causée par le VHC sont très rares(Farci et al., 1999).

Ce stade de l'infection est caractérisé par l'apparition de marqueurs biologiques. Tout d'abord, la détection de l'ARN viral est dès lors possible au bout d'une semaine jusqu'à 3 semaines après contamination, suivie d'une augmentation transitoire des concentrations sériques de marqueurs hépatiques, notamment l'alanine aminotransférase (ALAT), indiquant ainsi une atteinte du foie. Les valeurs de ces enzymes peuvent dépasser 10 fois le taux normal avec également une augmentation concomitante de la bilirubine sérique. La séroconversion commence à apparaître à environ un mois après la détection de la virémie(Westbrook and Dusheiko, 2014)(Maasoumy and Wedemeyer, 2012).

Pour certaines personnes, la maladie est spontanément résolutive et l'ARN viral devient indétectable au bout de 3 à 4 mois après le début de l'infection aiguë. Malheureusement, la clairance spontanée de l'infection par le VHC ne se produit que dans une minorité des cas, puisque 54 à 86% des patients infectés développent une chronicité de l'infection(Maasoumy and Wedemeyer, 2012). Un caractère symptomatique de la phase aiguë pourrait être prédictif de la

clairance virale. En effet, des méta-analyses pertinentes ont permis de montrer que l'incidence d'une clairance spontanée du VHC est importante chez une cohorte de patients qui ont manifesté des signes cliniques apparents lors de la phase aiguë de l'infection (Micallef et al., 2006) (Wang et al., 2007). Ces observations suggèrent qu'une plus forte réponse immunitaire chez ces patients, responsable de l'apparition de symptômes durant l'infection aiguë, conduirait à l'élimination du VHC.

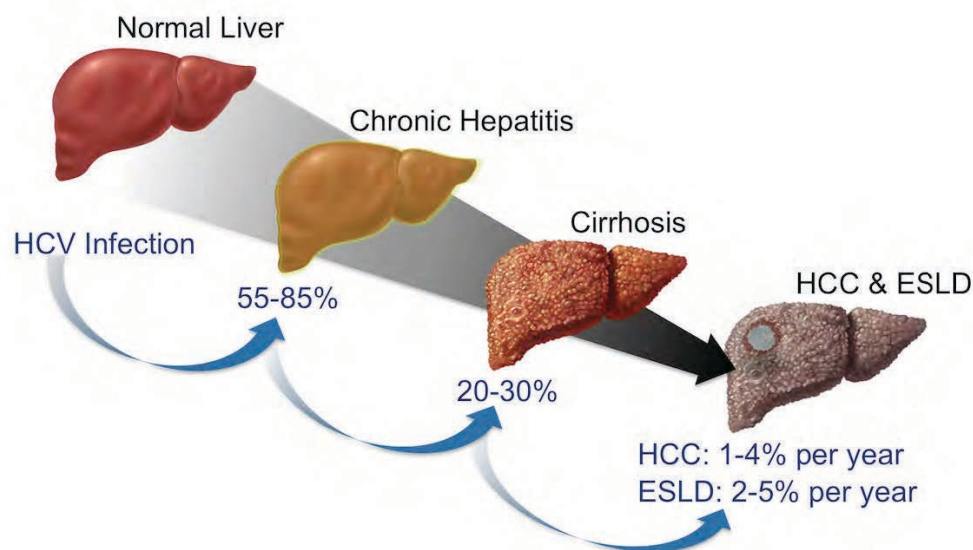


Figure 2 : Evolution de l'infection par le HCV

Suite à une primo-infection par le VHC, environ 55 à 85 % des personnes infectées développent une infection chronique. Parmi cette proportion, entre 20 et 30 % développent éventuellement une cirrhose hépatique liée au VHC. Ces patients ont 2 à 7% de risque de développer une insuffisance hépatique terminale (ESLD) ou un hépatocarcinome (HCC). (Lingala and Ghany, 2015)

4.2. Hépatite C chronique

La progression de l'hépatite C chronique est lente et insidieuse. Le taux moyen de chronicité de l'hépatite C est d'environ 75 à 85 %, mais la progression peut varier selon plusieurs facteurs tel que l'âge, le sexe, la race et le statut immunitaire (Chen and Morgan, 2006).

La majorité des patients infectés chroniquement par l'hépatite C présentent des signes physiques bénins à modérés, notamment au cours des 20 premières années. Les signes les plus communs sont une fatigue intermittente, une anorexie, des nausées, des malaises abdominaux variant d'une douleur sourde à une douleur au quadrant supérieur droit plus vive (Hoofnagle).

L'hépatite C chronique est d'autre part marquée par la persistance de l'ARN du VHC d'au moins six mois après le début de l'infection. Durant le passage de la phase aiguë à la phase

chronique, les taux d'ARN du VHC et les ALT fluctuent considérablement et l'ARN peut être indétectable chez un tiers des patients durant une période donnée (Westbrook and Dusheiko, 2014).

L'analyse histologique du foie au cours d'une hépatite C chronique est marquée par une infiltration de cellules mononucléaires, des nécroses hépatocytaires et des degrés variables de fibrose. Un score nécro-inflammatoire ou de fibrose plus élevé semble être lié à une évolution accélérée de la cirrhose. De ce fait, la biopsie du foie constitue l'étalon-or pour évaluer l'activité inflammatoire « *grading* » et le stade de fibrose « *staging* » (Dhingra et al., 2016)

L'activité inflammatoire fait référence à la sévérité de la maladie, la quantité de lésions ainsi que le degré d'inflammation et de nécrose dans le foie. Le degré de sévérité peut être minimal, moyen, modéré ou grave. Le stade de la maladie, quant à lui, décrit la phase de la maladie dans laquelle se situe l'état du foie, en termes de fibrose ou de lésions structurales permanentes. On parlera de stade aigu versus chronique, de stade précoce ou tardif, cirrhotique ou non-cirrhotique, compensé ou décompensé ou encore stade final (Dhingra et al., 2016).

Les complications les plus redoutables d'une hépatite C chronique sont le risque d'une insuffisance hépatique (2,9%), d'un carcinome hépatocellulaire (3,2%) ou d'une mort associée aux maladies du foie (2,7%) (van der Meer et al., 2017) (Singal et al., 2010). Ces complications ne se développent que sur une faible proportion de patients (2 à 3%) non traités uniquement plusieurs années après infection (Romano et al., 2018) (van der Meer et al., 2017).

L'hépatite chronique induite par le VHC peut aussi engendrer des manifestations extrahépatiques dans 40 à 70% des cas. La plus fréquentes de celles-ci est la cryoglobulinémie mixte (de type II et de type III) qu'on retrouve chez environ 19 à 55 % des personnes infectées par le VHC. Le syndrome de cryoglobulinémie entraîne à son tour une panoplie de symptômes qui lui sont associés tel qu'une vascularite systémique, une polyneuropathie, une glomérulonéphrite, etc. (Maasoumy and Wedemeyer, 2012).

5. Diagnostic

Un bon diagnostic et à un temps précoce de la maladie permettrait de prévenir la progression de la maladie, ainsi que la propagation du virus et de pouvoir intervenir pour atténuer l'activité inflammatoire au niveau hépatique. Néanmoins, comme indiqué précédemment, il est difficile d'établir un diagnostic durant la phase aiguë dans la mesure où celle-ci s'avère asymptomatique dans la majorité des cas ou ne présentant que des symptômes aspécifiques. De plus, dans certains cas les niveaux sériques en ALT peuvent se retrouver à des taux normaux alors que la virémie pourrait être présente. De ce fait, la détection du virus directement serait un moyen plus fiable pour effectuer un diagnostic d'une infection par le VHC. IL s'agit de détecter les

antigènes ou acides nucléiques viraux. La détection des anticorps anti-VHC serait à l'inverse une méthode indirecte de dépistage.

5.1. Tests indirects

Souvent les diagnostics de première intention sont les tests indirects grâce à la détection d'anticorps anti-VHC. On effectue pour cela un test EIA (*Enzyme ImmunoAssay*) sur le sérum de patients. Ce test consiste à déposer l'échantillon sérologique de patient sur des antigènes viraux fixés à la surface d'un support solide. Une sérologie positive témoigne d'une infection par le VHC sans pour autant distinguer si celle-ci est récente ou ancienne. Généralement, les anticorps sont détectés au bout de 2 à 8 semaines après infection. Toutefois, lorsque le test est positif, il est recommandé voir impératif d'effectuer un second test de confirmation (Chevaliez, 2011).

Il existe de nos jours des tests plus rapides qui détectent des mélanges d'anticorps de divers épitopes du VHC, en utilisant la technologie des immunoessais à flux latéral en microplaques ou en bandelettes, semblable à la technologie mise en œuvre dans les tests de grossesse. Ces nouveaux tests fournissent un résultat rapide et précis en une seule étape. Ils permettent également d'effectuer un diagnostic à partir de plusieurs fluides corporels tel le sérum ou le plasma de patients ou même à partir de la salive ou d'une simple piqûre du doigt (Chevaliez and Pawlotsky, 2012).

5.2. Tests directs

Le diagnostic virologique direct repose sur l'amplification d'acides nucléiques viraux ou la détection d'antigènes du VHC.

Concernant les tests d'amplification d'acides nucléiques (NAT), ils permettent d'apporter un diagnostic qualitatif (absence ou présence) et quantitatif (taux de virémie) avec une grande précision. Les tests qualitatifs se font généralement par les techniques de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) ou par TMA (*Transcription-Mediated Amplification*) permettant d'amplifier le génome viral. Tandis que pour effectuer des tests quantitatifs, la PCR en temps réel ou la technique de bDNA (*Branched DNA*), qui permettent d'amplifier le signal associé à la détection de l'ARN viral, sont les plus couramment utilisées (Peeling et al., 2017)(Moosavy et al., 2017). Ces tests permettent, par conséquent, de mieux orienter le traitement nécessaire contre l'infection par le VHC et de surveiller la réponse au traitement (Peeling et al., 2017).

Il existe aujourd'hui une technologie de pointe qui est basée sur l'utilisation de nanoparticules d'or couronnées de sondes spécifiques au génome du VHC qui grâce ses

propriétés physicochimiques et optiques uniques permet de détecter par colorimétrie rapidement et avec une fine précision la présence de l'ARN du VHC dans un échantillon sans nécessité d'une étape d'amplification (Shawky et al., 2017).

La détection de l'antigène de capsid est quant à elle une alternative qui permet d'obtenir facilement un résultat de l'infection par VHC. La capsid est détectée en même temps que l'ARN du VHC chez les patients infectés (Bouvier-Alias et al., 2002). La quantification de l'antigène de capsid se fait par un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) automatisé, peu coûteux, et moins enclin à la contamination des échantillons que les méthodes d'amplification du génome viral (Park et al., 2010). Cependant, la détection de l'antigène de capsid est moins sensible que la détection de l'ARN. De plus, le ratio capsid sur ARN viral varie d'un patient à l'autre, ce qui est probablement dû au fait que la capsid se trouve, dans le sang, associée à virions complets et des structures virales dépourvus d'ARN (Chevaliez, 2011).

6. Génotypage

Le génotypage est un facteur pronostique puissant qui permet de définir le traitement antiviral le mieux adapté, car la réponse virologique prolongée varie entre les différents génotypes. Le génotypage se fait soit par la technique sérologique d'EIA en utilisant des anti-VHC spécifiques permettant de différencier les 6 génotypes du VHC, soit par la méthode biomoléculaire à travers le séquençage de certaines régions du génomes suivis d'une analyse phylogénétique (Chevaliez and Pawlotsky, 2012).

7. Réponse immunitaire contre le VHC

Suite à une infection par le VHC une réponse immunitaire est mise en place afin d'éliminer le virus et de limiter sa propagation. Dès son entrée dans l'organisme, le virus ne passe pas inaperçu. Il est vite détecté par des senseurs moléculaires et cellulaires, un système d'alarme est ensuite activé se traduisant par un déclenchement d'une cascade de signalisation et aboutissant à l'activation d'une première ligne de défense qui est la réponse immunitaire innée. Cette réponse antivirale a non seulement une action directe en inhibant la réplication et la propagation du virus mais joue aussi un rôle indispensable dans l'induction d'une réponse immunitaire plus performante et plus spécifique qui est connue sous le terme de réponse immunitaire adaptative ou acquise. Une réponse immunitaire infaillible permet la résolution spontanée de l'infection virale et la clairance d'une infection persistante du VHC. Ce n'est malheureusement pas le cas

pour la majorité d'individus infectés, puisque le virus a pu acquérir durant son évolution des mécanismes d'échappement à cette réponse immunitaire qui lui permet par conséquent de persister dans l'organisme.

7.1. Réponse immunitaire innée

Comment le virus est détecté par l'immunité innée ?

La réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes est déclenchée via la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*) par l'intermédiaire des récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) se trouvant notamment sur les cellules de l'immunité innée ainsi que d'autres types cellulaires tel que l'hépatocyte (Xu and Zhong, 2016). La détection du VHC repose principalement sur trois protéines, RIG-I (*retinoic-acid-inducible gene 1*) et TLR3 (*toll-like receptor 3*) qui font partie des récepteurs PRR et la protéine kinase PKR (*Protein-kinase R*) (Li and Lemon, 2013). Durant l'infection par le VHC, RIG-I et PKR sont les premiers senseurs à intervenir et ont comme cible commune les ARN à simples ou doubles brins qui possèdent une extrémité 5' triphosphate (5'-ppp), une caractéristique distinctive des ARN du non-soi, et qui est une signature que possèdent beaucoup de virus à ARN dont le VHC (Kato et al., 2011) (Li and Lemon, 2013). A cette particularité s'ajoute également les régions poly U/UC au sein de la région 3' UTR du VHC qui sont les motifs clés reconnus par RIG-I (Saito et al., 2008) (Uzri and Gehrke, 2009). Le TLR3 est impliqué un peu plus tard et est capable de détecter notamment les ARN doubles brins dérivés des intermédiaires de réplication virale ou issus des cellules mourantes adjacentes (Dansako et al., 2013) (Li et al., 2012a). L'activation de ces senseurs entraîne la transduction du signal via les protéines adaptatrices MAVS (*Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*) ou TRIF (*TIR-domain-containing adapter-induction interferon- β*) qui aboutit à l'induction de la production du système interféron (IFN) en particulier, qui constitue le mécanisme de défense emblématique lors d'une réponse antivirale (Yang and Zhu, 2015).

Comment la réponse immunitaire innée inhibe-t-elle l'infection ?

Les interférons sont les cytokines primordiales dans l'induction d'une réponse antivirale et de sa régulation au niveau des cellules.

Les interférons sont un groupe de trois classes : IFN de type I, type II et III. Au cours d'une infection anti-VHC, les interférons les plus impliqués sont l'IFN-I principalement l'IFN- α et l'IFN- β et IFN-III (IFN- $\lambda 1$ ou l'IL29, IFN- $\lambda 2$ ou IL28A et IFN- $\lambda 3$ ou IL28B) et sont notamment produits par les cellules infectées par le virus et par les cellules sentinelles en particulier les cellules dendritiques (DC) et les macrophages (Heim, 2013) (Wong and Chen, 2016).

Les IFN produits se lient sur leur récepteurs (IFNR) présents sur la surface cellulaire, et déclenche la voie de signalisation JAK/STAT qui conduit à l'activation de l'expression des ISG

(*IFN-stimulated genes*) à la production de plusieurs centaines de protéines dont les cytokines pro et anti-inflammatoires. Bien que la plupart de ces protéines qui ont été identifiées soient impliquées dans la réponse anti-VHC, certaines permettent plutôt de réguler directement des processus cellulaires tel que la survie, apoptose, la synthèse de protéines, tandis que d'autres protéines permettent de moduler l'activité antivirale de l'IFN. Toutes les étapes du cycle viral peuvent être ciblées par l'IFN à travers l'action des protéines ISG (Xu and Zhong, 2016). Les IFN-I participent également à l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

A l'échelle cellulaire, les DC et les NK (*natural killers*) représentent des acteurs incontournables lors de la réponse innée contre le VHC. Les cellules NK jouent un rôle très important dans la réponse anti-VHC grâce à leur action cytotoxique directe sur les cellules infectées d'une part et à leur production importante de cytokines inflammatoires en particulier l'IFN- γ d'une autre part. L'infection chronique par le VHC est associée à une réduction du taux de NK circulants dans le sang et au niveau du foie. Néanmoins, malgré leur nombre réduit, plusieurs travaux montrent que les NK restent activés durant et après la transition vers une hépatite C chronique, et que leur statut cytotoxique est en corrélation avec le degré de la nécroinflammation hépatique (Ahlenstiel et al., 2010)(Serti et al., 2015). L'activation continue des NK serait due à leur stimulation par l'IL26 sécrétée par les LT au niveau du foie. En conséquence, une expression du facteur apoptotique TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) par les NK contribuant sensiblement au développement d'une cirrhose à travers la stimulation constitutive de la mort des hépatocytes (Miot et al., 2015)

Concernant les DC, celles-ci participent à un large éventail de la réponse immunitaire durant l'infection par le VHC et jouent un rôle pivot dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles. Elles détectent le virus via diverses PRR, appréhendent les antigènes viraux puis les présentent via les CMH I et II (complexe majeur d'histocompatibilité) aux lymphocytes T et B. Cette reconnaissance est accompagnée d'une production de cytokines inflammatoires, notamment l'IL12 (*interleukin-12*), induisant l'activation des lymphocytes, leur prolifération et leur différenciation. En plus de leur rôle dans l'induction d'une réponse immune adaptative, elles exercent également une activité antivirale de par leur production d'IFN I et l'IFNIII notamment par la sous-population des pDC (*plasmacytoid dendritic cells*) et des mDC 2(*myeloid dendritic cells*), respectivement (Zhang et al., 2013)(Takahashi et al., 2010).

7.2. Réponse immunitaire adaptative

La barrière définitive qui permet de contrôler l'infection au VHC est l'immunité adaptative. Cette réponse est distinguée en deux types de réponses ; la réponse humorale et la réponse cellulaire. Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative apparaît plusieurs semaines après infection. Il est aujourd'hui admis qu'une réponse immunitaire adaptative infaillible permet

le contrôle et la clairance du virus. Cependant, dans la majorité des cas, le virus persiste dans l'organisme et la maladie évolue vers la chronicité en raison d'un dysfonctionnement (ou d'une faille) au niveau de cette réponse adaptative. Ce n'est que dans une faible proportion de patients infectés par le VHC que le virus est éliminé. Ces patients présentent généralement une phase aiguë symptomatique avec la présence d'anticorps neutralisants anti-VHC et une réponse cellulaire spécifique efficace.

7.2.1. La réponse immunitaire cellulaire :

La réponse immunitaire adaptative comprend deux types cellulaires majeurs, les lymphocytes T CD4+ auxiliaires, et les lymphocytes CD8+ cytotoxiques.

Plusieurs études montrent que l'élimination du VHC est associée à une réponse forte et prolongée des T CD4+ et T CD8+ capables de cibler plusieurs épitopes des différentes protéines virales. Il convient de noter que l'apparition tardive des LT environ 6 à 8 semaines après l'infection coïncide le plus souvent au début de l'hépatite. Ce serait plutôt ce retard dans l'induction de la réponse T spécifique qui est en cause de l'infection chronique plutôt qu'un défaut de recrutement des T CD8+ au niveau hépatique(Shin et al., 2011)

Plusieurs évidences soutiennent le rôle important que jouent les deux sous-types de LT dans le contrôle de l'infection par le VHC. D'une part, il y a une corrélation de cinétique assez claire entre le début de la réponse T CD8+ spécifique au VHC et la clairance du virus. De plus, la déplétion des T CD4+ ou des T CD8+ mémoire chez des chimpanzés conduit au développement de la chronicité après réinfection par le virus(Grakoui et al., 2003)(Shoukry et al., 2003). D'autre part, plusieurs travaux suggèrent qu'il y aurait une forte association entre le polymorphisme des allèles HLA de classe I (e.g., HLA-B27) et de classe II (e.g., DRB1*1101) et l'élimination spontanée du VHC (Neumann-Haefelin and Thimme, 2013). Ces facteurs génétiques liés à l'hôte ont une influence directe sur les réponses immunitaires à l'issue de la reconnaissance des antigènes viraux présentés par les molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices d'antigène et/ou les cellules infectées(Catamo et al., 2017).

L'ensemble de ces données permettent de montrer que notamment les T CD8+ sont probablement les effecteurs clés dans le contrôle et la clairance du VHC.

7.2.2. La réponse immunitaire humorale :

L'apparition des anticorps anti-VHC n'est souvent détectable qu'à partir de la 8ème semaine après infection (Thimme et al., 2006). Durant l'infection, un large panel d'anticorps est produit par les lymphocytes B. Toutefois, la plupart de ces anticorps ne présentent pas une activité antivirale significative. Seulement une faible proportion de ces anticorps, qui sont dits neutralisants, est capable d'inhiber l'attachement du virus et son entrée(Thimme et al., 2012).

Cependant, le pouvoir antiviral des anticorps durant l'infection par le VHC est remis en question. Le rôle de la réponse immunitaire humorale dans la clairance du VHC est un sujet qui prête à controverse. Plusieurs études confèrent un rôle mineur aux anti-VHC. En effet, la clairance du virus a été observée en l'absence d'anticorps neutralisants, aussi bien que chez des patients infectées souffrants d'une hypoglobulinémie (Semmo et al., 2006). Dans ces situations, ce serait la réponse T spécifique qui compenserait l'absence d'anticorps neutralisants. Les premières études sur les chimpanzés montrent au contraire que du sérum hyperimmun contre les régions hypervariables HVR-1 confère une protection contre une infection par le VHC homologue (Farci et al., 1996). Dans tous les cas, une réponse tardive et peu efficace des anti-VHC durant l'infection chronique induit des mutations d'échappement du VHC au niveau des épitopes de reconnaissance aux anticorps (Thimme et al., 2012).

7.3. Echappement immunitaire :

Même s'il existe multiples mécanismes contribuant à la persistance virale et à la chronicité, la capacité du virus à échapper précocement à la réponse immunitaire est probablement le mécanisme le plus important.

Le VHC possède plusieurs stratégies pour échapper et contrer la réponse immunitaire de l'hôte. Ces stratégies incluent : l'inhibition de l'induction de l'IFN et des effecteurs antiviraux mais aussi de l'inhibition directe de la fonction de ces effecteurs. Une des stratégies les plus importantes est le clivage de la protéine MAVS par la protéase NS3/4A (Li et al., 2005b). MAVS est une protéine adaptatrice qui joue un rôle central dans la signalisation des RLR (*RIG-I-like receptors*) qui est la voie majeure qui mène à l'activation de la voie IFN suite à une infection par le VHC dans les hépatocytes. Ainsi, le clivage par NS3/4A de MAVS entraîne sa dissociation de la membrane de la mitochondrie et empêche ainsi sa dimérisation avec RIG-I (Lin et al., 2006a) (Baril et al., 2009). Par conséquent toute la signalisation en aval de l'immunité innée (Meylan et al., 2005). Le clivage de MAVS bloque l'activation de la transcription de l'IFN dans les événements les plus précoces de cascade de signalisation de l'immunité innée (Loo et al., 2006). L'inhibition durant ces stades précoces affecte plus efficacement la réponse antivirale que lorsque celle-ci est bloquée plus tardivement (Xu and Zhong, 2016). De plus, l'inactivation de MAVS se produit de manière protéolytique qui est plus efficace que l'inactivation via une interaction entre protéines. Le clivage de MAVS a été également observé *in vivo* chez des patients infectés par le VHC.

Ainsi, la protéase NS3/4A est considéré comme le facteur clé de l'échappement immunitaire du VHC (figure 3). La protéase NS3/4A a aussi comme cible le facteur TRIF, l'adaptateur clé qui lie le TLR3 aux kinases responsables de l'activation des facteurs de transcription IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), et NF- κ B qui contrôlent divers mécanismes antiviraux (Li et al., 2005a). Par conséquent, le clivage de TRIF par la protéase NS3/4A bloque la voie de signalisation

dépendante du TLR3, mais aussi d'autres voies de signalisation immunitaires non-dépendantes du TLR3(Zhang et al., 2011)(Horner, 2014).

Une autre cible de la protéine NS3/4A est la protéine Riplet qui est une ubiquitine ligase E3, qui entraîne la polyubiquitination de RIG-I et permet son activation(Oshiumi et al., 2009). Le clivage de Riplet par NS3/4A empêche donc l'activation de RIG-I et par conséquent de la signalisation en aval(Oshiumi et al., 2013). La déplétion de Riplet est associée à une augmentation du taux de réplication du VHC, ce qui suggère que Riplet joue un rôle important dans la réponse antivirale contre le VHC(Oshiumi et al., 2013)(Horner, 2015).

NS3 ne serait pas la seule protéine virale à être impliquée dans l'échappement immunitaire du VHC. Des publications récentes ont révélé un nouveau mécanisme d'évasion immunitaire par la protéine NS4B qui a comme cible la protéine adaptatrice STING (*Stimulator of interferon genes*), qui induit l'activation de l'IFN1(Yi et al., 2016)(Nitta et al., 2013). Il a été montré que NS4B interagit physiquement avec STING, et altère l'activation de la signalisation IFN(Ding et al., 2013). Plusieurs autres stratégies que le VHC utilise pour antagoniser la réponse immunitaire innée ont été décrites. La protéine core a également été décrite pour altérer la signalisation JAK/STAT en interagissant avec STAT1 et en empêchant sa dimérisation avec STAT2(Lin et al., 2006b), mais aussi en induisant l'expression de SOCS3, une protéine responsable du rétrocontrôle de la signalisation JAK/STAT(Bode et al., 2003). NS5A interagit avec plusieurs protéines impliquées dans différentes signalisations de la réponse antivirale pour empêcher leurs fonctions. Parmi celles qui ont été décrites, la protéine IRF7(Chowdhury et al., 2013), STAT1(Kumthip et al., 2012), MyD88(Abe et al., 2007), PKR(Gale et al., 1997), et OAS/RNase L(Taguchi et al., 2004).

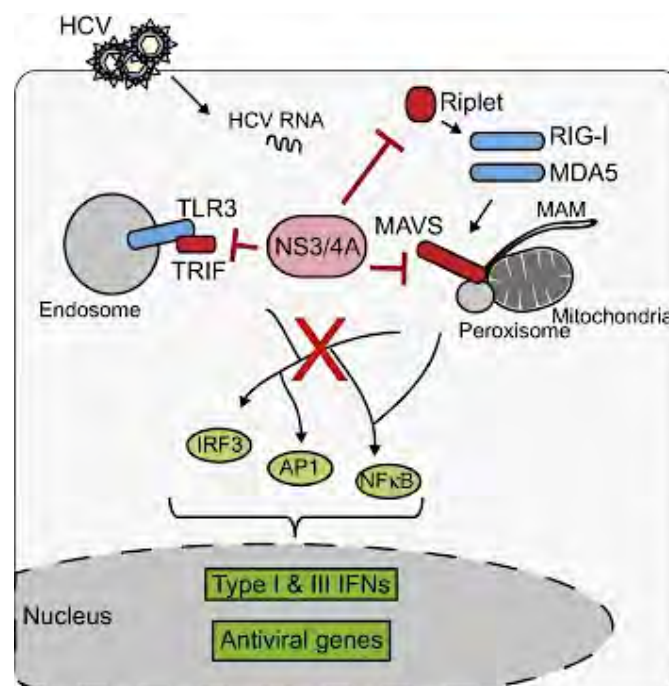


Figure 3 Les étapes d'une réponse immunitaire innée antivirale contre le VHC.

Suite à l'infection par le VHC, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) présents dans l'ARN du VHC et relâchés dans le cytoplasme de l'hépatocyte sont reconnus par les PRR dont RIG-I, MDA5 et TLR3. Ceci induit l'expression de l'IFN de type I et III et d'autres ISG. La protéine NS3-4A bloque cette réponse en clivant les différents senseurs décrits précédemment.

8. Traitements

Le but d'une thérapie efficace contre une infection par le VHC est la clairance virale et l'amélioration des issues cliniques pour les patients. L'évaluation de l'efficacité lors des essais cliniques qui est la réponse virologique prolongée ou SVR (*Sustained virological response*) est définie par l'absence de détection de l'ARN du VHC dans le sang après une certaine période après la fin du traitement. Une thérapie efficace conduit majoritairement à la diminution des manifestations hépatiques, de la fibrose ainsi qu'à la réduction du risque du développement d'un hépatocarcinome.

Evolution des traitements

Le traitement de l'hépatite C a connu des changements révolutionnaires ces 25 dernières années (Figure4). Pendant longtemps, le traitement se basait sur l'administration d'interféron alpha pégylé (peg-IFN- α) et de ribavirine. L'IFN- α permet de stimuler la réponse immunitaire antivirale. Sa forme conjuguée au polyéthylène-glycol le rend plus stable dans le sang. La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine, qui a été décrit comme agent antiviral à large spectre. Elle est capable d'inhiber la réplication virale directement en ciblant des enzymes essentielles pour la réplication du virus mais aussi indirectement en entraînant une immunomodulation vers une réponse TH1 antivirale (Te et al., 2007). Le traitement peg-IFN- α /ribavirine permettait d'atteindre une SVR de 6 mois après traitement chez 50% et 80% des patients respectivement infectés par le génotype 1 et 2 ou 3 (Zeuzem, 2008).

Le développement du modèle du réplicon à partir de 1999 a permis de faire progresser le traitement contre le VHC vers l'utilisation de nouvelles drogues, appelées agents antiviraux à action directe (DAA), ciblant spécifiquement des protéines du VHC. Il a fallu attendre jusqu'en 2011 pour les deux premiers DAA soient approuvés. En 2011, la première génération de DAA, telaprevir (Incivek) et boceprevir (Victrelis) a été introduite. Ces deux inhibiteurs de la protéase NS3/4A ont été co-administrés avec le peg-IFN- α et la ribavirine aux patients infectés par le génotype 1 (Jacobson et al., 2011). Cette génération d'inhibiteurs a permis une amélioration considérable de l'efficacité des traitements. Cependant, cette trithérapie présentait des problèmes de tolérance considérables auprès des patients ainsi que de sévères effets secondaires avec en plus l'apparition de mutants de virus résistants. En 2013, avec l'introduction

de nouveaux DAA, la durée de traitement a été raccourcie, le taux de SVR amélioré avec jusqu'à 90% pour le sofosbuvir (inhibiteur de la polymérase NS5B) combiné aux Peg-IFN et la ribavirine (Gane et al., 2013). En 2014, une nouvelle ère de DAA a été développée, avec l'apparition de nouvelles drogues ciblant la protéine virale NS5A, qui peuvent être employées en combinaison avec le sofosbuvir (Tableau1) (Sulkowski et al., 2014). Ces nouveaux traitements ne nécessitent pas l'emploi l'IFN et possèdent une activité pangénotypique, une barrière génétique à l'apparition de virus résistants supérieure et une moins grande toxicité. Tout récemment, en 2016, une nouvelle bithérapie a été approuvée. Il s'agit de l'inhibiteur de la protéine virale NS5A velpatasvir combinée au sofosbuvir (Epclusa). Cette bithérapie constitue le 1^{er} traitement pouvant guérir des 6 génotypes majeurs du VHC. De plus, les taux de SVR sont améliorés de 95% jusqu'à même 100% après 12 semaines de traitement (Carter et al., 2017).

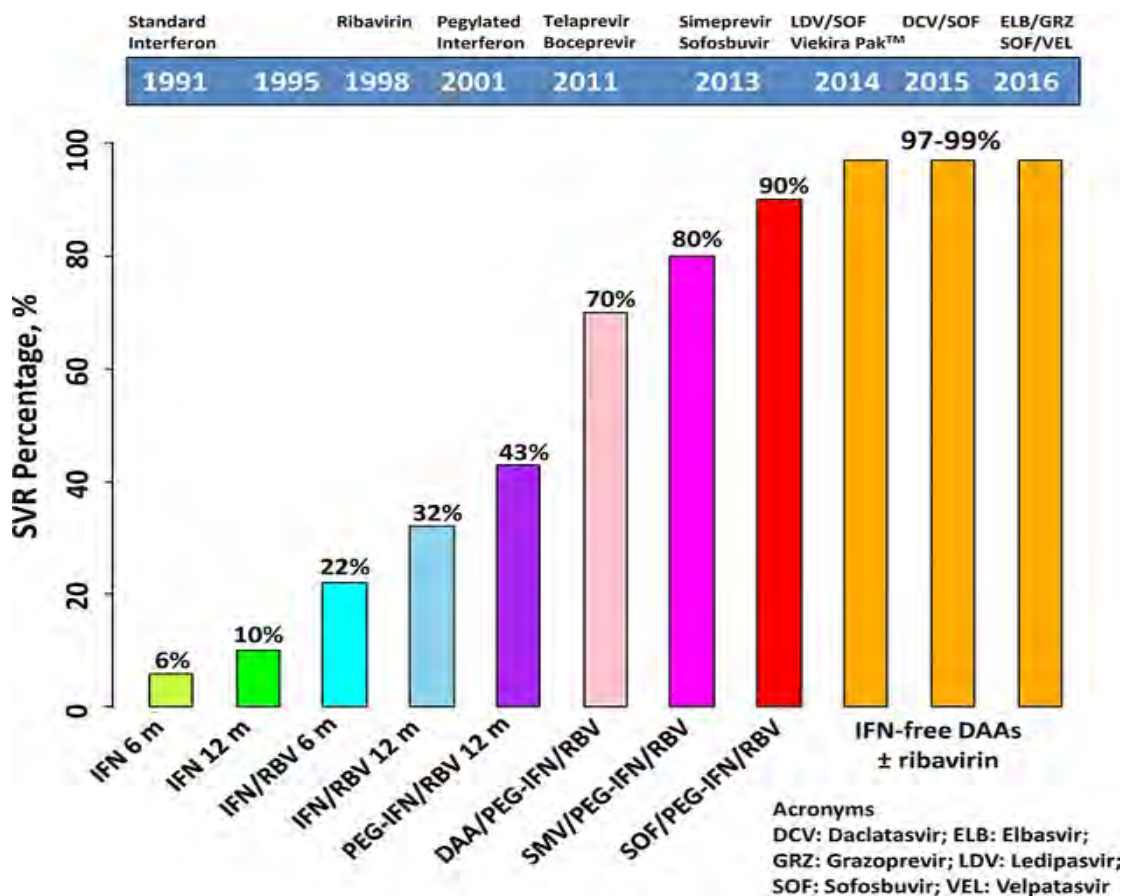


Figure 4: Evolution des traitements depuis l'identification du virus HCV.

Les taux de guérison de l'hépatite C ont augmenté de manière considérable au fil du temps pour dépasser les 99% avec l'introduction des traitements sans interférons vers l'année 2014. PI : Inhibiteurs des protéases (D'après (Carter et al., 2017).

Tableau 1: Caractéristiques des DAA de deuxième génération

Ce tableau montre les cibles ainsi que les indications cliniques des antiviraux (DAA) de deuxième génération

Molécule	Target	Genotype	Association
Simeprevir	NS3/4A protease	Genotype 1,4	Sofosbuvir
Grazoprevir	NS3/4A protease	Genotype 1,4	Elbasvir
Paritaprevir	NS3/4A protease	Genotype 1,4	Ombitasvir + ritonavir +/- dasabuvir
Daclatasvir	NS5A	Genotype 1,2,3	Sofosbuvir
Elbasvir	NS5A	Genotype 1,4	Grazoprevir
Ledipasvir	NS5A	Genotype 1,4	Sofosbuvir
Ombitasvir	NS5A	Genotype 1,4	Paritaprevir + ritonavir +/- dasabuvir
Velpatasvir	NS5A	Pangenotypic	Sofosbuvir
Dasabuvir	NS5B	Genotype 1	Ombitasvir + paritaprevir + ritonavir
Sofosbuvir	NS5B	Pangenotypic	Ledipasvir Daclatasvir Simeprevir Velpatasvir

9. Perspectives de vaccination

Actuellement, aucun vaccin contre le VHC n'est homologué ou utilisé. L'avènement de la multithérapie ciblée contre l'infection par le VHC a fait clairement ressortir la nécessité de promouvoir le développement d'un vaccin contre le VHC dans le but ultime d'enrayer l'épidémie d'hépatite C. Cependant, le développement d'un vaccin efficace contre le VHC est entravé par plusieurs facteurs notamment la forte variabilité du génome viral qui conduit à la génération de mutants d'échappement. Néanmoins, il y a un certain optimisme que le développement d'un vaccin efficace puisse être possible puisqu'une proportion d'individus infectés élimine spontanément le virus et développent une certaine immunité qui leur permet de réduire la durée de la virémie et la charge virale après une infection subséquente. Une bonne compréhension des réponses immunitaires antivirales chez ces individus et chez des modèles de chimpanzés ont permis d'élucider les mécanismes clés qui contribuent au contrôle de l'infection par VHC (Swadling et al., 2014). Il a été montré que l'induction et la maintenance d'une forte réponse T

CD4+ et CD8+ contre différents épitopes étaient associées à une résolution de l'infection au VHC.

Il est actuellement admis qu'une réponse à médiation cellulaire seule n'est pas suffisante pour éliminer le VHC mais ce serait plutôt une réponse croisée des anticorps neutralisants et des cellules T qui conférerait une protection contre le VHC ainsi que sa clairance (Torresi, 2017).

Générer un vaccin contre le VHC basé sur le virus tué ou atténué est une idée que les chercheurs ont banni depuis longtemps pour le potentiel danger que présente l'utilisation de telles particules. De ce fait, de nombreux travaux se sont penchés sur le développement de vaccins expérimentaux incluant les vaccins à ADN, les vecteurs recombinants (non-pathogéniques) ainsi que les particules pseudo-virales (*Virus-like particles*, VLP) (Swadling et al., 2014) (Kumar et al., 2016) (Ghasemi et al., 2015). Un vaccin à VLP a le potentiel de remplir les conditions d'un vaccin efficace contre l'hépatite C. Plusieurs approches ont permis de montrer le pouvoir immunogène du vaccin à VLP et leur capacité d'induire de forte réponse CD4+ et CD8+ ainsi que la production d'anticorps à réactivité croisée (Torresi, 2017) (Masavuli et al., 2017). Malgré les obstacles nombreux et complexes, plusieurs études concernant les vaccins candidats qui se basent sur les VLP génèrent déjà des résultats prometteurs en phase d'étude préclinique (Abdelwahab and Ahmed Said, 2016).

II. LE VIRUS DE L'HEPATITE C :

1. Classification et distribution génétique

Le virus de l'hépatite C, assigné depuis peu à l'espèce « *hepacivirus c* » appartient au genre *Hepacivirus* qui fait partie de la famille des *Flaviviridae* (Smith et al., 2016) (Figure 5). Une diversité considérable existe entre différents isolats de VHC (Simmonds et al., 1993) (Bukh et al., 1993). Le VHC a une grande diversité génétique que l'analyse phylogénétique classe en 7 génotypes majeurs et 67 sous-types (Smith et al., 2014). Les génotypes 1 et 3 sont les plus répandus, comprenant respectivement 46% et 30% de toutes les infections. Quant aux génotypes 2, 4, 5 et 6, ils constituent respectivement 9%, 8%, 1% et 6% des infections (Tsukiyama-Kohara et al., 2017). Le génotype 7 a été identifié plus récemment, chez seulement quelques individus en Afrique centrale (Murphy et al., 2015). Les séquences nucléotidiques des différents génotypes diffèrent entre eux de 30 à 35%. Les souches appartenant à un même sous-type diffèrent de plus de 15%. La distribution géographique globale des génotypes du VHC est assez complexe. Il a déjà été établi que quelques sous-types notamment le 1a, 1b, 2a, 2b et 3a sont largement distribués dans le monde et représentent une grande proportion des infections par le VHC dans les pays industrialisés. On pense que ces sous-types d'épidémie se sont propagés rapidement dans la décennie qui précède la découverte du VHC (Smith et al., 1997). D'autres sous-types de VHC sont considérés comme des souches endémiques sur des régions relativement restreintes ayant circulées pendant de longues périodes. On y compte des souches de génotypes 1 et 2 principalement en Afrique de l'ouest, du génotype 3 en Asie du sud, 4 en Afrique centrale et notamment au moyen orient, 5 au sud de l'Afrique et le génotype 6 en d'Asie du sud-est (Messina et al., 2015) (Tsukiyama-Kohara et al., 2017). La répartition globale des variations génétiques du VHC a probablement été influencée par les tendances migratoires historiques et contemporaines. Par exemple, des souches provenant de l'Afrique de l'ouest semblent avoir été transférées aux Pays-Bas lors de la traite transatlantique des esclaves (Markov et al., 2012).

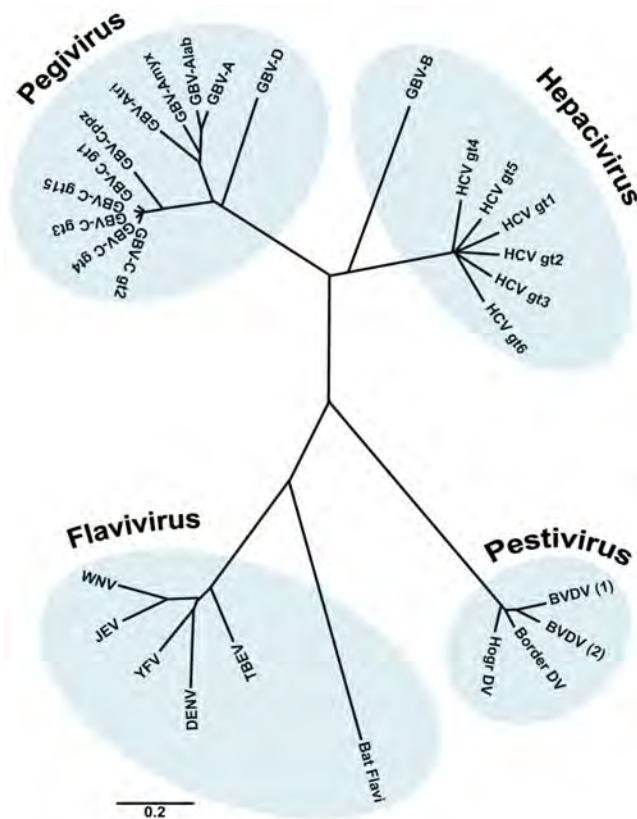


Figure 5:Arbre phylogénétique des membres de la famille des *Flaviviridae*.

La famille des *Flaviviridae* est subdivisée en 4 genres. L'arbre est dérivé de l'analyse des séquences d'une partie de la région NS5B. La longueur des branches est proportionnelle à la distance génétique. (D'après (Romero-Brey and Bartenschlager, 2014))

2. La particule virale

La particule virale consiste en une nucléocapside entourée d'une enveloppe lipidique comportant deux glycoprotéines virales E1 et E2. La nucléocapside formée par la protéine de capsid renferme l'ARN génomique simple brin (figure 6). Une particularité qu'ont les particules du VHC est leur association avec les lipoprotéines qui déterminent potentiellement la morphologie ainsi que les propriétés biophysiques des virions (Shi and Suzuki, 2018). Les études de microscopie électronique indiquent que les particules du VHC ont une allure sphérique sans pour autant avoir une parfaite symétrie, de petite taille et hétérogène ; leur diamètre varie de 30 à 80 nm et leur densité est de 1,03 jusqu'à 1,20 g/cm³(He et al., 1987) (Catanese et al., 2013) (Gastaminza et al., 2010). Cette densité flottante est une des particularités du VHC, peu commune chez les virus enveloppés à ARN. Une faible densité de la particule du VHC est associée à une forte infectiosité. L'interaction des particules du VHC aux lipoprotéines est à l'origine de cette densité flottante. Par ailleurs, ces différentes lipoprotéines notamment certaines apolipoprotéines se trouvent associées à l'enveloppe virale et contribuent fortement à

l'attachement et l'entrée virale (Lindenbach and Rice, 2013). Ces particules hybrides sont communément connues sous le nom de particules lipovirales (*lipo-viro particles*, LVP). Ces LVP ont une composition lipidique très similaire aux lipoprotéines de très basse densité (*Very Low Density Lipoprotein*, VLDL) et aux lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein*, LDL) (Thomssen et al., 1992) (Thomssen et al., 1993). Cependant, l'architecture globale des particules du VHC et des LVP n'est pas totalement claire. Notamment, comment les glycoprotéines d'enveloppe sont-elles arrangées au niveau des particules infectieuses du virus ? Les interactions moléculaires qui entraînent l'association des particules du VHC aux lipoprotéines ne sont pas non plus totalement élucidées (Lindenbach and Rice, 2013). Cette architecture particulière a depuis longtemps été décrite pour avoir un impact sur l'accessibilité des protéines d'enveloppe aux anticorps neutralisants, ce qui conférerait au virus un moyen d'échapper à la réponse immunitaire. Toutefois, des nucléocapsides non-enveloppées peuvent être retrouvées également dans le sérum de patient infectés (Maillard et al., 2001).

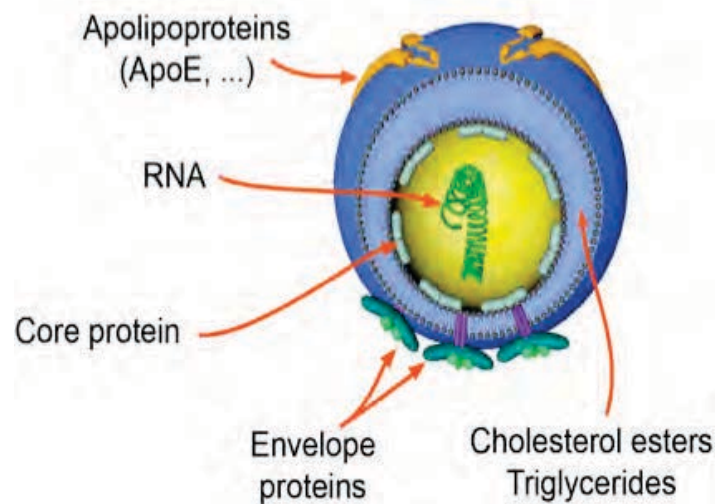


Figure 6 : Représentation schématique de la particule VHC.

La particule virale est constituée d'une nucléocapside contenant l'ARN viral. Cette nucléocapside est entourée d'une enveloppe lipidique dérivée de la cellule hôte dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. (D'après Lavie and Dubuisson, 2017)

3. Organisation génomique

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire de polarité positive, d'une longueur d'environ 9,6 kb. Son organisation est très proche de celle du génome des Flavivirus et Pestivirus appartenant à la même famille que le VHC, les *Flaviviridae*. Ce petit ARN comprend un unique long cadre de lecture ouvert (*Open Reading Frame*, ORF) dont la traduction produit une polyprotéine précurseur d'environ 3000 résidus d'acides aminés (aa) qui est subséquentement clivée par des protéinases virales et cellulaires en 10 protéines matures. L'ORF est encadré par deux régions non-codantes (*Untranslated region*, UTR) en 5' et 3', possédant des structures secondaires et tertiaires très conservées entre les différents génotypes et jouant un rôle important dans la traduction, la réplication et la stabilité virale (figure 7) (Sagan et al., 2015) (Honda et al., 1996).

3.1. 5'UTR et l'IRES du VHC

Le 5'UTR est constitué des 341 premiers nucléotides du génome viral. Il comporte 4 structures majeures en tige-boucle. La première structure SLI (*Stem Loop*), la moins conservée est importante pour la réplication virale. Tandis que les trois autres structures (SLII-IV) forment le site interne d'entrée du ribosome (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES), un préalable indispensable pour les virus à ARN non-coiffés. Cette structure permet de recruter la sous-unité 40S du ribosome et d'initier la traduction du cadre ouvert de lecture en présence de plusieurs facteurs d'initiation (eIF) de l'hôte (Piñeiro et al., 2012). L'alignement des séquences de l'ARN du VHC obtenues à partir des isolats cliniques indique que l'IRES constitue la région la plus conservée du génome viral (Sagan et al., 2015). L'activité de l'IRES du VHC est fortement dépendante de l'organisation structurale de l'ARN. Il a été montré que des mutations induisant la rupture des motifs responsables de cette organisation structurale de l'ARN, altèrent l'activité de l'IRES (Honda et al., 1996). L'IRES couvre une région d'environ 340 nucléotides, qui englobe la majorité de la région 5'UTR ainsi que les 30-40 premiers nucléotides de la région codant la protéine core.

Outre les facteurs eIF, de nombreuses autres protéines cellulaires sont impliquées dans l'activité de l'IRES et sont regroupées sous le nom de ITAF (pour *IRES-TransActing Factors*). Ainsi, grâce à différentes approches riboprotéomiques, plusieurs protéines ont été identifiées comme étant essentielles à l'initiation de la traduction ou à sa répression (Pacheco and Martinez-Salas, 2010) (Yu et al., 2005). En plus de ces protéines cellulaires, le VHC détourne à son profit le microARN hépatique miR122. Le miR122 est très important pour le contrôle de la traduction, de l'abondance virale mais surtout pour maintenir la stabilité de l'ARN. En effet, le miR122

confèrerait à l'extrémité 5' une protection contre la dégradation nucléotidique ou la détection par les senseurs immunitaires (Sagan et al., 2015).

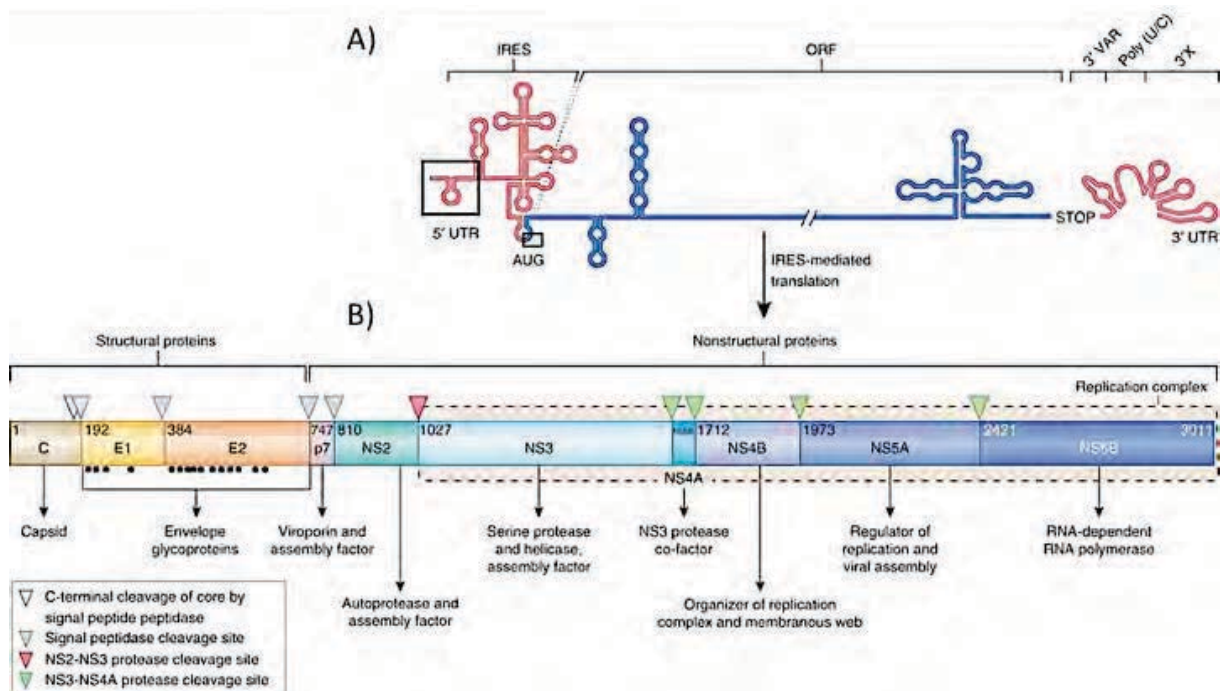


Figure 7 : Représentation schématique du génome et de la polyprotéine du HCV.

A) L'ARN génomique du VHC contient un seul cadre de lecture (en bleu) flanqué par les régions 5' et 3' UTR (en rouge) dont les structures secondaires sont représentées. L'IRES se situe au niveau de la région 5'UTR. B) La polyprotéine précurseur est générée suite à la traduction du génome viral et subit une série de clivages par des protéase cellulaires (triangles gris) et virales (triangles rouge et verts) pour générer à la fin 10 protéines virales matures subdivisées en protéines structurales et protéines non-structurales. D'après (Scheel and Rice, 2013)

3.2. 3'UTR

La région 3'UTR correspond aux 200 à 235 derniers nucléotides du génome du VHC. Cette région est organisée en trois domaines : une région variable d'environ 40 nucléotides, une région polyU/UC impliquée dans réplication et une région 3' terminale très conservée de 98 nucléotides nommé région-X ou 3'X. Il n'y a pas de queue poly(A). La région 3'UTR est essentielle pour la réplication du génome du VHC. Plusieurs mutations de délétion ou de substitution au niveau de cette région entraînent une perte de la réplication (Friebe and Bartenschlager, 2002). De plus, il a été montré dans un système rapporteur que l'efficacité de la traduction est supérieure en présence de la région 3'UTR, qu'avec la région 5'UTR seule (Shi and Suzuki, 2018). La région 3'UTR aurait pour rôle de stabiliser l'ARN et de former un complexe avec la région 5'UTR. Récemment, la partie 3'UTR du VHC a été décrite pour être impliquée dans l'étape

d'encapsidation du génome au sein des particules virales. Des mutations au niveau de la région-X entraînent une diminution drastique de l'encapsidation du génome viral (Shi et al., 2016).

4. Les protéines virales

Le clivage de la polyprotéine précurseur du VHC est assuré de manière co- et post-traductionnelle par des protéases virales et cellulaires au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique. Ainsi, la maturation de la polyprotéine aboutit à la production de protéines matures structurales (la protéine core, E1, E2) qui forment la particule virale et les protéines non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) qui interviennent dans la réplication du génome viral et la morphogénèse des particules infectieuses. NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B constituent la réplicase du VHC (unité minimale de réplication) NS2 et p7 ne sont pas essentielles à la réplication mais participent avec les autres protéines virales à l'étape d'assemblage.

4.1. La protéine core

La protéine de capsid (ou core), associée à l'ARN, forme la nucléocapsid et représente la protéine structurale la plus conservée (Irshad and Dhar, 2006). C'est la première protéine du VHC à être traduite à partir du génome viral. Elle subit durant sa maturation deux clivages successifs par des protéases cellulaires. Le premier clivage est effectué par une signal-peptidase et permet de dissocier la protéine core du reste de la polyprotéine pour générer une protéine immature de 23 kDa, qui sera localisée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE)(McLauchlan et al., 2002). Subséquemment, cette protéine est soumise à un second clivage, effectué par une peptidase de peptide signal, qui lui permet d'être relarguée sous une forme mature de 21 kDa (figure 8).

La protéine core comprend trois domaines : un domaine D1, hydrophile, en N-terminal. Ce domaine est important dans l'étape d'assemblage et l'encapsidation du génome viral où il va permettre la liaison de la capsid à l'ARN viral. Le domaine D1 permet également l'interaction de la protéine core avec de multiples facteurs cellulaires. Le domaine D2, est un domaine hydrophobe, nécessaire au bon repliement et à la stabilité du domaine D1 (Gawlik and Gallay, 2014). Il permet également l'association de la capsid à la membrane du RE mais aussi aux gouttelettes lipidiques(McLauchlan et al., 2002), qui sont des organelles cellulaires essentielles à l'étape d'assemblage des particules virales(Miyanari et al., 2007). Enfin, le troisième domaine D3, en C-terminal, est le peptide signal de la polyprotéine. Il est essentiel pour la localisation de la protéine E1 au niveau du RE (Sedeño-Monge et al., 2017).

Très souvent, les protéines de capsid virale sont des protéines multifonctionnelles, ce qui est le cas également pour la protéine core du VHC. Core interagit avec l'ARN viral, plusieurs protéines virales, les gouttelettes lipidiques, le RE ainsi qu'avec une pléthore de facteurs cellulaires (Kao et al., 2016) (Irshad and Dhar, 2006). Cette interaction a lieu d'une manière bien coordonnée afin de promouvoir un assemblage efficace des nouveaux virions. Core est également impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires notamment la transcription, l'apoptose, la prolifération cellulaire, la réponse immunitaire et enfin et non des moindres, la modulation du métabolisme lipidique et la stéatose (Kao et al., 2016).

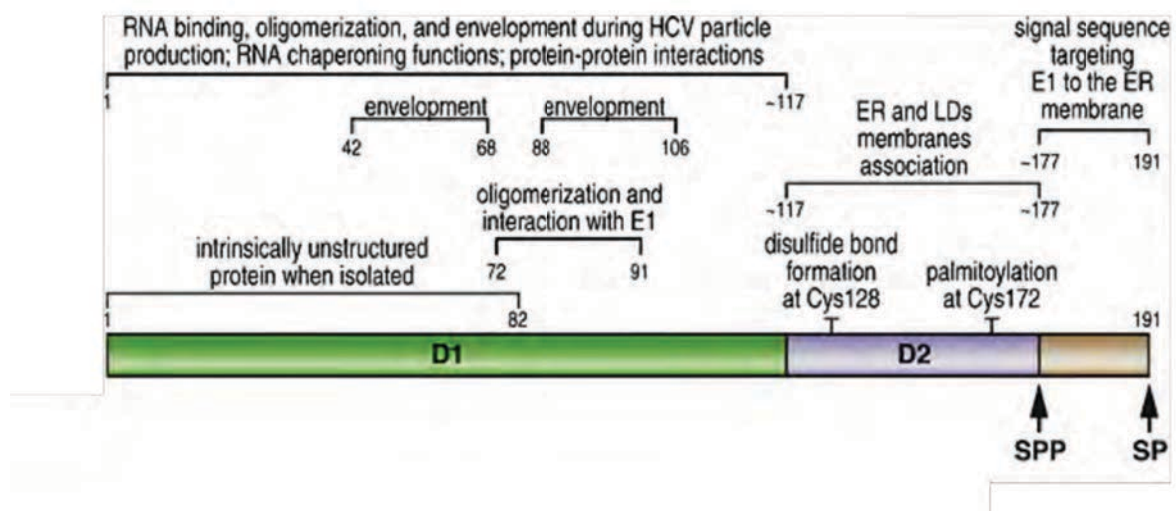


Figure 8 : Représentation structurelle et fonctionnelle de la protéine core du VHC.

La protéine core est libérée de la polyprotéine précurseur suite à des clivages par des peptidases signal (SP). La protéine core précurseur de 191 résidus ainsi générée est ensuite maturée par une peptidase de peptide signal (SPP) produisant ainsi une protéine mature d'environ 177 résidus composée de deux domaines D1 et D2. Schéma adapté de (Gawlik and Gallay, 2014)

4.2. La protéine ARFP

La traduction de l'ARN viral pourrait également aboutir à la synthèse d'une petite protéine de 16 kDa à partir d'un cadre de lecture alternatif présent dans la région codante de core. Cette protéine est connue sous le nom de ARFP (*Alternative Reading Frame Protein*), F (*Frameshift*) ou core+1 (en référence du changement de cadre de lecture) (Branch et al., 2005). C'est en 2000, que fut découverte la protéine F par les deux groupes de recherche de Walewski et de Xu, qui ont montré indépendamment que la production de cette protéine provenait de l'initiation de la traduction au codon AUG de la séquence de la polyprotéine, suivie par un glissement ribosomal de -2/+1 dans une région riche en adénosine située au niveau des codons 8-11 (Walewski et al., 2001) (Xu et al., 2001) (Varaklioti et al., 2002). Plusieurs études ont montré la présence

d'anticorps anti-F chez des patients infectés par le VHC (Vassilaki and Mavromara, 2009). Ceci constitue une preuve évidente que la protéine F est produite lors des infections naturelles. L'abolition de la protéine F n'a aucun impact sur la réplication *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggère qu'elle n'est probablement pas importante pour le cycle infectieux du VHC. Cependant, plusieurs travaux montrent que la protéine F serait impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et la perturbation de l'organisation du cytosquelette ce qui suggère qu'elle puisse avoir un rôle déterminant dans le développement du cancer du foie (Wu et al., 2007) (Vassilaki and Mavromara, 2009).

4.3. Les glycoprotéines d'enveloppe

Les glycoprotéines E1 et E2 du VHC sont incorporées au sein de l'enveloppe lipidique du virus lors du bourgeonnement des particules virales (Vieyres et al., 2014). Ces protéines comportent les déterminants nécessaires à l'interaction avec les récepteurs d'attachement et les facteurs d'entrée mais aussi un peptide de fusion encore non défini précisément. En effet, les deux glycoprotéines sont nécessaires et suffisantes pour médier la cascade de l'entrée du VHC de toutes les souches du VHC (Cocquerel et al., 2006). E1 et E2 sont toutes les deux essentielles pour l'infectivité du virus, et jouent un rôle important lors de l'assemblage des particules virales (Wakita et al., 2005).

E1 et E2 (environ 29kDa et 68kDa, respectivement) sont obtenues après clivage de la polyprotéine par des signal-peptidases cellulaires (figure 9) (Cocquerel et al., 2002). Ces glycoprotéines sont des protéines transmembranaires de type I, comportant des ectodomains en N-terminal hyper-glycosylés et un domaine transmembranaire hydrophobe en C-terminal (Tarr et al., 2015). Les domaines transmembranaires de E1 et E2 permettent leur ancrage, leur adressage au RE et leur hétérodimérisation (Cocquerel et al., 2002). En effet, après leur synthèse, les glycoprotéines d'enveloppe du VHC s'associent pour former un hétérodimère non covalent (Lavie and Goffard). L'hétérodimérisation de E1 et E2 se produit aussi lorsque les deux protéines sont exprimées en *trans*, et repose essentiellement sur l'interaction de leurs domaines transmembranaires mais aussi de leur ectodomains (Cocquerel et al., 2002)(Vieyres et al., 2014).

Les deux protéines E1 et E2 sont fortement N-glycosylées, avec des glycanes qui comptent pour presque 50% de la masse de l'hétérodimère (Meunier et al., 1999). Malgré une variabilité génétique importante cette glycosylation extensive et inhabituelle, est très conservée entre les différentes souches ce qui témoigne de leur grande importance pour le cycle viral (Goffard et al., 2005). Plusieurs travaux ont été menés pour comprendre l'importance de ces glycanes au cours du cycle viral. Il a été montré que certains sites de glycosylation sont importants dans la mise en conformation de ces protéines, mais aussi pour le processus d'entrée virale, l'accessibilité aux récepteurs d'attachement à leur site de liaison ainsi que la neutralisation par des anticorps

(Goffard et al., 2005) (Falkowska et al., 2007) (Helle et al., 2007). D'autres études décrivent également l'influence de ces glycanes sur l'assemblage et sur l'infectivité des particules virales (Helle et al., 2010)(Delgrange et al., 2007).

Il a longtemps été admis que E2 était une protéine de fusion de classe II. Néanmoins, les analyses cristallographiques récentes suggèrent que l'ectodomaine de E2 a une structure très différente de celles des protéines de fusion virales déjà connues et en particulier des protéines de classe II (Kong et al., 2013) (Khan et al., 2014). E2 ne possède aucune région ayant des caractéristiques de peptide de fusion et ne constitue donc probablement pas la protéine de fusion du VHC. E2 partage des similarités structurales et fonctionnelles uniquement avec le domaine III des protéines de fusion de classe II (Freedman et al., 2016). La différence de structure de la glycoprotéine E2 comparée aux protéines de fusion de classe II repose sur le manque de régularité au niveau du réseau de glycoprotéines sur la surface du VHC, contrairement aux autres flavivirus.

Les nouvelles déterminations structurales suggèrent que les glycoprotéines du VHC utilisent un mécanisme de fusion différent que les protéines de fusion de classe II (Sabahi et al., 2014). Ainsi, E2 n'aurait pas un rôle direct dans l'étape de fusion mais ce serait plutôt la glycoprotéine E1 seule ou en association avec E2, qui serait responsable de cette étape(Tong et al., 2018). En effet, E1 contient une séquence hydrophobe très conservée (272-281aa) qui a été proposée pour être un peptide de fusion potentiel ou pFP (*putative fusion peptide*) (Garry and Dash, 2003). De nombreuses études ont montré l'implication de ce domaine dans l'étape de fusion(Lavillette et al., 2007) (Lombana et al., 2016). Une étude récente a montré que la délétion de cette région du pFP conduit non seulement à une perte d'infectivité mais aussi à une réduction du taux d'ARN du VHC et de core dans le surnageant (Tong et al., 2017). Ce qui suggère que le pFP contribue dans l'entrée du VHC mais aussi dans sa morphogénèse. Néanmoins, de claires évidences sont encore requises pour démontrer que E1 est responsable de l'étape de fusion.

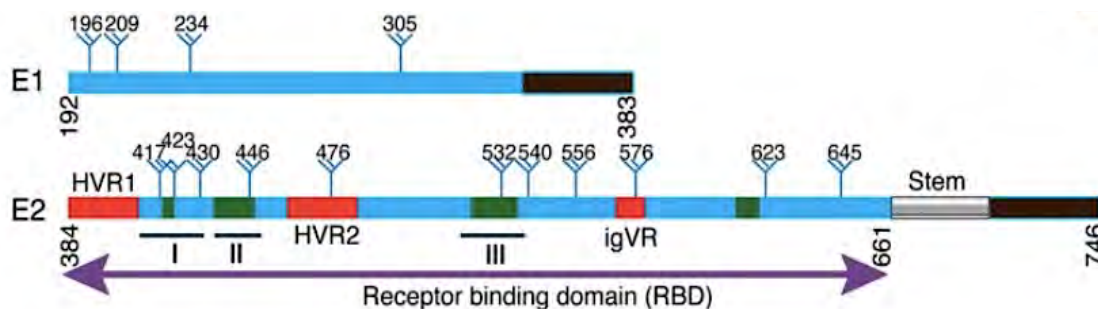


Figure 9 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC.

E1 et E2 comportent un domaine transmembranaire en C-terminal (en noir). Plusieurs régions de E2 sont représentées notamment les régions hypervariables HVR1, HVR2 et IgVR (en rouge). Les sites de glycosylation sont présentés par des petits symboles bleus sur les protéines. Tirée de (Drummer, 2014)

4.4. La protéine p7

La protéine p7 est une petite protéine membranaire intrinsèque de 63 résidus qui appartient à la famille des viroporines (Carrère-Kremer et al., 2002). Elle forme un canal ionique hexamérique de 42 kDa (Luik et al., 2009), jouant un rôle dans l'assemblage et la production virale (figure 10) (Steinmann et al., 2007).

Le polypeptide p7 est situé dans la polyprotéine du VHC au niveau de la jonction entre les protéines structurales et non structurales (Lin et al., 1994). Il est clivé par une signal-peptidase cellulaire située à la membrane du RE (Griffin et al., 2005) (Carrère-Kremer et al., 2004). La protéine p7 est constituée de deux passages transmembranaires dont les parties C- et N-terminales sont orientées vers la lumière du RE. Elle comporte une topologie en deux hélices avec seulement quelques résidus accessibles de part et d'autre de la membrane du RE (Madan and Bartenschlager, 2015).

La protéine p7 n'est pas requise pour la réplication du génome du VHC étant donné que le réplicon subgénomique ne contient pas de p7 (Lohmann et al., 1999), mais plusieurs études montrent que cette protéine serait plutôt impliquée au cours de l'assemblage des particules virales (Atoom et al., 2014). En effet, des études menées *in vitro* et *in vivo* sur des chimpanzés indiquent que l'absence de la protéine p7 entraîne une accumulation de structures de capsides intermédiaires incomplètes et un défaut d'incorporation de l'ARN viral au sein de la capside, ce qui suggère l'importance de cette protéine dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales infectieuses (Steinmann et al., 2007) (Sakai et al., 2003) (Jones et al., 2007). Plus récemment, p7 a été décrite pour avoir également un rôle dans la protection de la glycoprotéine E2 contre une dégradation précoce durant les dernières phases de sécrétion des particules virales (Atoom et al., 2013).

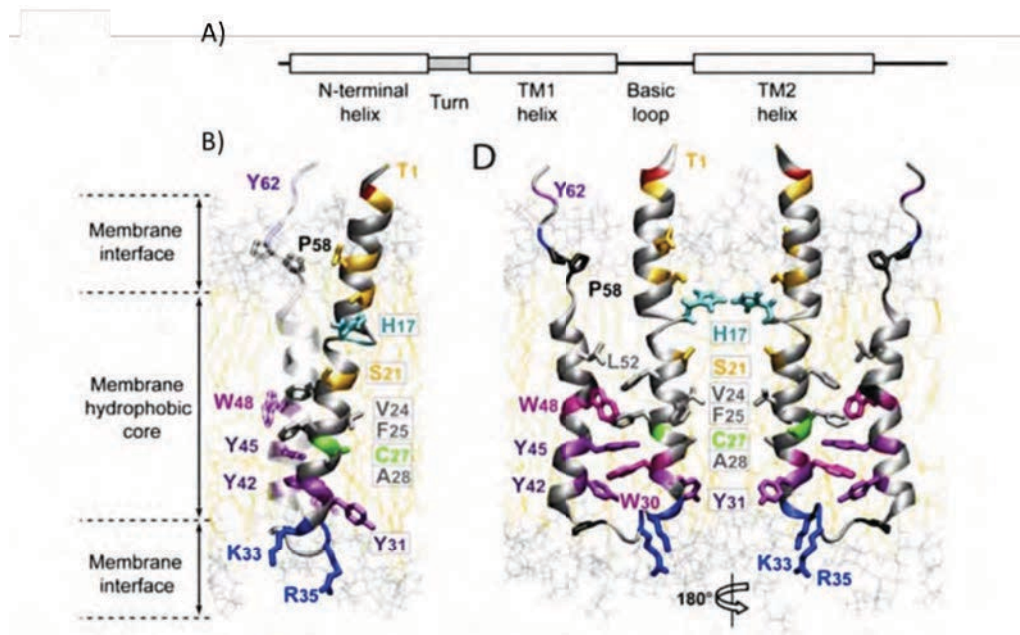


Figure 10 : La protéine p7 du VHC.

A) Représentation schématique de la structure de la protéine p7. La protéine p7 est composée d'une partie N-terminale en hélice et de deux passages transmembranaires en hélice α . B) Formation du viropore par oligomérisation de la protéine p7. (Steinmann and Pietschmann, 2010)

4.5. La protéine NS2

La protéine NS2 est la première protéine non structurale à être traduite après p7. NS2 possède une activité protéase qui est responsable du clivage intramoléculaire entre NS2 et NS3 (Lorenz et al., 2006). Cette protéine est en effet une des deux protéases du VHC (Welbourn and Pause, 2006).

NS2 est une protéine transmembranaire de 23 kDa (217 acides aminés) qui est ancrée aux membranes intracellulaires via sa région N-terminale très hydrophobe (figure 11) (Jirasko et al., 2008). Cette région (de 100 résidus environ) contient trois segments transmembranaires dont les structures ont été déterminées séparément avec une haute résolution par spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) (Fogeron et al., 2015). Concernant le domaine protéase, l'analyse de la structure cristalline de celui-ci indique que la protéase à cystéine est formée d'un homodimère renfermant deux sites actifs composés (Lorenz et al., 2006) (Jirasko et al., 2010). Alors que les résidus His143 et Glu163 de la triade catalytique sont situés sur un des monomères, le résidu Cys184 est présent sur le second monomère (Lorenz et al., 2006).

L'activité cystéine-protéase de la protéine NS2-3 a fait l'objet de nombreuses études. La protéine NS2 possède une activité intrinsèque au niveau de son domaine C-terminal en association avec le tiers de la partie N-terminale de NS3 qui joue un rôle de co-facteur à la protéine (Schregel et al., 2009). Le clivage médié par NS2 est dépendant d'ions de zinc, qui

contribuent de manière indirecte en conférant un bon repliement de la protéine NS3(Lorenz et al., 2006)(Schregel et al., 2009).

Le domaine minimal requis pour l'activité protéase de l'enzyme a été cartographié et défini entre les résidus 907 à 1206, ce qui représente la portion C-terminale de NS2 qui se situe immédiatement après la région hydrophobe en N-terminal(Welbourn and Pause, 2006).

La protéine NS2 du VHC est non seulement importante pour la maturation de la polyprotéine, mais aussi pour la formation de la particule virale. D'une part, son domaine protéase permet de cliver la jonction NS2/3 et ainsi libérer une protéine NS3 totalement fonctionnelle, une étape déterminante pour promouvoir la réplication virale (Penin et al., 2004). D'autre part, NS2 a été décrite également pour jouer un rôle central de coordination lors du processus d'assemblage des particules virales puisqu'elle serait impliquée dans un réseau complexe d'interactions avec notamment E2, p7, NS3 et NS5A (Phan et al., 2009). De plus, des expériences d'adaptation en culture cellulaire ayant pour objectif d'augmenter le titre viral du VHC *in vitro*, ont permis l'identification de résidus au niveau de la protéine NS2 importants pour l'assemblage des particules virales (Yi et al., 2007)(Hwang et al., 2005)(Jirasko et al., 2008)

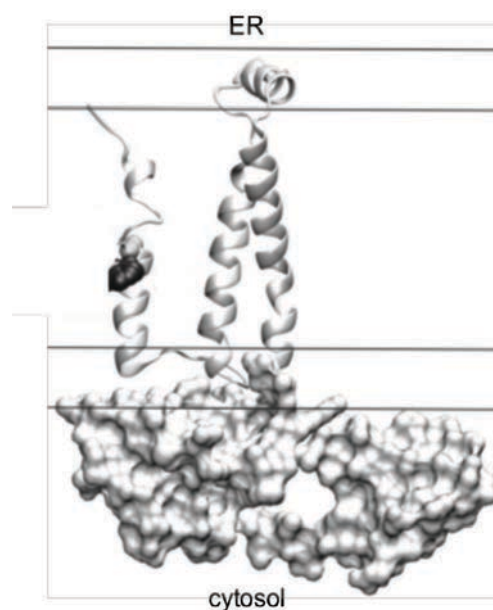


Figure 11 : Structure de NS2 du VHC.

La protéine NS2 du VHC comprend un domaine membranaire en N-terminal, qui comporte trois hélices transmembranaires, et un domaine protéase en C-terminal exposé du côté cytosolique de la membrane du RE. (Adapté de Champeimont et al., 2016)

4.6. La protéine NS3-4A

La protéine NS3-4A est un complexe non-covalent de la protéine NS3 et de son cofacteur NS4A. La protéine NS3 est une protéine bi-fonctionnelle de 70 kDa, comprenant un domaine sérine-protéase localisé dans le tiers N-terminal (de 1 à 180 aa) et un domaine hélicase/NTPase dans les deux tiers restants en C-terminal (de 181-631 aa) (Figure 12) (Morikawa et al., 2011). Les activités des deux enzymes ont largement été étudiées ainsi que leurs structures à haute résolution, de même pour les résidus importants pour leurs sites catalytiques correspondants qui ont été identifiés et caractérisés.

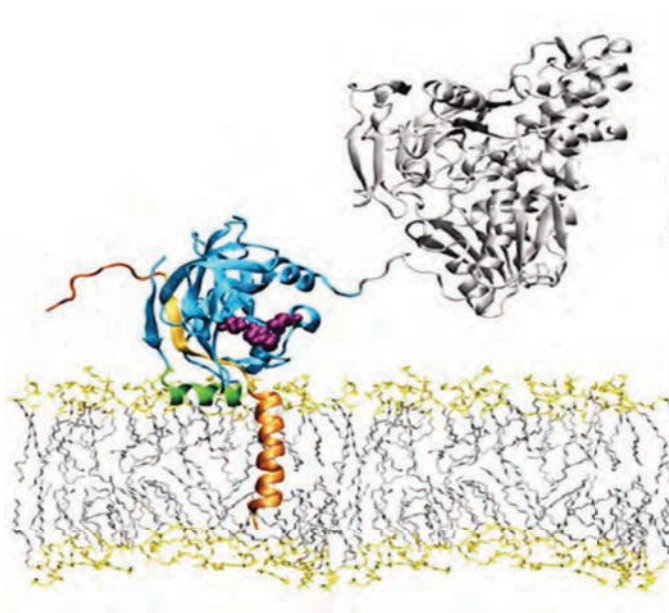


Figure 12 : Modèle représentatif de la protéine NS3/4A associée à la membrane du RE.

Le domaine protéase de NS3 est représenté en bleu, contenant les sites de la triade catalytique représentés (His 57, Asp 81, and Ser 139) en petites sphères violettes. L'hélice α_0 hydrophobe qui est positionnée horizontalement est indiquée en vert. La partie transmembranaire en N-terminale ainsi que le segment central du cofacteur NS4A sont représentés en orange et jaune, respectivement. Le domaine hélicase hydrophile de NS3 est indiqué en gris exposé vers le cytosol. (Tiré de (Brass et al., 2008)

4.6.1. NS3-protéase

Propriétés structurales et biochimiques

Le domaine sérine protéase de 23 kDa possède une structure homologue aux autres protéases à sérine extracellulaires du type trypsine/chymotrypsine (Love et al., 1996)(Kim et al., 1996). Comme ces deux enzymes, la NS3-protéase comporte deux sous-domaines de feuillets β flanqués par deux courtes chaînes en hélices α , avec à l'interface les résidus de la triade catalytique ; Les résidus His-57 et Asp-81 sont situés un des feuillets β tandis que le résidus Ser-139 est localisé sur le second feuillet β (White et al., 2006). La structure de la protéase est

stabilisée par un ion de zinc Zn^{2+} qui est chélaté et coordonné par trois résidus de cystéine et une molécule d'eau, ce qui permet de maintenir une structure tertiaire (Lin, 2006). En l'absence du zinc, la structure de la NS3-protéase n'est pas stable, probablement à cause de sa petite taille et par conséquent l'activité protéase est également affectée (De Francesco et al., 1996).

Les études de l'activité enzymatique ont montré que le domaine protéase isolé (en association avec le Zinc) est actif (Lin, 2006)(White et al., 2006). Néanmoins, une activité optimale et complète nécessite l'association de la protéine NS4A ou au moins d'un peptide de 14 résidus de celle-ci qui viendrait se nicher sous forme d'un brin β au sein de la région hydrophobe centrale de la protéase NS3 (Bartenschlager et al., 1995). Ainsi, cette portion centrale de NS4A (aa 21-32), parfois appelée peptide activateur est requise pour le bon repliement du domaine protéase (Lin et al., 1995). La portion hydrophobe de NS4A en N-terminal (aa 1-21) forme une hélice α transmembranaire essentielle pour l'association du complexe NS3-4A à la membrane (Brass et al., 2008). La portion C-terminale de NS4A (aa 40-54) a été décrite pour interagir avec d'autres composants de la réplique et contribue ainsi à la réplication de l'ARN du VHC mais aussi à l'assemblage de la particule virale (Lindenbach et al., 2007) (Phan et al., 2011) (Gu and Rice, 2013).

Activité catalytique

Le site de liaison du substrat adopte une conformation en niche qui peut accommoder 6 résidus de la chaîne polypeptidique du substrat, mais le clivage est plus efficace avec un substrat de 10 résidus (Morikawa et al., 2011). Le mécanisme catalytique de la NS3-protéase est vraisemblablement identique aux autres protéases à sérine (Love et al., 1996). L'activité protéase de NS3 nécessite la triade catalytique (Ser-139, His-57, and Asp-81) et le trou oxyanion formé par les groupements NH de la Ser-139 et de la Gly-137. L'His-57 est décrite pour avoir un rôle de catalyseur acide-base (Kim et al., 1996). Elle permet de déprotoner le résidu Ser-139 qui servira de catalyseur par covalence. Ainsi, le substrat est positionné au niveau du site actif de telle sorte que le groupement hydroxyle de la Ser-139 permette de cliver la liaison peptidique au niveau du carbone du groupe carbonyle du peptide (Morikawa et al., 2011). L'Asp-81 a pour rôle de maintenir l'arrangement stéréospécifique idéal de la poche qui permet le contrôle de la spécificité de liaison (Lin, 2006)(Kim et al., 1996). Comme pour la superfamille des protéases à sérine, la réaction de catalyse de la NS3 protéase conduit à la génération de deux produits intermédiaires pour aboutir *in fine* à libération de la partie C-terminale du substrat d'origine. L'enzyme revient de nouveau à sa forme initiale, prête à catalyser de nouveau la réaction (Raney et al., 2010). De manière intéressante, les produits peptidiques en N-terminal issus du clivage en *trans* ont été décrits pour inhiber la réaction enzymatique de la protéase (Thibeault et al., 2001)(Francesco and Migliaccio, 2005) (Raney et al., 2010). Cette importante observation a été

à l'origine du développement et de mise au point de nombreux inhibiteurs peptidomimétiques de la protéase NS3(Francesco and Migliaccio, 2005).

Fonctions biologiques

Le processus de maturation de la polyprotéine se produit par une combinaison de clivage autoprotéolytique et de clivage en *trans*. Le modèle actuel suggère que la protéine NS2 en association avec NS3 induit le clivage autoprotéolytique de NS2 et la dissocie de NS3(Horwitz et al., 2013). La protéine NS3 assure ensuite le clivage en *cis* qui lui permet de détacher NS4A d'elle-même et de NS4B. NS4A ainsi libérée, viendrait s'associer avec le domaine N-terminal de NS3 pour former le complexe NS3-4A protéase(Kolykhalov et al., 1994). Ce complexe est alors responsable des clivages en *trans* qui ont lieu au niveau des jonctions NS4B/NS5A et NS5A/NS5B(Tomei et al., 1993).

La protéase NS3-4A est aussi connue pour avoir comme cible plusieurs protéines cellulaires. La plupart des protéines identifiées sont impliquées dans la surveillance immunitaire (tableau TNS3)(Chen et al., 2017). C'est le cas des protéines adaptatrices TRIF (*Toll-like Receptor 3 adaptor protein*), et MAVS (*Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*) qui jouent un rôle critique dans l'activation des voies de signalisation de l'IRF-3 et NFκB, respectivement(Li et al., 2005a)(Meylan et al., 2005). L'inhibition de ces voies de signalisation fait de la protéase NS3-4A une arme incontournable que le VHC utilise pour bloquer la réponse antivirale. Ainsi, la protéase NS3-4A n'est pas seulement un élément essentiel pour le complexe de réplication mais elle est aussi un acteur clé dans la persistance du VHC et dans la pathogénèse de l'hépatite C (Chen et al., 2017).

La protéase NS3 a non seulement émergée en tant que cible importante dans le développement des approches thérapeutiques antivirales(Raney et al., 2010), mais elle est aussi exploitée pour le développement de nouveaux outils d'étude de l'infection virale notamment des systèmes rapporteurs qui permettent de suivre la propagation virale et de permettre de manière sensible la distinction de cellules infectées en temps réel ou sur des échantillons fixés (Jones et al., 2010)(Chen et al., 2010). Ces nouveaux moyens associent localisation, activité et fonction d'un rapporteur à l'activité catalytique de la protéase introduite dans les cellules.

4.6.2. NS3-hélicase

La NS3-hélicase appartient à la superfamille 2 (SF2) des DExH (*DEAH box helicase*) (Kwong et al., 2005) . La NS3 hélicase est essentielle pour la réplication de l'ARN du VHC mais aussi dans l'assemblage des particules virales(Morikawa et al., 2011). Les fonctions biologiques de l'activité de la NS3-hélicase ne sont pas encore bien définies. Néanmoins les quelques études effectuées à ce propos, suggèrent que l'activité hélicase de NS3 est importante pour générer des matrices à simple brin utilisées par la polymérase virale à partir des structures double brin d'ARN,

mais également pour dénouer les structures secondaires qui bloquent les étapes de traduction et de transcription(Frick, 2007).

Selon des analyses biochimiques et structurales de l'enzyme, deux mécanismes ont été proposés concernant la réaction de déroulement de l'ARN(Borowski et al., 2002). En accord avec le premier mécanisme, nommé « passif », la molécule NTPase/hélicase se lie à des régions de simples brins du substrat et ne serait pas activement impliquée dans la séparation des structures doubles brins d'ARN ou d'ADN. En revanche, le second mécanisme de déroulement dit « actif » suggère que la réaction soit NTP-dépendant(Yao et al., 1997). Ainsi, la molécule NTP (*nucleoside triphosphate*) induirait des changements conformationnels à la structure de l'enzyme qui ont pour conséquence de faciliter la liaison des molécules d'ARN ou d'ADN. L'énergie générée de l'hydrolyse du NTP permet à l'enzyme de se déplacer le long du brin de l'acide nucléique(Kim et al., 1998)(Yao et al., 1997).

Un phénomène de coopérativité fonctionnelle a été décrit pour plusieurs enzymes NS3-hélicases. En effet, il a été observé que l'activité de déroulement des acides nucléiques de la NS3-hélicase est augmentée lorsque plusieurs molécules de la NS3-hélicase se lient au même brin du substrat (Levin et al., 2004).

Par ailleurs, il a également été montré que la protéine NS3 complète fixerait mieux l'ARN ou l'ADN comparé au domaine hélicase seul(Frick, 2007). Ceci suggère que le domaine protéase pourrait également interagir avec des acides nucléiques, procurant ainsi une certaine stabilité à l'hélicase lors de son déplacement le long des brins de l'ARN/ADN. Jusqu'à présent, aucune étude ne permet de confirmer cette hypothèse(Raney et al., 2010).

L'intérêt biologique d'une association d'un domaine protéase à un domaine hélicase, observée chez plusieurs virus, n'est pas encore compris. Le domaine protéase peut fonctionner indépendamment du domaine hélicase et vice versa. Plusieurs évidences suggèrent que chacun des domaines module l'activité biologique de l'autre. De manière intéressante, les deux protéines NS3-protéase et NS4A modulent l'activité de l'hélicase de NS3(Beran et al., 2009)(Beran and Pyle, 2008).

Le fait pouvoir séparer physiquement et fonctionnellement les deux activités de la NS3 a favorisé le développement de disciplines tout à fait opposés pour l'étude des deux domaines(Raney et al., 2010). En effet, la majorité des études portées sur l'activité de la NS3-protéase a été très pragmatique, consacrée à la recherche d'inhibiteurs spécifiquement axés sur la thérapie antivirale contre l'hépatite C. Tandis que la plupart des études menées sur le domaine hélicase de NS3 ont toujours été beaucoup plus fondamentales, visant le plus souvent à utiliser la NS3-hélicase comme un modèle des protéines DExH en général.

4.7. La protéine NS4B

La protéine NS4B est une petite protéine membranaire de 27 kDa de nature hydrophobe. La protéine comporte quatre domaines transmembranaires et deux portions C- et N- terminales orientées vers le cytoplasme. Les extrémités N-terminales sont essentielles pour l'association de la protéine à la membrane du RE et pour induire l'agrégation des vésicules lipidiques, nécessaire pour la réplication virale (figure 13) (Lundin et al., 2003)(Rai and Deval, 2011).

Une des fonctions de NS4B la plus documentée est sa capacité à induire les « *membranous web* », un réseau multivésiculaire issu d'altérations membranaires spécifiques au virus qui abritent le complexe de réplication. Son expression seule est suffisante pour induire les *membranous web* (Moradpour et al., 2003)(Egger et al., 2002). Cependant, il n'est pas encore bien élucidé par quels mécanismes NS4B entraîne la formation de ces vésicules membranaires. Il a été rapporté que l'oligomérisation de la protéine NS4B via sa partie N-terminale et sa palmitoylation via son extrémité C-terminale sont nécessaires pour la formation *membranous web* (Yu 2006) (Gouttenoire 2010). Plus récemment, des motifs de glycines ont été identifiées au niveau des domaines transmembranaires, jouant un rôle structural et fonctionnel important dans biogénèse des *membranous web*(Paul et al., 2018).

Durant la réplication virale, la NS4B co-localise avec les autres protéines non-structurales au niveau du RE (Rai and Deval, 2011). De plus, plusieurs études ont montré une interaction de NS4B avec d'autres autres protéines non-structurales notamment NS3-4A, NS5A et NS5B mais aussi avec l'ARN viral(Sklan and Glenn, 2006)(Dimitrova et al., 2003). Ainsi, la NS4B jouerait un rôle de protéine d'échafaudage pour la formation du complexe de réplication(Rai and Deval, 2011).

D'autres études décrivent également l'implication de NS4B dans la réplication du VHC. Des expériences en culture cellulaire ont permis d'identifier des mutations d'adaptation situées au niveau de la protéine NS4B qui améliorent considérablement la réplication de l'ARN(Lohmann et al., 2003)(Elazar et al., 2004). Par ailleurs, NS4B serait impliquée dans l'assemblage des particules virales. Dans ce contexte, des mutations d'adaptation au niveau de la partie C-terminale de NS4B permettraient d'augmenter la production des particules virales infectieuses de manière indépendante de la réplication de l'ARN (Jones et al., 2009).

La protéine NS4B possède également une activité enzymatique ATP/GTPase. Cette capacité de NS4B à hydrolyser l'ATP/GTP aurait pour rôle d'apporter une certaine autonomie énergétique au virus qui serait importante pour les remaniements des membranes et la mise en place des *membranous web* (Gouttenoire et al., 2010)(Einav et al., 2004)

Plusieurs études ont montré la contribution de NS4B dans l'échappement à la réponse immunitaire(Tasaka et al., 2007)(Tripathi et al., 2010). NS4B serait capable de bloquer RIG-I et ainsi inhiber la voie interféron en ciblant la protéine MAVS (encore nommée Cardif ou IPS)(Tasaka et al., 2007). Récemment, la protéine NS4B a été également décrite pour interférer avec la voie

d'interféron médiée par le TLR3 en induisant la dégradation de la protéine TRIF(Liang et al., 2018).

NS4B est aussi impliquée dans de nombreux processus notamment dans le métabolisme lipidique(Park et al., 2009) mais aussi l'induction de l'apoptose (Zhao et al., 2012), du stress du RE(Li et al., 2009), de la carcinogénèse(Hu et al., 2016) (Li et al., 2012b).

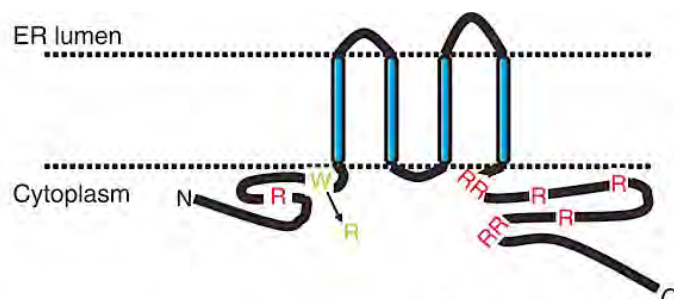


Figure 13 : Représentation schématique de la NS4B associée à membrane du RE.

La protéine NS4B est une protéine membranaire comprenant 4 hélices transmembranaires. Les régions N- et C-terminales sont situées sur le versant cytoplasmique. Les acides aminés conservés sont présentés en rouge (D'après Einav et al., 2008)

4.8. La phosphoprotéine NS5A

La protéine NS5A est une protéine multifonctionnelle qui joue un rôle crucial dans la réplication de l'ARN du VHC et dans l'assemblage des particules virales (Tellinghuisen et al., 2008a)(Pawlotsky and Germanidis, 1999). NS5A est une phosphoprotéine dont les formes phosphorylée (p56) et hyperphosphorylée (p58) sont impliquées à différentes étapes du cycle viral(Huang et al., 2007b). NS5 est une protéine d'environ 447 résidus qui contient une hélice α en N-terminal, très conservée, qui permet l'ancrage de la protéine à la membrane(Brass et al., 2002). NS5A possède aussi trois domaines structuraux (I, II et III) (Figure14). Le domaine I est relativement le mieux documenté. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée. Il contient des motifs de liaison à l'ion de zinc (Zn^{2+}) et à l'ARN(Tellinghuisen et al., 2005)(Huang et al., 2005). Le domaine II est associé à la réplication et aurait également d'autres fonctions via l'interaction avec plusieurs protéines(Tellinghuisen et al., 2008b). Tandis que le domaine III est essentiel pour l'assemblage des particules virales mais largement dispensable pour la réplication(Appel et al., 2008).

NS5A est localisée majoritairement au niveau de la membrane du RE et fait partie du complexe de réplication(Brass et al., 2002). Cette observation, parmi tant d'autres, suggère l'implication de la NS5A dans la réplication. NS5A a été décrite pour interagir avec la polymérase NS5B et réguler son activité, mais aussi avec l'extrémité 3' de l'ARN (Shirota et al., 2002)(Huang

et al., 2005). De plus, dans un système de réplicon, des mutations d'adaptation identifiées au niveau de NS5A confèrent une meilleure efficacité de répllication en culture cellulaire (Lohmann et al., 2003)(Krieger et al., 2001)(Blight et al., 2000). De manière intéressante, certaines de ces mutations affectent la phosphorylation de NS5, ce qui suggère que la phosphorylation joue un rôle dans la répllication du virus. La phosphorylation de NS5A semble être un processus bien régulé et implique plusieurs protéine kinases cellulaires notamment la caséine-kinase II (Huang et al., 2007b). De plus, l'association d'autres protéines virales telles que NS4A affecterait la phosphorylation de la NS5A. L'hyperphosphorylation de NS5A s'est avérée jouer un rôle de régulateur négatif de la répllication, via son interaction avec la protéine hVAP-A, nécessaire à la répllication du VHC (Evans et al., 2004). D'un autre côté, la phosphorylation de NS5A au niveau de sa partie C-terminale serait importante pour la production de particules virales infectieuses (Tellinghuisen et al., 2008a)(Masaki et al., 2008).

La protéine NS5A a été décrite également pour interférer avec la réponse immunitaire liée à l'interféron en particulier, en entraînant la déphosphorylation de STAT-1(Lan et al., 2007).

NS5A est devenue un point de mire des recherches sur le VHC puisque divers inhibiteurs de ses fonctions ont été développés faisant partie des trois classes majeures de DAA. Les plus récents des inhibiteurs de NS5A présentent une meilleure activité pangénotypique et possèdent un grand potentiel antiviral (Spengler, 2018).

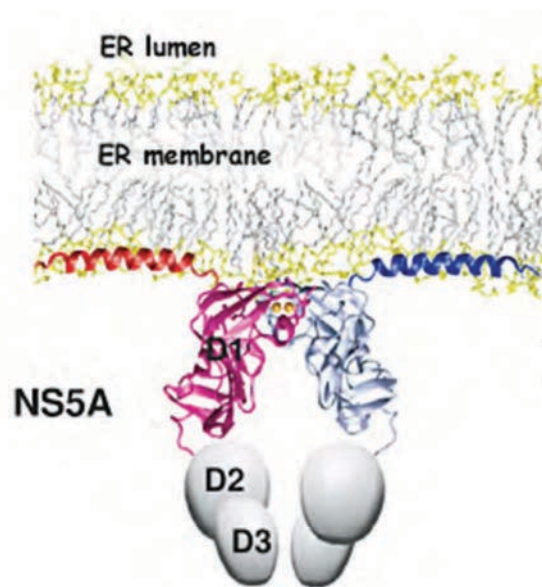


Figure 14 : Structure de la protéine NS5A associée à la membrane du RE.

NS5A dans ce modèle est organisée en dimère. La protéine NS5A comporte trois domaines fonctionnels D1, D2 et D3. La partie N-terminale appartenant au D1 forme une hélice- α amphipathique très conservée qui permet l'ancrage de la protéine au niveau de la membrane du RE. (Adapté de Moradpour et al., 2007)

4.9. La protéine NS5B

La protéine NS5B est l'ARN-polymérase virale ARN-dépendante. C'est donc le centre catalytique de la machinerie de réplication virale. L'enzyme synthétise l'ARN en utilisant l'ARN comme matrice. La NS5B est décrite pour synthétiser de l'ARN de novo (Luo et al., 2000) (Zhong et al., 2000).

C'est une protéine associée à la membrane par son domaine C-terminal structuré en hélice α transmembranaire. Cet ancrage à la membrane est essentiel à la réplication du VHC mais dispensable pour l'activité enzymatique (Moradpour et al., 2004). La partie N-terminale de NS5B possède l'activité catalytique de la protéine (Bressanelli et al., 1999). La structure cristalline du domaine catalytique est comparable aux autres polymérases organisées en trois domaines appelés « doigt », « pouce » et « paume » (Figure 15) (Bressanelli et al., 2002). Le domaine « paume » contient le site actif de l'enzyme, tandis que les domaines « pouce » et « doigt » modulent l'interaction avec le brin d'ARN. Le pouce et le doigt forment un tunnel à travers lequel les simples brins d'ARN sont directement acheminés vers le site catalytique (Ago et al., 1999) (Bressanelli et al., 2002). Les NTPs s'incorporent dans le site actif à travers un autre tunnel positivement chargé (Bressanelli et al., 1999). Comme la plupart des polymérases virales, NS5B commet beaucoup d'erreurs d'appariement au cours de son activité et est dépourvue de fonction de correction d'épreuves ce qui contribue à l'introduction de mutations et donc à la variabilité génétique du génome viral.

L'activité de la polymérase NS5B serait modulée par d'autres protéines virales notamment NS3 et NS5A (Bartenschlager et al., 2004). De plus, plusieurs facteurs cellulaires ont été identifiés sur leur capacité à interagir avec la NS5B et à moduler son activité (Marascio et al., 2014). C'est le cas pour la cyclophiline B qui interagit avec NS5B et stimule sa liaison à l'ARN (Watashi et al., 2005).

Au cours de la dernière décennie, NS5B a représenté une cible thérapeutique pour l'inhibition de la réplication virale. Récemment, deux inhibiteurs de NS5B, le sofosbuvir et le dasabuvir ont été développés et sont actuellement administrés en combinaison avec d'autres inhibiteurs notamment le velpatasvir comme traitement contre le VHC avec une efficacité de 95-100% (Carter et al., 2017).

Tout récemment, en 2016, une nouvelle bithérapie a été approuvée. Il s'agit de l'inhibiteur de la protéine virale NS5A velpatasvir (Epclusa) combinée au sofosbuvir. Cette bithérapie constitue le 1^{er} traitement pouvant guérir des 6 géotypes majeurs du VHC. De plus, les taux de SVR sont améliorés de 95% jusqu'à même 100% après 12 semaines de traitement (Carter et al., 2017)

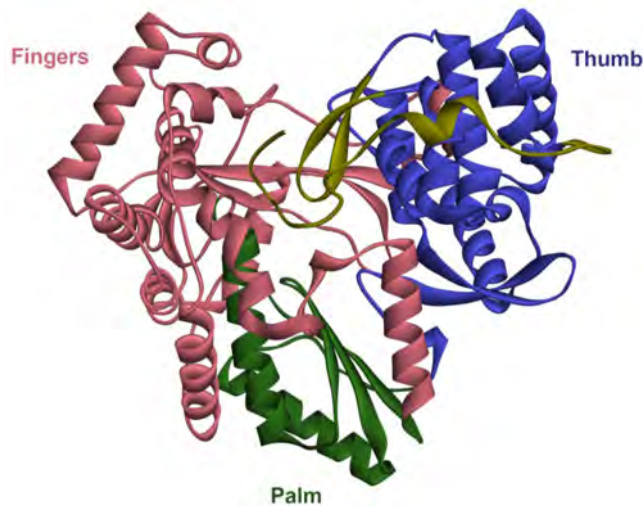


Figure 15 : Structure de la polymérase NS5B.

La structure de NS5B a une organisation en forme de main droite, constituée de trois domaines, « les doigts » (en rouge), « le pouce » (en bleu) et « la paume » (en vert) encerclant le site actif au niveau du domaine « paume ». (Eltahla et al., 2015)

5. Modèles d'étude

Il est évident que les récents succès, depuis deux décennies, découlent des efforts déployés pour l'élaboration de systèmes expérimentaux qui ont conduit aux progrès énormes sur des aspects variés de l'infection par le VHC. Depuis la découverte du VHC en 1989 (Choo et al., 1989), l'absence d'un système de culture cellulaire permettant la production de virions infectieux, représentait un obstacle majeur pour mener des études sur le VHC. Il est possible, à présent, d'étudier toutes les étapes du cycle viral du VHC *in vitro* et sur des petits modèles animaux, de disséquer les interactions hôte-virus, et d'investiguer la contribution de l'hôte dans la mise en place de la chronicité et dans la progression de l'hépatite C.

5.1. Les systèmes de culture *in vitro*

5.1.1. Système de réplicon

En 1999, Lohmann et al. ont réussi à établir une unité minimale de réplication requise pour l'initiation et le maintien de la réplication dans des cellules humaines (Lohmann et al., 1999). La mise en place de ce système de réplication a été un jalon dans la recherche sur le VHC. Le réplicon subgénomique, initialement établi sur la souche Con1 de génotype 1b, est basé sur une construction sous forme d'un ARN bicistronique qui comporte deux cadres de lecture. Le premier contient un gène de résistance à un antibiotique (néomycine) ou un gène rapporteur (Luciférase) qui est sous le contrôle d'un IRES. Tandis que le second cadre de lecture comprend l'unité minimale de réplication de NS3 à NS5B sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV

(*encephalomyocarditis virus*) (Figure 16) (Lohmann et al., 1999). L'insertion du gène de résistance à un antibiotique dans cette construction a permis de générer des lignées cellulaires exprimant de manière stable le réplicon subgénomique après sélection avec l'antibiotique ciblé. D'autre part, l'intérêt d'exprimer la luciférase comme gène rapporteur est de pouvoir obtenir une meilleure estimation du taux de réplication en suivant l'activité de la luciférase (Krieger et al., 2001). L'efficacité de réplication de ce réplicon subgénomique a été améliorée par des mutations d'adaptation qui ont conduit à l'émergence de variants avec une haute capacité répliquative (Krieger et al., 2001)(Lohmann et al., 2001)(Yi and Lemon, 2004).

Ainsi, grâce au système du réplicon, il est devenu possible, pour la première fois, d'étudier *in vitro* la réplication de l'ARN du VHC de manière efficace mais aussi d'explorer les aspects structuraux du complexe de réplication, les processus basiques de réplication, les interactions hôte-virus mais aussi de tester des agents antiviraux (Brass et al., 2007)(Moradpour et al., 2007).

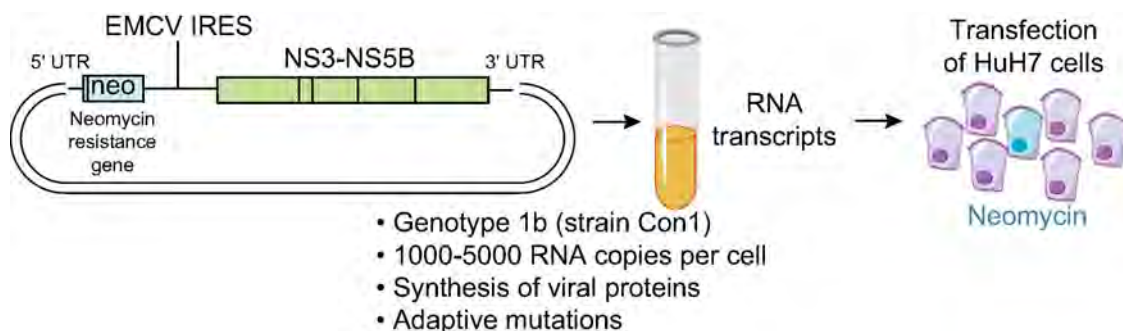


Figure 16 : Principe de la génération du système réplicon du HCV.

Le réplicon subgénomique comporte l'unité minimale de réplication (la régions 5', les séquences codant les protéines structurales de NS3 jusqu'à NS5B et de la région 3'UTR du VHC) qui est insérée dans une construction bicistronique contenant un gène de la résistance à la néomycine. Suite à la transcription *in vitro* de cette construction, les ARN sont transfectés dans la lignée cellulaire hépatocytaire (Huh7). Les cellules ayant intégrées le réplicon sont sélectionnées par la néomycine. (D'après Bukh, 2016)

5.1.2. Particules rétrovirales pseudotypées (VHCpp)

Le développement des pseudo-particules du VHC (VHCpp) en 2003 constitue une avancée majeure pour l'étude du processus d'entrée du VHC (Bartosch et al., 2003a). Cet outil consiste en l'expression des glycoprotéines d'enveloppe du VHC à la surface d'une particule enveloppée contenant une capsidie rétrovirale (figure17).

Les VHCpp sont produits par co-transfection dans des cellules HEK-293T (*human embryonic kidney cells*) de trois plasmides ; une construction codant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et

E2, un plasmide codant les protéines rétrovirales gag et pol et enfin une construction comportant un gène rapporteur permettant une estimation quantitative de l'entrée du VHC dans les cellules cibles (Drummer et al., 2003)(Bartosch et al., 2003a)(Hsu et al., 2003). Après transfection, les particules pseudotypées sécrétées dans le surnageant sont utilisées pour des tests d'infection. Ces VHCpp offrent l'opportunité d'étudier l'étape de l'entrée virale. Ce système a été également un moyen déterminant pour étudier le rôle des glycoprotéines d'enveloppe dans l'entrée du virus (Bartosch and Cosset, 2009). Il a permis entre autres l'identification des facteurs d'attachement et d'entrée et d'élucider les mécanismes d'internalisation du virus (Ploss and Evans, 2012). De plus, cet outil a permis de tester l'efficacité d'anticorps neutralisants à partir de sérums de patients ou de chimpanzés infectés (Meunier et al., 2005)(Logvinoff et al., 2004)(von Hahn et al., 2007). Les VHCpp sont aussi un bon modèle pour tester des antiviraux qui ciblent l'étape de l'entrée virale(Ploss and Evans, 2012).

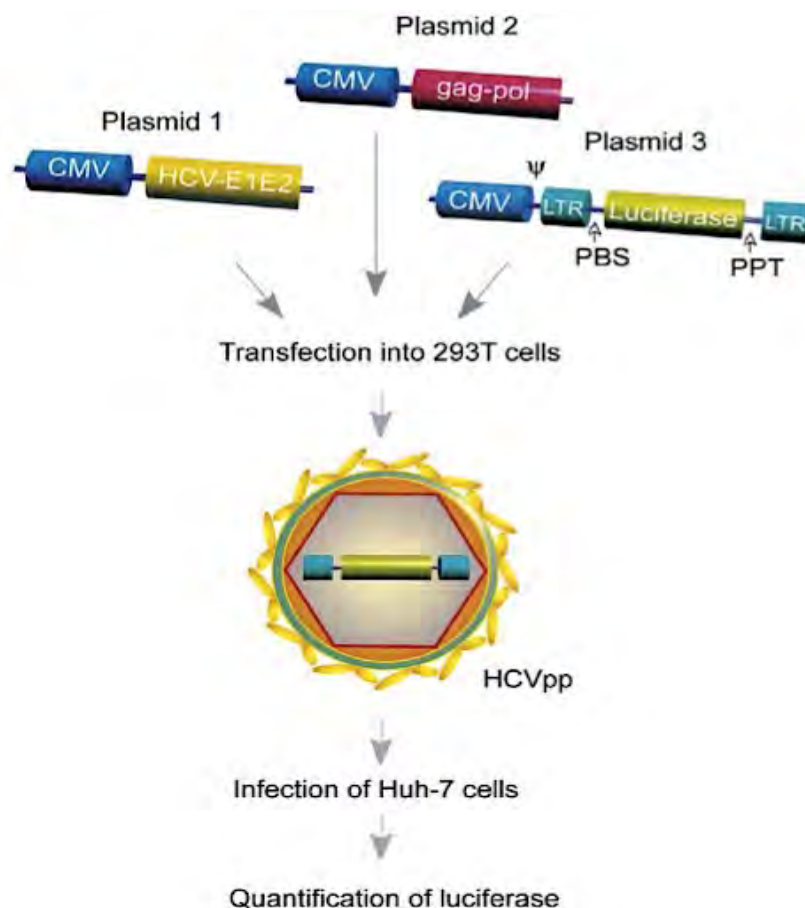


Figure 17 : Représentation schématique du système HCVpp.

Les particules du système HCVpp sont produites par transfection simultanée des cellules HEK293T avec 3 plasmides : un plasmide contient les séquences des protéines GAG/POL du HIV, un deuxième les glycoprotéines d'enveloppe du HCV et un troisième un gène rapporteur. Les particules obtenues sont ensuite utilisées pour étudier l'étape d'entrée du HCV (Adapté à partir Voisset and Dubuisson, 2004)

5.1.3. Le système de culture cellulaire (VHCcc)

L'infection de cellules par le VHC provenant des isolats de patients infectés ne permet pas d'obtenir une infection productive. Jusqu'à présent, la seule exception concerne un isolat de génotype 2a provenant d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante baptisé JFH1 (*Japanese fulminant hepatitis, clone 1*) (Kato et al., 2003)(Wakita et al., 2005). Ce dernier a la capacité d'initier une infection à faible niveau dans des cellules Huh7. Ce fut en 2001, lorsque l'équipe de Kato a publié la séquence du génotype JFH1 indiquant une majeure différence de séquences comparée aux autres isolats du même génotype, en particulier au niveau de l'extrémité 5'UTR, core, NS3 et NS5A (Kato et al., 2001). En 2003, il a été montré que le réplicon subgénomique de JFH1 avait la capacité de répliquer dans les cellules Huh7 sans mutations d'adaptation et pouvait produire des titres 20 fois plus élevés que le réplicon Con1 adapté (Kato et al., 2003). Quatre ans plus tard, Wakita et ses collaborateurs ont réussi à générer des particules virales infectieuses en culture cellulaires ou VHCcc, après avoir cloné l'ADN complémentaire (ADNc) à partir du génome complet de JFH1 et l'avoir mis sous le contrôle d'un promoteur T7 pour permettre la transcription *in vitro* de l'ARN viral(Wakita et al., 2005). Ainsi, c'est à partir de l'ARN électroporé dans des Huh7 que des particules VHCcc ont été produites et sécrétées dans le milieu de culture et capables d'infecter des cellules Huh7 naïves (figure 18). Des meilleurs taux de réplication ont été obtenus avec des cellules dérivées des Huh7, les Huh7.5 (Lindenbach et al., 2005) et Huh7.5.1 (Zhong et al., 2005). De manière intéressante, il a été montré que les VHCcc peuvent aussi infecter des chimpanzés et des souris humanisées, permettant ainsi d'évaluer des vaccins candidats *in vivo* (Lindenbach et al., 2006)(Bukh and Purcell, 2006). Dans le but d'améliorer l'efficacité d'infection, des mutations d'adaptation ont été identifiées sur le JFH1 après une succession d'infections réalisée sur des cellules Huh7 (Lohmann et al., 2003). Ces mutations ont été réintroduites dans le génome parental augmentant de manière efficace les titres viraux. A partir du JFH1 original, différentes chimères intra- et inter-génotypiques ont été générées avec des souches de différents génotypes visant à exploiter l'efficacité de réplication du JFH1 et d'ouvrir la possibilité d'étudier d'autres génotypes (Gottwein et al., 2009)(Jensen et al., 2008)(Pietschmann et al., 2006).

Ce modèle de VHCcc a été une percée importante qui a rendu possible pour la première fois d'étudier le cycle viral complet du VHC en culture cellulaire. Il a conduit également à l'identification de plusieurs facteurs tels que des facteurs d'entrée et d'assemblage (Randall et al., 2007)(Cocquerel et al., 2006). Il permet de mieux comprendre la fonction de certaines régions ou protéines du VHC grâce à des études de génétiques inverse (Yi et al., 2007). Enfin, de manière importante, ce système permet de tester des thérapeutiques contre le VHC notamment les inhibiteurs de protéines virales *in vitro* dans un contexte de cycle virale complet(Catanese and Dorner, 2015).

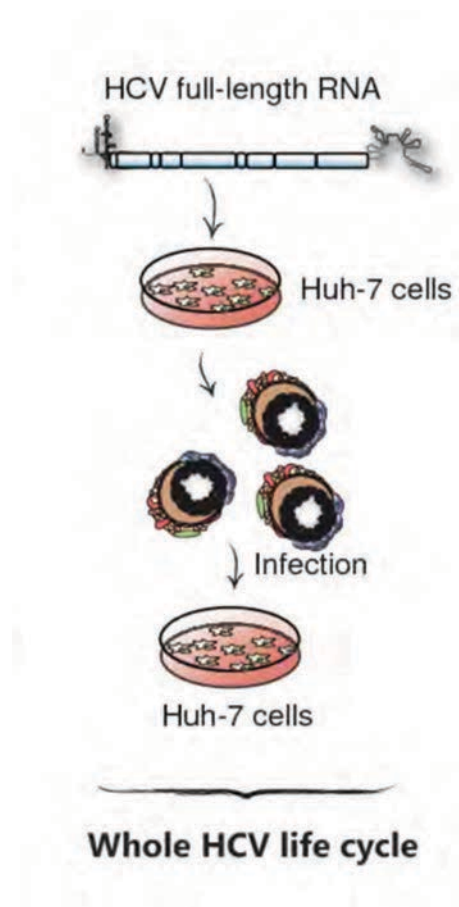


Figure 18 : Principe de génération du système de culture HCVcc.

Le plasmide comportant la séquence entière du génome viral de la souche JFH1 ou d'autres souches du VHC est transcrit *in vitro*. L'ARN obtenu est transfecté dans des cellules Huh-7, ce qui aboutit à la traduction et la réplication du génome dans ces cellules et à la sécrétion des particules virales infectieuses. Ces particules sont ensuite utilisées pour infecter des cellules natives permettant ainsi de compléter le cycle viral du HCV (Adapté à partir de Steinmann & Pietschmann, 2013).

5.2. Modèles animaux

5.2.1. Chimpanzés

L'espèce humaine constitue l'hôte naturel du VHC. Les chimpanzés (*Pan troglodytes*) peuvent être infectés expérimentalement et sont le seul modèle animal alternatif. Malgré une évolution clinique de l'infection plus faible chez les chimpanzés, ces derniers reproduisent de nombreux aspects de l'hépatite C (Jo et al., 2011). Contrairement à l'homme, la phase aiguë de l'hépatite C est plus fréquemment observée chez le chimpanzé (Bassett et al., 1998). Grâce à cette particularité, nombreuses données ont été produites sur cette phase de l'infection. Le modèle chimpanzé a également apporté une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-VHC. Il a permis d'étudier les interactions hôte-virus et de tester différentes molécules ciblant des protéines du VHC à visée thérapeutique, ou des candidats vaccins (Nascimbeni et al.,

2003)(Grakoui et al., 2003)(Bukh et al., 2001). De plus, les premiers clones infectieux ainsi que les VHCcc ont été pu être validés *in vivo* chez le chimpanzé (figure19)(Yanagi et al., 1997)(Kolykhalov et al., 1997). Cependant, ces animaux sont moins sujets à des hépatites chroniques que l'homme. Comme est évoqué précédemment, les chimpanzés éliminent le virus dans la majorité des cas et ne développent pas de fibrose, ni de cirrhose, encore moins d'hépatocarcinome (Jo et al., 2011). Le chimpanzé n'est donc pas le bon modèle pour étudier ces aspects de la maladie. De plus, les chimpanzés ne répondent pas au traitement par l'IFN- α (Bukh, 2004). Le chimpanzé était le modèle le plus important *in vivo* pour le VHC jusqu'en 2003 où la recherche sur le chimpanzé a été bannie dans la plupart des pays pour des raisons d'éthique (Catanese and Dorner, 2015).

5.2.2. Les souris génétiquement humanisées

Les souris sont naturellement résistantes à l'infection par le VHC. Les deux processus d'entrée et de réplication sont limités dans les cellules murines (Dorner et al., 2011). La manipulation génétique de l'hôte peut être utilisée pour inhiber l'expression de facteurs cellulaires qui empêchent une infection productive par le VHC, ou à l'opposé pour compléter l'hôte avec des facteurs humains exogènes qui sont essentiels pour ce processus. Pour cela, il est essentiel de connaître les barrières qui déterminent le tropisme humain du VHC. Le VHC utilise différents récepteurs d'entrée dans l'hépatocyte. Parmi eux, CD81 et l'occludine ont été identifiés comme étant des facteurs limitant du tropisme du VHC chez la souris (Ploss et al., 2009). Ainsi, pour tenter de palier à cette entrave, des souris exprimant de manière transitoire les récepteurs d'entrée humains notamment le CD81 et l'occludine via des adénovirus recombinants ont été générées et ont permis pour la première fois, d'observer l'entrée du virus dans ces hépatocytes murins humanisées (Dorner et al., 2011). Malgré cette observation, la réplication du VHC n'était pas efficace. Néanmoins, cette approche a été utile pour tester des inhibiteurs d'entrée et des candidats vaccins (Giang et al., 2012). Sur la base de ce travail, des souris transgéniques exprimant quatre récepteurs d'entrée humains (4hEF) et déficientes pour plusieurs voies de signalisation de la réponse immunitaire ont permis d'observer non seulement l'entrée du virus dans les hépatocytes murins mais en plus une réplication si ce n'est qu'à faibles taux (Dorner et al., 2013). Cette approche a été développée chez des souris de fond génétique différent et les résultats obtenus étaient largement différents en ce qui concerne la réplication et le taux de virémie mais aussi la capacité à évoluer vers une infection chronique (Chen et al., 2014). Ces observations confirmaient que l'importance du fond génétique de l'hôte dans l'infection par le VHC.

5.2.3. Les souris chimériques xénotransplantées

L'humanisation du foie de la souris par xénotransplantation constitue un modèle très intéressant pour l'étude des interactions entre le VHC et les hépatocytes primaires humains (PHH) *in vivo* (Catanese and Dorner, 2015). Une particularité commune à toutes les souches murines receveuses est la nécessité d'une immunosuppression intensive dans le but d'éviter le rejet de la xénogreffe et de faciliter le maintien du greffon humain. Cette approche est souvent réalisée en utilisant des souris receveuses qui sont déficientes pour les cellules T, B, et NK (Rhim et al., 1995)(Catanese and Dorner, 2015). La grande capacité de régénération des hépatocytes après leur migration et leur incorporation dans le foie, leur offre la possibilité de repeupler le parenchyme hépatique presque totalement. Pour cela les hépatocytes ont besoin de signaux de régénération (Rhim et al., 1995). Ainsi, des souris transgéniques ont été créés surexprimant l'activateur d'urokinase plasminogène (uPA) spécifiquement au niveau du foie, ou en délétant des facteurs empêchant les hépatocytes à recoloniser le foie tels que l'enzyme fumarylacetoacetate hydrolase (FAH). Ceci aboutit à la destruction des hépatocytes murins. Le foie de ces souris ainsi détruit est recolonisé par des hépatocytes humains(Mercer et al., 2001)(Azuma et al., 2007). Ces souris peuvent ensuite être infectées par le VHC. (Vercauteren et al., 2014). Ces modèles de souris sont respectivement, les souris *uPA-SCID* (*Severe Combined ImmunoDeficiency*), et les souris *FRG* (*Fah/Rag2/Il2rg*). De manières intéressantes, non seulement le VHCcc peut infecter ces souris chimériques, mais aussi des isolats de patients infectés de différents génotypes sont capables d'infecter ces souris avec succès. Ce modèle a fortement contribué à la compréhension de la biologie du VHC, allant de l'évaluation des anticorps neutralisants (Meuleman et al., 2011)(Akazawa et al., 2013), à la validation du rôle de certains facteurs essentiels pour l'entrée tel l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Lupberger et al., 2011), ainsi que les tests de drogues ciblant différents aspects du cycle viral (Ray et al., 2013)(Watanabe et al., 2013).

Récemment, des modèles de souris chimériques ont été générées comportant le foie mais aussi le système immunitaire humain (Washburn et al., 2011)(Bility et al., 2014). Des cellules souches hématopoïétiques de différents donneurs ont été injectées permettant de reconstituer un système immunitaire humain(Wilson et al., 2014)(Gutti et al., 2014). Ce modèle contrairement au précédent, offre la possibilité d'étudier l'immunopathogénèse du VHC, notamment la réponse immunitaire adaptative ainsi que l'efficacité des vaccins (Vercauteren et al., 2015). Ce modèle permet aussi d'étudier la fibrose induite par la réponse immune à l'infection virale C (Washburn et al., 2011)

6. Cycle viral

6.1. Attachement, entrée et fusion

L'entrée virale joue un rôle important pour le tropisme hépatocytaire du VHC. Les virions ont un contact direct avec la surface basolatérale des hépatocytes (Dubuisson and Cosset, 2014). Ainsi, ces virions interagissent avec des facteurs d'attachement présents à la surface cellulaire. L'attachement initial des particules du VHC sur l'hépatocyte implique des héparanes sulfates (HS) comme pour de nombreux virus (Shi et al., 2013). Bien que ces molécules se lient avec une faible affinité aux particules virales, cette interaction est importante pour que la liaison du virus avec les récepteurs d'entrée puisse aboutir. L'interaction des HS avec le virus se fait par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine E associée à la particule virale (Lefèvre et al., 2014). A la suite de cette association aux HS du virus, le récepteur aux LDL (LDLR) a été proposé comme un facteur potentiel pour l'attachement du VHC à la surface des hépatocytes (Monazahian et al., 1999)(Albecka et al., 2012).

Après un attachement initial sur la surface des hépatocytes, le virus interagit avec des facteurs spécifiques d'entrée, ce qui conduit à des réarrangements au niveau de la membrane plasmique permettant l'internalisation du virus (Zhu et al., 2014). Il est admis que l'action coordonnée d'au moins quatre facteurs cellulaires majeurs sont essentiels à l'entrée du VHC qui incluent le récepteur SR-BI (récepteur scavenger BI), la tétraspanine CD81 et les protéines de jonction serrée claudine-1 (CLDN1) et occludine (OCLN)(Cocquerel et al., 2006)(Bartosch et al., 2003b).

SR-BI est considéré comme étant le premier facteur d'entrée interagissant avec le virus après l'étape d'attachement (Scarselli et al., 2002)(Barth et al., 2005). Les rapports récents suggèrent que SR-BI à travers son activité de transfert de lipides, permettrait l'apprêtement de la particule virale pour sa liaison avec le CD81, facilitant ainsi l'accès à l'étape suivante (Thi et al., 2012). Le récepteur CD81 de la famille des tétraspanines, est incontestablement un facteur clé pour l'étape d'entrée du VHC (Fénéant et al., 2014). Les résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction avec CD81 sont situés au niveau de la surface de la protéine E2 (Kong et al., 2013). Cette interaction serait importante pour préparer les protéines de l'enveloppe du VHC à la fusion et à l'endocytose (Sharma et al., 2011). CD81 a été décrit également pour interagir avec la protéine CLDN1 pour former un complexe qui facilite le processus d'entrée du VHC (Harris et al., 2010). Cette association CD81-CLDN1 serait régulée par plusieurs voies de signalisation. Ainsi, un des facteurs favorisant la formation du complexe CD81-CLDN1 est le récepteur de facteur de croissance épithéliale EGFR (Lupberger et al., 2011). L'occludine est une autre protéine de jonction serrée impliquée dans les étapes de post-attachement (Ploss et al., 2009)(Benedicto et al., 2009). L'occludine constitue avec CD81 deux déterminants essentiels du tropisme du VHC

pour les hépatocytes humains (Ploss et al., 2009). Cependant, le rôle précis de l'occludine n'est pas très bien connu.

L'internalisation des particules du VHC se fait par endocytose clathrine dépendante (Blanchard et al., 2006). De manière intéressante, il a été montré que les complexes CD81-CLDN1 sont internalisés de manière clathrine et dynamine dépendante (Farquhar et al., 2012). Après internalisation, les virions sont transportés vers les endosomes où la fusion a lieu.

La fusion constitue la dernière étape de l'entrée du VHC avant que la capsid soit relarguée dans le cytoplasme. La fusion est un processus qui est étroitement lié aux lipides et dépendant du pH endosomal (Haid et al., 2009). A faible pH les glycoprotéines sont réarrangées pour adopter à la fin une conformation de post-fusion (Kielian and Rey, 2006). En conséquence de ce changement de conformation, l'enveloppe virale se relie à la membrane de l'endosome entraînant une distorsion des deux couches lipidiques qui s'entremêlent avec l'enveloppe virale puis aboutit à la formation d'un pore de fusion et la libération de la capsid dans le cytosol (Mukhopadhyay et al., 2005)(Stiasny et al., 2011).

6.2. Traduction et maturation

Comme le génome du VHC est un ARN de polarité positive, il est immédiatement traduit une fois dans le cytoplasme, en une polyprotéine virale par la machinerie cellulaire. La traduction est initiée par l'IRES viral situé au niveau de la région 5'UTR, qui recrute les sous-unités ribosomales, des facteurs d'initiation de traduction (Hoffman and Liu, 2011). En parallèle de la traduction de la polyprotéine, une initiation de traduction à partir d'un cadre de lecture alternatif peut se produire donnant naissance à la protéine ARFP (*cf. Protéine ARFP section : protéines virales*). La traduction a lieu en étroite association avec les membranes du RE qui contiennent les enzymes nécessaires pour le clivage des régions structurales de la polyprotéine(Niepmann, 2013). Comme évoqué précédemment, la polyprotéine est clivée de manière co- et post-traductionnelle, par des protéases cellulaires et virales, pour générer 10 protéines matures (Voir section : protéines virales).

6.3. Réplication

Après clivage de la polyprotéine, la première tâche des protéines virales néo-synthétisées consiste à assurer la réplication de l'ARN, un processus à plusieurs étapes qui est contrôlé par l'action coordonnée de protéines virales et cellulaires ainsi que les régions UTR de l'ARN viral.

Comme les autres membres de la famille des *Flaviviridae*, le VHC réplique son génome en utilisant la matrice anti-sens de l'ARN qui est ainsi de polarité négative. La synthèse du brin négatif de l'ARN commence de l'extrémité 3' du génome viral. A partir de cette matrice plusieurs copies d'ARN de polarité positive sont synthétisées avec un excès molaire de 5 à 10 fois par

rapport au brin parental. Ces copies d'ARN sont utilisées pour la traduction, la réplication ainsi que pour l'encapsidation dans les nouveaux virions.

La traduction est un processus qui surviendrait plus fréquemment que la réplication, puisqu'il a été observé que la quantité de protéines virales est environ 1000 plus importante que celle de l'ARN du VHC, dans des cellules exprimant le réplicon subgénomique (Quinkert et al., 2005).

6.3.1. Passage de la traduction à la réplication

Même si l'étape de la traduction et de la réplication utilisent la même matrice, ces deux processus ont lieu séparément puisque les sens par lesquelles ils commencent et vers lesquelles ils se dirigent sont complètement à l'opposé l'un à l'autre. Lorsque les deux machineries se croisent sur le même brin d'ARN matrice, il y aurait des mécanismes qui permettent d'éviter leur confrontation (Shi and Lai, 2006). Ces mécanismes dépendent de l'ARN matrice, de facteurs viraux et cellulaires. En effet, il a été rapporté que la traduction et la réplication nécessitent des conformations structurelles différentes au niveau des régions 5' et 3' UTR (Romero-López and Berzal-Herranz, 2017). L'interaction entre les deux extrémités du génome viral permet non seulement de réguler le switch entre la traduction et la réplication mais aurait également un rôle dans le contrôle de l'intégrité de l'ARN (Niepmann et al., 2018). La protéine cellulaire PTB (*polypyrimidine-tract-binding protein*) joue un rôle important dans cette interaction entre les extrémités 5' et 3', la circularisation de l'ARN et la régulation de la traduction et de la réplication (Ito and Lai, 1999) (Domitrovich et al., 2005).

La protéine virale core a également été décrite pour être impliquée dans le passage entre la traduction à la réplication en régulant négativement la traduction de manière dépendante de l'IRES et favorise ainsi l'initiation de la réplication de l'ARN (Zhang et al., 2002).

6.3.2. Régulation de la réplication par les facteurs viraux

Toutes les protéines virales non structurales, excepté p7 et NS2, sont requises pour la réplication du génome du VHC. D'ailleurs, l'unité minimale de réplication a été définie comme contenant les protéines non-structurales de NS3 à NS5B (Lohmann et al., 1999) (Lohmann, 2013). Des mutations d'adaptation au niveau du réplicon du VHC permettant d'améliorer l'efficacité de la réplication, ont été détectées dans toutes les protéines structurales (sauf NS2), en particulier dans NS3 et NS5A, suggérant leur contribution dans la réplication de l'ARN (Lohmann et al., 2001) (Krieger et al., 2001). Toutes ces protéines sont impliquées directement ou indirectement au bon déroulement de la réplication (Moradpour et al., 2003). Tandis que l'hélicase de NS3 et la polymérase NS5B sont au cœur de la machinerie de la réplication (Banerjee and Dasgupta, 2001) (Lee et al., 2004), la protéase NS3-4A via son rôle dans la maturation des protéines virales est indispensable pour l'initiation de la réplication (Yao et al., 1999), de même pour la NS4B à travers son rôle dans la mise en place des *membranous web* et

la NS5A par son activité interactionnelle avec de nombreux facteurs cellulaires nécessaires pour la réplication (Egger et al., 2002)(Macdonald and Harris, 2004). (Voir section protéines virales)

6.3.3. Régulation de la réplication par les facteurs cellulaires

La réplication du génome du VHC est un mécanisme si complexe qu'il n'est pas surprenant que cette étape du cycle viral implique plusieurs facteurs cellulaires. A travers des cribles par interférence à l'ARN et des approches interactomiques par spectrométrie de masse, un grand répertoire de facteurs cellulaires impliqués dans la réplication du VHC a été identifié (Randall et al., 2007). Ces cofacteurs de réplication appartiennent à divers processus cellulaires, que le virus utilise à son profit au cours de cette étape importante du cycle viral.

Ces facteurs cellulaires interviennent dans la régulation de la réplication, soit directement au niveau de l'ARN viral ou indirectement en interagissant avec des protéines virales. Par exemple, les protéines PTB (*Polypyrimidine Tract-Binding protein*) et La (*La autoautigen*) ont été décrites pour interagir avec l'ARN au niveau de séquences riches en pyrimidines dans les régions 3' et 5' UTR et induire la circularisation de l'ARN ce qui par conséquent augmente l'efficacité de la réplication (Domitrovich et al., 2005)(Tsuchihara et al., 1997). Il a aussi été montré que l'interaction de la ribonucléoprotéine La protège l'ARN viral d'une dégradation rapide (Spångberg et al., 2001).

Il fut surprenant de trouver qu'un des facteurs cellulaires impliqué dans la réplication soit un microARN, le miR-122. Contrairement à ce qui est communément connu de la régulation négative exercée par les miRNA, dans le cas du VHC, le miR-122 semble être un régulateur positif. Deux sites ont été identifiés au niveau du 5'UTR sur lesquels miR-122 se lie à l'ARN du VHC (Jopling et al., 2005). Par conséquent, le miR-122 est non seulement important pour la réplication du génome du VHC mais permet également de stimuler la traduction médiée par l'IRES, et de protéger l'ARN viral de la dégradation(Niepmann, 2013). Le miR-122 est un miRNA spécifique du foie, il participe au tropisme cellulaire du VHC. L'expression de miR-122 exogène dans des cellules non-hépatiques permettrait au VHC de répliquer (Chang et al., 2008).

D'autres protéines cellulaires ont été identifiées comme étant impliquées dans la réplication du VHC à travers leur association à des protéines virales. C'est le cas de la cyclophiline A (CyPA) qui a été décrite comme étant nécessaire à la réplication du VHC (Nakagawa et al., 2005)(Yang et al., 2008). L'inhibition de manière transitoire ou stable de l'expression de la CyPA mais aussi des autres protéines de la même famille (Cyclophiline B, C et D) conduit à une diminution drastique de la réplication du VHC (Nakagawa et al., 2005). Grâce à son activité PPIase (*prolyl-peptidyl isomerase*), cette protéine est recrutée au niveau des complexes de réplication en s'associant à NS5B. Son inhibition par la cyclosporine provoquerait l'exclusion de la polymérase

des complexes de réplication (Liu et al., 2009). Cette protéine est également montrée pour interagir avec la NS5A (Fernandes et al., 2010).

La réplication du VHC est étroitement liée au métabolisme lipidique (Paul et al., 2014). En effet, la perturbation du métabolisme lipidique et du cholestérol par différents inhibiteurs entraîne une déstabilisation et désorganisation des complexes de réplication en altérant les *membranous web* (Sagan et al., 2006). Alternativement, il a été montré que la modulation du métabolisme lipidique pouvait influencer indirectement les complexes de réplication en altérant la localisation des protéines cellulaires à travers leur capacité à s'associer aux lipides (Wang and Tai, 2016)(Sagan et al., 2006).

En effet, le VHC induit *de novo* la biosynthèse des lipides et des membranes via la voie de signalisation de SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*), modulant, par conséquent, le profil lipidomique des cellules infectées (Waris et al., 2007)(Diamond et al., 2010). Le clivage protéolytique de SREBP dans les cellules entraîne l'augmentation des taux des transcrits lipogéniques tels que les enzymes FAS (*fatty acid synthase*) et HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A)(Waris et al., 2007). D'ailleurs, la protéine FAS interagit avec la protéine NS5B et stimule l'activité de la polymérase virale (Huang et al., 2013).

La composition locale en lipides au niveau des sites de réplication est un facteur déterminant pour le bon déroulement de la réplication (Paul et al., 2014). La forte dépendance du VHC à la kinase lipidique PI4KIII α et à son produit le PI4P (*Phosphatidylinositol-4-phosphate*) en est la preuve (Delang et al., 2012)(Bianco et al., 2012). Dans les cellules non-infectées, le PI4P est majoritairement retrouvé dans les membranes de l'appareil de Golgi et au niveau de la membrane plasmique. Cependant, au cours d'une infection par le VHC, probablement via des interactions avec NS5A et NS5B, la localisation subcellulaire de la PI4KIII α est altérée ainsi que celle du PI4P, qui est redistribué localement au niveau des complexes de réplication (Reiss et al., 2011). Ceci est indispensable pour la formation des *membranous web*. De plus, l'inhibition de PI4KIII α ou de son interaction avec NS5A altère la morphologie structurale des *membranous web* et affecte sévèrement la réplication du VHC (Reiss et al., 2011)(Reiss et al., 2013). Un autre facteur lié au PIP4 et important pour la biogénèse des sites de réplication est la protéine OSBP (*oxysterol-binding protein*) qui est impliquée dans le transport du cholestérol vers les membranes remaniées par le virus comportant le PI4P (Wang et al., 2014a). Il a été montré que la protéine OSBP interagit avec la protéine VAP-A (*vesicle-associated membrane protein-associated protein A*) (Mesmin et al., 2013), qui a été décrite pour être requise pour la réplication (Gao et al., 2004). VAP-A est une protéine membranaire connue pour son rôle dans le trafic membranaire. VAP-A a été montrée pour interagir avec la protéine NS5A phosphorylée et avec la NS5B et permet notamment leur recrutement au niveau des radeaux lipidiques pour la formation des complexes de réplication (Gao et al., 2004).

La réplication du VHC est fortement associée au trafic vésiculaire et membranaire dans la cellule. Lorsque celui est inhibé par la bréfeldine A (BFA) (décrite ultérieurement), la réplication est drastiquement affectée. Cette observation a conduit à l'identification du facteur cellulaire requis pour la réplication qui est une cible directe de la BFA (Goueslain et al., 2010)(Farhat et al., 2013). Il s'agit du facteur d'échange nucléotidique GBF1 dont la fonction physiologique principale est la régulation du transport membranaire (détaillée ultérieurement) à travers l'activation des petites protéines G de la famille des Arf (*ADP-ribosylation factor*). Certaines de ces protéines notamment Arf1 et la paire d'Arf 4/5 ont également été décrites comme étant impliquées dans la réplication du VHC (Matto et al., 2011)(Zhang et al., 2012)(Farhat et al., 2016).

La protéine ArfGAP1 (*Arf GTPase-activating protein 1*) permettant de réguler l'activité des Arf en favorisant l'hydrolyse du GTP lié à Arf, est également nécessaire à la réplication du VHC. Elle aiderait à maintenir un environnement riche en PI4P (Li et al., 2014).

6.3.4. Structure et organisation du *membranous web*

Avant l'identification du VHC, des altérations membranaires ont été observées par microscope électronique dans des hépatocytes de chimpanzés infectés par le virus de l'hépatite non-A non-B (Jackson et al., 1979)(Shimizu et al., 1979). Plus tard, Egger et ses collaborateurs ont pu montrer que l'expression de la polyprotéine du VHC entière était associée à des altérations membranaires décrites comme un réseau de structures multi-vésiculaires qui ont été, par la suite, nommées « *membranous web* » (MW) (Egger et al., 2002). Ces travaux ont également montré que l'expression de NS4B seule dans la cellule pouvait induire des remaniements membranaires similaires à ceux observés avec la polyprotéine entière. De manière similaire, ces structures ont été observées dans des cellules comportant le réplicon (Gosert et al., 2003) et dans des cellules infectées par le VHCcc (Rouillé et al., 2006).

Des études ultérieures réalisées sur des cellules contenant le réplicon subgénomique du VHC ou le virus entier (souche Jc1), ont permis de montrer que ces MW consistent en des vésicules à double membrane (DMV) en grande partie avec un diamètre d'environ 200 nm mais aussi des vésicules à simple membrane (SMV) et des vésicules multi-membranaires (MMV) (Ferraris et al., 2010)(Meyers et al., 2016). L'analyse tomographique suggère que les membranous web dérivent principalement des membranes du RE (Romero-Brey et al., 2012). Certaines DMV ont été identifiées comme étant des protrusions allant des membranes du RE vers le cytosol (Romero-Brey et al., 2012) (Figure 20).

Ces MW ont comme fonction principale d'être des sites de réplication du VHC (Wang and Tai, 2016). Toutes les protéines non-structurales ainsi que l'ARN viral ont été détectés au niveau de ces sites (Moradpour et al., 2003). Il a également été montré que l'association des complexes de réplication aux MW a pour fonction de protéger l'ARN viral de la réponse immunitaire innée (Wang and Tai, 2016). Récemment, il a été montré que RIG-I et MDA5 (*Melanoma*

Differentiation-Associated protein 5) sont exclus des MW et que l'insertion d'un site de localisation nucléaire à ces deux senseurs immunitaires leur permettait d'accéder aux sites de réplication (Neufeldt et al., 2016).

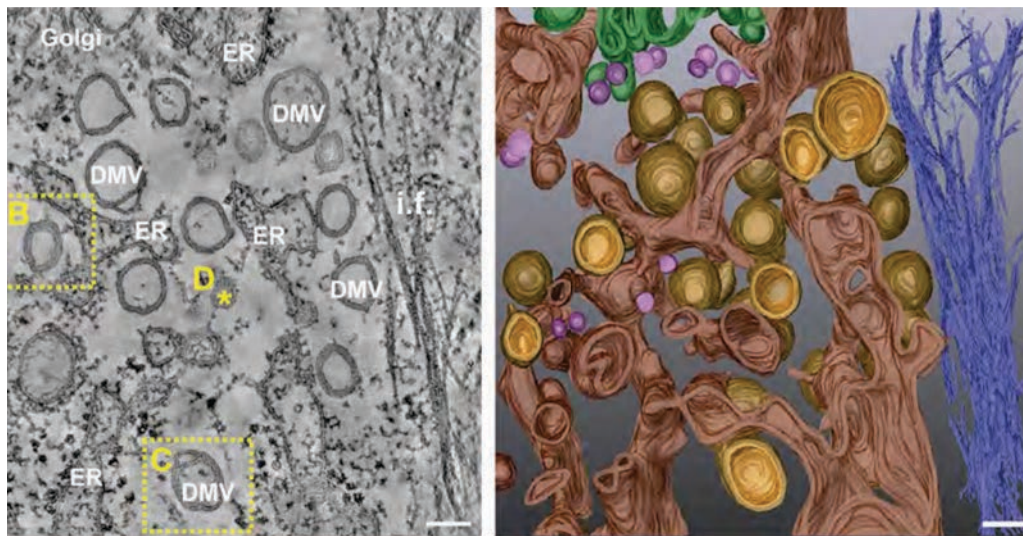


Figure 19 : Structure en 3D des réarrangements membranaires induits par la réplication du VHC 16h post-infection.

Les cellules Huh-7.5 ont été infectées par la souche Jc1 puis fixées 16 hpi. Les images de microscopie électronique et la reconstitution en 3D de ces images montre la présence de nombreuses vésicules à double membrane **DMV**. Le RE est en marron foncé, la membrane interne des DMV en jaune foncé, et leur membrane externe en marron clair. Les vésicules à simple membrane SMV sont en rose. Les filaments intermédiaires et l'appareil de Golgi sont respectivement colorés en bleu foncé et vert.

6.4. Assemblage et sécrétion

La morphogénèse du VHC requiert l'accumulation des protéines structurales et du génome viral, un processus qui est temporellement et partiellement organisé pour que cet ARN soit encapsidé dans des particules virales. Une caractéristique particulière de l'assemblage du VHC et des autres membres de la famille des *Flaviviridae* est l'implication des protéines non-structurales composant la réplisome dans ce processus (Dubuisson and Cosset, 2014). Une autre particularité importante de la morphogénèse du VHC est son lien étroit qui existe avec le métabolisme lipidique (André et al., 2005).

Un composant important dans la particule virale est la protéine core, qui interagit avec l'ARN viral pour former la capsid. L'interaction de core avec les gouttelettes lipidiques (LD) est essentielle pour le recrutement des autres protéines virales impliquées dans l'étape d'assemblage (Miyanari et al., 2007). Il a été rapporté que l'accumulation de la protéine core autour des LD conduisait progressivement à un grand changement dans la distribution des LD intracellulaires qui viendraient s'accumuler au niveau de la région périnucléaire lors d'une infection par le VHC (Boulant et al., 2008). La perturbation de cette interaction entre core et les LD inhiberait l'assemblage du virus (Boulant et al., 2007)(Miyanari et al., 2007).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 constituent elles aussi un élément important de la particule virale. Ces protéines doivent migrer à proximité des LD où a lieu l'assemblage (Miyanari et al., 2007). Il a été montré que NS2 interagit avec l'hétérodimère E1E2 et avec p7 et que ces interactions sont essentielles pour la migration de E1E2 au niveau du site de l'assemblage (Stapleford and Lindenbach, 2011)(Ma et al., 2011)(Jirasko et al., 2010)(Popescu and Dubuisson, 2010). La protéine p7 serait également nécessaire dans les étapes finales de l'assemblage de la capsid et pour son enveloppement (Gentzsch et al., 2013).

Comme évoqué précédemment, les protéines non-structurales participent également au processus d'assemblage. Parmi elles, NS5A qui émerge comme un acteur central dans la transition entre la réplication et l'assemblage. En effet, même si le domaine C-terminal de la protéine est dispensable pour l'étape de réplication, il s'avère très important pour l'assemblage du VHC (Appel et al., 2008). Ce domaine est essentiel pour que NS5A interagisse avec la protéine core associée aux LD, qui est une étape clé dans l'assemblage (Masaki et al., 2008).

La protéine NS3/4A a été également décrite comme étant impliquée dans l'assemblage du VHC. En effet, des mutations au niveau du domaine hélicase de la protéine ou du domaine C-terminal de NS4A affectent considérablement l'assemblage des particules virales (Jones et al., 2011)(Pietschmann et al., 2009). NS4B et NS5B seraient aussi impliquées dans ce processus (Jones et al., 2009)(Gouklani et al., 2012).

La biogénèse des particules du VHC est étroitement liée à la voie de sécrétion des VLDL (Gastaminza et al., 2008). En effet, la composition lipidique des particules virales est très similaire à celles des VLDL et des LDL (Merz et al., 2011). La production des particules virales est régulée par des facteurs cellulaires impliqués dans la biogénèse des VLDL (Gastaminza et al., 2008). C'est le cas de la protéine MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) dont l'inhibition entraîne le blocage de la production des particules virales (Huang et al., 2007a). De plus, différentes apolipoprotéines ont été retrouvées en association avec les particules virales (Catanese et al., 2013).

Après assemblage et bourgeonnement dans le RE, les particules du VHC sont acheminées pour être relarguées des cellules (Coller et al., 2012). Durant ce processus les virions du VHC acquièrent leur caractéristique de faible densité (Gastaminza et al., 2006). D'autre part, les glycanes associées aux glycoprotéines d'enveloppe subissent des modifications au moment de la sécrétion (Vieyres et al., 2010).

Enfin, durant la sécrétion, il a été suggéré que les particules du VHC dépendent de la protéine virale p7 pour neutraliser l'acidité du compartiment au niveau de la voie de sécrétion (Wozniak et al., 2010).

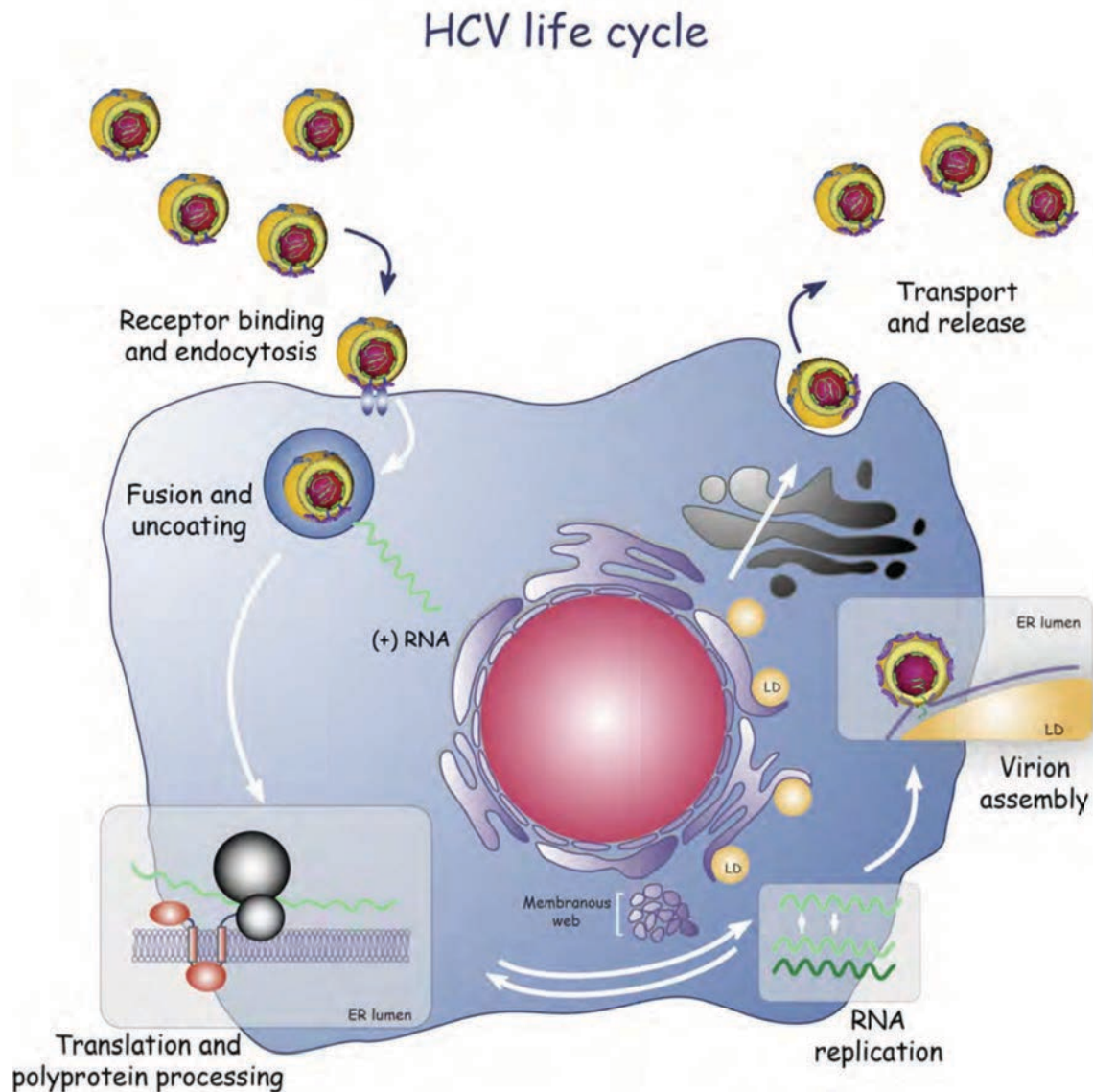


Figure 20 : Les étapes du cycle viral du VHC.

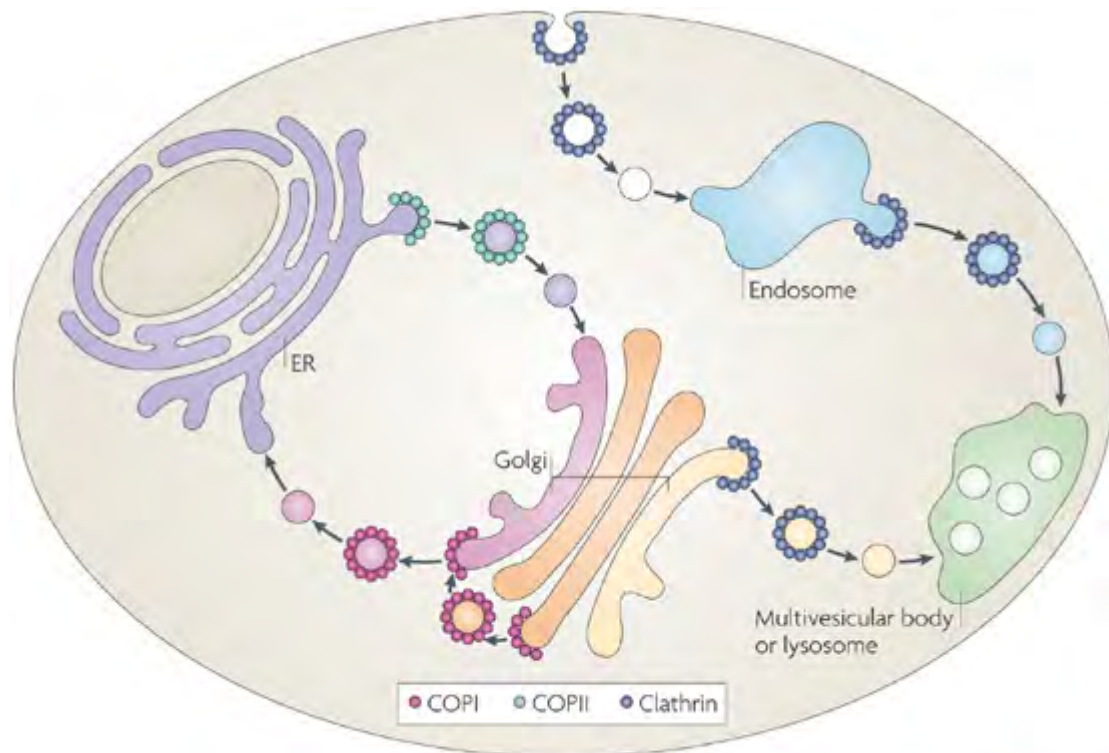
Les virions du VHC se lient aux facteurs d'attachement et d'entrée à la surface de l'hépatocyte suivant un processus séquentiel. La particule virale est aussitôt internalisée par les voies d'endocytose cellulaire dépendantes de la clathrine. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane des endosomes qui permet à l'ARN viral d'être libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée. Ce dernier est d'une part traduit afin de générer la polyprotéine du VHC, et d'autre part servira comme matrice de réplication afin de générer l'ARN des nouveaux virions. Il est à noter l'existence d'une étape d'ARN intermédiaire à brin négatif. Les protéines structurales résultant de la maturation de la polyprotéine du VHC sont nécessaires aux étapes d'assemblage et d'encapsidation. Ces dernières sont étroitement liées aux gouttelettes lipidiques. Les virions seront ensuite sécrétés par la cellule en suivant la voie des VLDL.

III. DYNAMIQUE MEMBRANAIRE ET RÉPLICATION VIRALE

1. La régulation du trafic vésiculaire dans la cellule

Le cytoplasme des cellules eucaryotes est organisé en un ensemble de différentes organelles bordées par des membranes. Ces cellules sont elles-mêmes délimitées par une membrane formée d'une bicouche lipidique hydrophobe séparant la cellule de son milieu extérieur. Outre leur rôle structural, les membranes ont également pour rôle fonctionnel de permettre un échange de différentes molécules, tel les lipides et les protéines de manière régulée et pour la plupart sélective, entre l'intérieur et l'extérieur ou entre deux compartiments. Ainsi, la communication entre les différents compartiments est médiée par des événements de trafic qui sont assez souvent effectués par des vésicules. De manière générale, ces vésicules bourgeonnent à partir d'une membrane d'un compartiment "initial" ou "donneur" et fusionnent avec celle du compartiment "final" ou "accepteur".

Les types des vésicules majoritaires impliquées dans cette signalisation sont les vésicules COP-I, COP-II (*Coat protein-I/II*) et les vésicules à clathrine (Kirchhausen, 2000) (figure 21). Le trafic vésiculaire dans la cellule est régulé par différentes familles de protéines ; par exemple la formation des vésicules COP I est régulée par la protéine Arf1 (*ADP ribosylation factor 1*). Elles permettent le transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (Spang, 2002). Le bourgeonnement de ces vésicules s'effectue à partir de la membrane du compartiment donneur (ici le cis-Golgi et le ERGIC pour les vésicules COP I) en recrutant les protéines heptamériques de manteau. Ceci génère une courbure de la membrane et la présence des protéines recrutées à cet endroit permet de générer la vésicule de transport. La vésicule est transportée le long des microtubules et fusionne avec la membrane du compartiment accepteur pour délivrer son contenu (Aguilera-Romero et al., 2008).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 21 : Les voies de transport vésiculaire et les protéines de manteau.

Les protéines COP-II (en vert) forment des vésicules pour le transport antérograde du RE vers l'appareil de Golgi. Les protéines COP-I (en rouge) forment des vésicules pour le transport intra-Golgi et pour le transport rétrograde du Golgi vers le RE. Les vésicules de clathrine (en bleu) forment des complexes avec les protéines AP1 et AP3 pour le transport du trans-Golgi vers les endosomes tardifs ainsi qu'à partir des endosomes précoces vers les endosomes tardifs. (Hsu and Yang, 2009)

La formation des vésicules dépend du métabolisme lipidique qui permet la synthèse des différents phospholipides qui constituent ces membranes (Asp et al., 2009). Une autre famille de protéines est importante pour le transport vésiculaire : La famille des AP (*clathrin adaptor protein*) composée de 5 protéines (AP-1, 2, 3, 4 et 5) dans les cellules humaines. Elles permettent essentiellement le transport entre le "*trans-Golgi network, TGN*" ou la membrane plasmique et les endosomes (Hirst et al., 2011). La famille des protéines SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) participe également aux événements de transport en association avec les protéines de manteau. D'une manière générale, les protéines de manteau, que ce soit COP-I, COP-II et la clathrine, agissent de manière séquentielle pendant le transport. Elles se détachent de la vésicule et sont recyclées pour permettre la fusion de la vésicule avec la membrane du compartiment accepteur (figure 22) (Kirchhausen, 2000).

Les différentes voies de transport cellulaire, notamment le transport vésiculaire, la génération de membranes ainsi que les remaniements membranaires ont longtemps été associés aux différents pathogènes intracellulaires. Nous allons décrire davantage la régulation des

remaniements membranaires liés à la réplication des virus à ARN simple brin de polarité positive auxquels appartient le HCV.

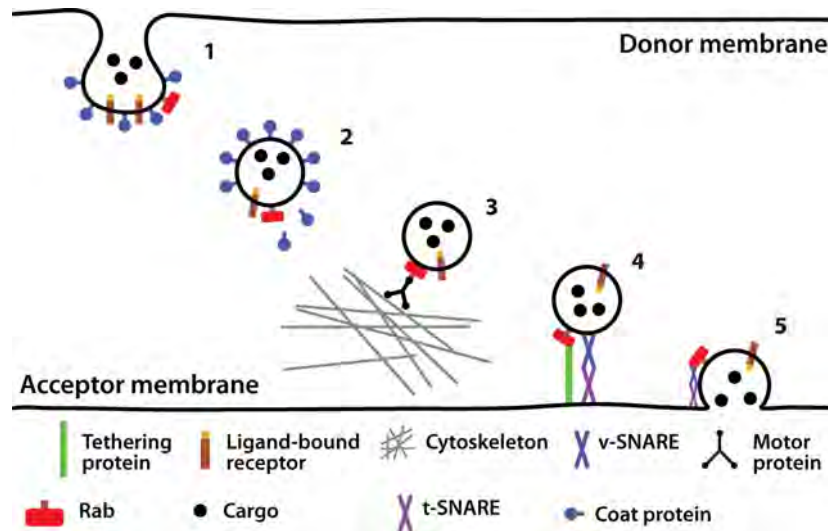


Figure 22 : Formation des vésicules, transport et fusion.

Les principaux événements du transport vésiculaire sont décrits dans cette figure. La "cargaison" est enveloppée dans des vésicules formées de protéines COP-I ou COP-II. La GTPase Rab est aussi associée et liée à la vésicule pour faciliter le transport. Le cytosquelette permet le transport des vésicules vers la destination finale où les protéines de manteau sont dissociées. Les protéines SNARE participent à l'attachement de la vésicule avec les membranes "accepteurs" facilitant la fusion des membranes et le relâchement de la "cargaison" (Watson, 2015)

2. Le rôle de la superfamille Ras dans la régulation du trafic vésiculaire

La régulation des événements de transport cellulaire fait intervenir différentes familles de protéines cellulaires qui activent différentes cascades de signalisation. Les petites protéines G de la superfamille Ras ont été conservées au cours de l'évolution et par conséquent sont les mieux caractérisées, puisqu'elles ont été décrites pour être fortement associées aux pathologies humaines grâce à leur rôle dans l'oncogenèse (Repasky et al., 2004). Elles ont été divisées en différentes familles selon la similitude de leurs séquences et de leurs fonctions cellulaires. On distingue 5 familles : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf. Elles sont associées aux membranes des différents compartiments intracellulaires ainsi qu'à la membrane plasmique. Elles sont présentes sous 2 formes selon leur état d'activation. À l'état inactif elles sont couplées au GDP. Elles seront actives et capables de recruter leurs effecteurs suite à une libération du GDP et de son remplacement par du GTP. Cette régulation se fait par l'intermédiaire d'une protéine GEF (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*). Une fois son rôle accompli, le recyclage de la protéine G est indispensable pour maintenir l'homéostasie. La réaction se fait en présence d'une protéine GAP (*GTPase Activating Protein*) qui stimule l'hydrolyse du GTP en GDP. Ceci permet par

conséquent à la protéine G de revenir à son état initial couplée au GDP (Wennerberg et al., 2005).

2.1. Les protéines G de la famille Arf

Parmi les différentes familles de la superfamille Ras, la famille des protéines Arf a été longtemps étudiée parce qu'elle joue un rôle clé dans la régulation du transport vésiculaire dans la cellule. Les protéines Arf ont la particularité d'être myristoylées à leur extrémité N-terminale. Ce groupement facilite leur liaison à une membrane de manière réversible. Cette famille est divisée en 3 classes selon leur homologie de séquences. Les Arf de la classe I sont Arf1, Arf2 (non-exprimée dans les cellules humaines) et Arf3 ; les Arf de la classe II sont Arf 4 et Arf5 ; la classe III contient que Arf6. Il s'ajoute aux Arf, 2 protéines Sar et 14 protéines Arl (*Arf like-protein*). Parmi toutes ces protéines, Arf-1 est la mieux étudiée. Un schéma décrivant la régulation des Arf ainsi que leur classification est décrit dans la (figure 23) (Jackson and Bouvet, 2014). Les effecteurs recrutés par Arf-GTP sont nombreux et ont des rôles différents dans la cellule. On distingue les protéines de manteau, des enzymes de modification des lipides, des chaperonnes et des régulateurs d'autres protéines G. Il est à noter qu'une redondance d'action a été observée au niveau des protéines Arf de classe I (Volpicelli-Daley et al., 2005). Des études récentes de notre laboratoire montrent que cette redondance d'action a été observée pour les protéines de classe II suite à leur implication dans la réplication du HCV (Farhat et al., 2016). Parmi les enzymes de modification des lipides régulées par les Arf, on trouve la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4KIII β). Il a été montré que la PI4KIII β est nécessaire pour la réplication de HCV et que cette dernière colocalise avec GBF1 et Arf1 (Zhang et al., 2012). Cependant, la PI4KIII α est la kinase indispensable et la mieux étudiée pour la réplication de HCV (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Elle permet la production du PI4P, nécessaire à la fabrication des complexes de réplication de l'ARN HCV (Berger et al., 2009).

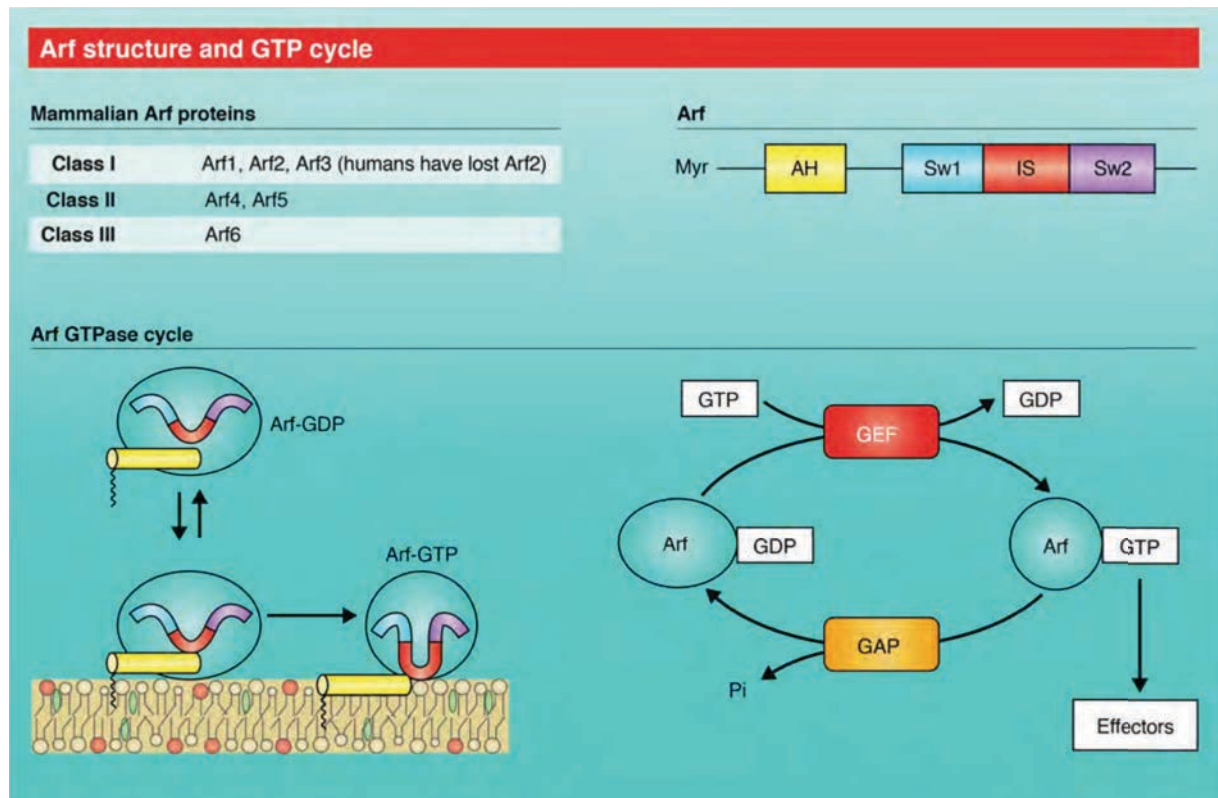


Figure 23 : Les protéines de la famille Arf.

La classification des protéines Arf en différentes classes selon l'homologie de séquences. Les différents domaines de la protéine Arf sont représentés dans le panneau à droite. La régulation des Arf se fait par les protéines Arf-GEF et Arf-GAP. Les Arf-GEF facilitent l'incorporation du GTP dans la protéine Arf afin que cette dernière soit capable de recruter les effecteurs. Les protéines Arf-GAP hydrolysent le GTP en GDP qui permet à la protéine Arf-GDP de revenir à l'état basal inactif. (Jackson and Bouvet, 2014)

2.2. Le rôle des GEF dans l'échange nucléotidique

Les facteurs d'échange nucléotidique GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*) appartiennent à une famille de protéines conservées depuis la levure "*Saccharomyces cerevisiae*". Elles possèdent un domaine catalytique d'environ 200 résidus appelé domaine *sec7*. Ce domaine *sec7* permet la régulation des protéines G par échange du GDP en GTP (Mansour et al., 1998). Les ArfGEF sont les GEF régulant les protéines G de la famille Arf.

Dans les cellules de mammifères, on distingue 15 ArfGEF qui sont divisées en 2 groupes selon leur taille. Les ArfGEF de petite taille (<100 kDa) dont ARNO qui est la plus étudiée, sont localisées au niveau des endosomes et régulent les protéines Arf 1 et 6 au niveau de ces membranes (figure 24). Il a été montré que ARNO se lie aux membranes des endosomes riches en Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate grâce à son domaine PH (*pleckstrin homology*) (Jackson and Casanova, 2000) (Anders and Jürgens, 2008). Le second groupe réunit trois ArfGEF

de grande taille (>100 kDa) BIG1, BIG2 et GBF1. Les GEF sont spécifiques des compartiments intracellulaires et sont le plus souvent associées à des membranes probablement grâce à des interactions avec des lipides spécifiques ou avec certaines des protéines membranaires (Jackson and Casanova, 2000). BIG1, BIG2 et GBF1 régulent les protéines Arf de classe I et II. Comme mentionné précédemment, le domaine catalytique *sec7*, largement conservé au niveau des ArfGEF possède une région hydrophobe qui attire la liaison des domaines switch I et II des protéines Arf et par conséquent facilite la libération du GDP et favorise la liaison du GTP (Figure 25) (Pasqualato et al., 2002). La libération du GDP se fait par une répulsion de charge effectuée par un résidu glutamate conservé à cette position (Renault et al., 2003). La mutation de ce résidu glutamate inhibe fortement l'activité des GEF et les rend incapables de catalyser le transfert du GTP (Niu et al., 2005).

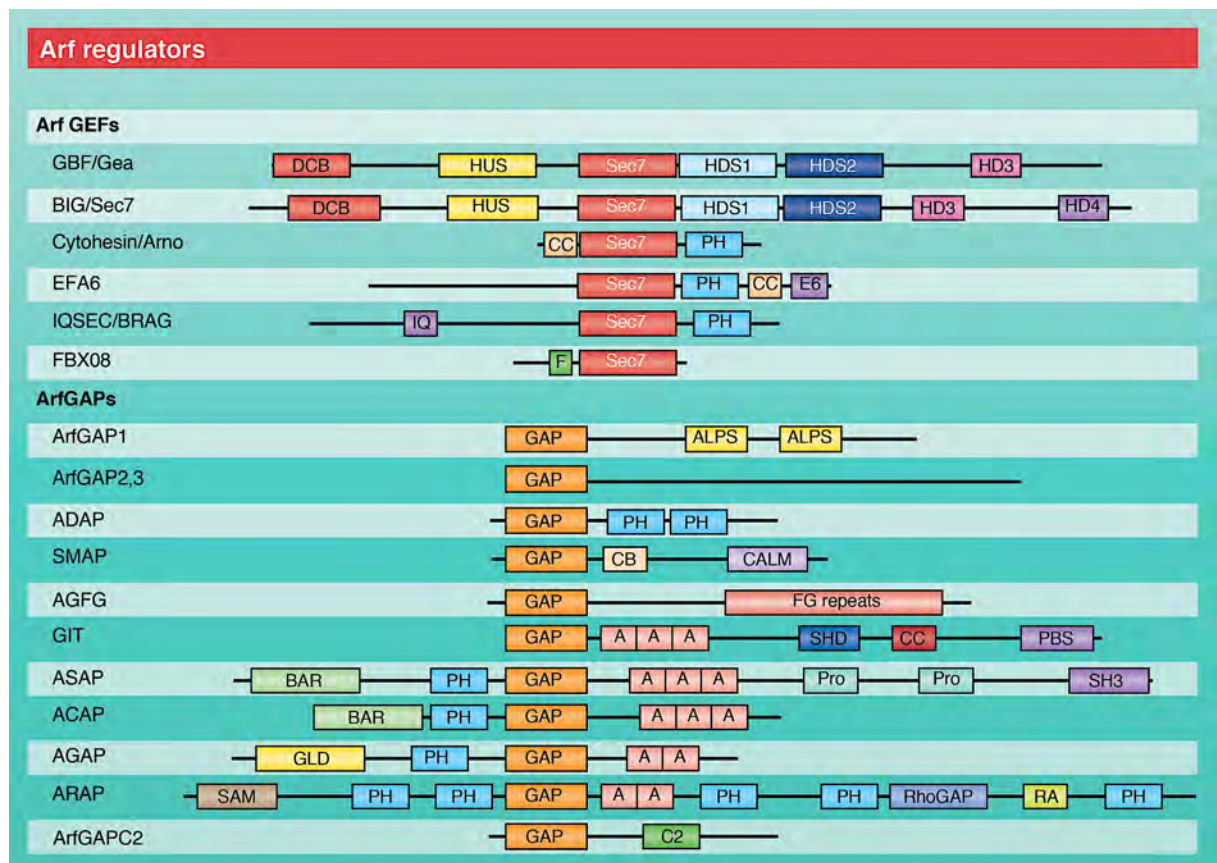


Figure 24 : Les différentes GEF ou GAP régulant les Arf. Le domaine *sec7* est commun à toutes les GEF tandis que les GAP possèdent un domaine GAP.

(Jackson and Bouvet, 2014)

GBF1, GEF activant les Arf de classe I et II, est exprimé majoritairement au niveau des membranes du cis-Golgi et de l'ERGIC (*ER Golgi intermediate compartment*). On observe une répartition vésiculaire cytosolique. Il a été montré *in vitro* que GBF1 avait une affinité plus élevée pour Arf5 (Claude et al., 1999)(Kawamoto et al., 2002). GBF1 est un régulateur clé de la voie de

sécrétion rétrograde de la cellule. L'expression du mutant GBF1-E794K (catalytiquement inactif), la déplétion de GBF1 par siRNA ou encore son blocage par des inhibiteurs chimiques entraîne le blocage de la voie de sécrétion et la dissociation du cis-Golgi (Manolea et al., 2008). Quant à la mutation GBF1-M832L elle confère un phénotype de résistance à la bréfeldine A (BFA) et au golgicide A (GCA), qui sont deux inhibiteurs de GBF1 (Niu et al., 2005). La mutation d'un autre résidu GBF1-A795E confère aussi un phénotype de résistance à la BFA (Belov et al., 2008)(Teterina et al., 2011).

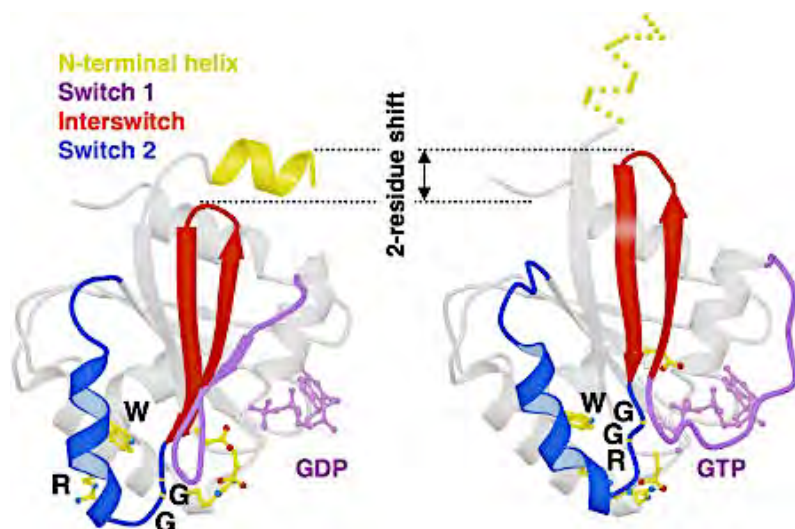


Figure 25 : Changement morphologique de la protéine Arf suite à son activation.

« L'interswitch » passe d'une forme rétractée à une forme plus libre facilitant l'exposition de l'hélice N-terminale. Ces changements morphologiques rendent la protéine Arf capable de se lier aux effecteurs et les recruter.

2.3. Le rôle des GAP dans la régulation des Arf

Une fois que les protéines Arf ont activé leurs effecteurs correspondants, le recyclage de cette dernière pour revenir à son état inactif se fait par des protéines appelées ArfGAP. L'hydrolyse du phosphate est catalysée par un domaine de 140 résidus situé dans la partie N-terminale de l'ArfGAP (Kahn et al., 2008). On distingue 11 familles de protéines ArfGAP dont 10 sont présentes dans les cellules humaines (Jackson and Bouvet, 2014). Elles possèdent généralement un domaine PH ayant les mêmes caractéristiques biochimiques que celui des GEF (Figure 24). Elles sont caractérisées également par un motif en doigt de zinc, hautement conservé, parmi les différentes classes (Mandiyan et al., 1999). Ce dernier a un rôle essentiel dans le maintien de la structure de la protéine et ce domaine "arginin finger" constitue le domaine catalytique. ArfGAP1 possède 2 domaines amphipatiques ALPS (*Amphipathic Lipid Packing Sensor*). Comme décrit précédemment, Arf1-GTP recrute COP-I qui induit une courbure de la membrane pour former une vésicule. Quand le seuil de courbure est atteint, ArfGAP1 est recrutée à ce niveau-là, pour hydrolyser le GTP, ce qui induit la libération des protéines du manteau par ces vésicules (Jackson and Bouvet, 2014).

2.4. Inhibiteurs des voies de signalisation des Arf

La découverte et la caractérisation des différentes voies de signalisations cellulaires a impliqué l'utilisation au fil de l'histoire des inhibiteurs pharmacologiques. On va détailler les principaux inhibiteurs de la voie GBF1-Arf1- COP-I.

2.4.1. La bréfeldine A (BFA)

La BFA a été initialement décrite comme étant une molécule ayant une activité antivirale (Tamura et al., 1968). Depuis presque 30 ans, elle est essentiellement connue et utilisée pour inhiber la voie de sécrétion de la cellule. C'est une lactone naturellement produite par le champignon "*Eupenicillium brefeldianum*" (Misumi et al., 1986)(Klausner et al., 1992). Des études ultérieures ont montré que la BFA bloque plusieurs voies de transport cellulaires, notamment les voies de transport entre les endosomes et les lysosomes. L'action de la BFA est réversible (Lippincott-Schwartz et al., 1991). L'effet de la BFA sur la cellule est presque immédiat. Il se traduit par une redistribution des protéines des compartiments sensibles à la BFA. Ceci induit une dissociation de ces compartiments et un changement de leur morphologie. L'appareil de Golgi montre un aspect en vésicules éparpillées dans le cytoplasme environ 5 min après le traitement par la BFA (Klausner et al., 1992). De longues expositions à la BFA entraîne la redistribution des protéines golgiennes dans le RE. Les facteurs cellulaires sensibles à l'inhibition par la BFA sont les ArfGEF de grande taille. Dans les cellules humaines BIG1, BIG2 et GBF1 sont les seuls ArfGEF sensibles à la BFA. Il est à noter par ailleurs que parmi les Arf exprimées dans les cellules humaines, seule la protéine Arf6 est insensible à l'inhibition par la BFA (Donaldson et al., 1992). Il semble que des résidus dans la séquence protéique de Arf6 limitent l'accès de la BFA (Zeeh et al., 2006). La BFA se lie au complexe formé par la GEF-Arf-GDP. Elle stabilise ce dernier et le rend incapable de lier le GTP et donc de recruter les effecteurs (figure 26). Le blocage de GBF1-Arf1-GDP par la BFA au niveau du cis-Golgi empêche le recrutement de COP-I. La BFA bloque aussi BIG1-Arf-GDP au niveau du trans-Golgi, ce qui empêche le recrutement de protéines AP1, AP3 et AP4. Le blocage de BIG2 à ce même niveau inhibe le recrutement des GGA1, GGA2 et GGA3 (*ADP-ribosylation factor-binding protein 1/ 2/ 3*) nécessaires pour les étapes de transport (Donaldson et al., 1992)(Jackson and Casanova, 2000). Le blocage de toutes ces étapes de transport permet d'expliquer la dissociation du cis-Golgi, trans-Golgi ainsi que les autres

compartiments sensibles à la BFA. Des études ont montré que la surexpression des GEF (GBF1, BIG2) dans des cellules traitées par la BFA complémente l'inhibition par cette dernière et permet à la voie GBF1-Arf1-COP-I de recruter les effecteurs. Ceci se traduit par une résistance de la morphologie du cis et du trans-Golgi (Claude et al., 1999)(Niu et al., 2005)(Shinotsuka et al., 2002). Ces observations ont permis de sélectionner des mutants de résistance à l'inhibition par la BFA dans la séquence du domaine sec7 des GEF. Par conséquent, la zone d'interaction entre des GEF et certains Arf a pu être délimitée. La mutation M832L dans le domaine sec7 de GBF1 inhibe l'interaction avec la BFA (Niu et al., 2005). La BFA est maintenant un outil qui permet d'étudier les voies de transports cellulaires. Un inconvénient de la BFA reste la toxicité induite par cette dernière suite à un long blocage de la sécrétion dans la cellule. Ceci induit un stress du RE et a pour conséquence l'induction de la réponse UPR (*unfolded protein response*) qui pourrait induire l'apoptose dans la cellule (Schröder and Kaufman, 2005).

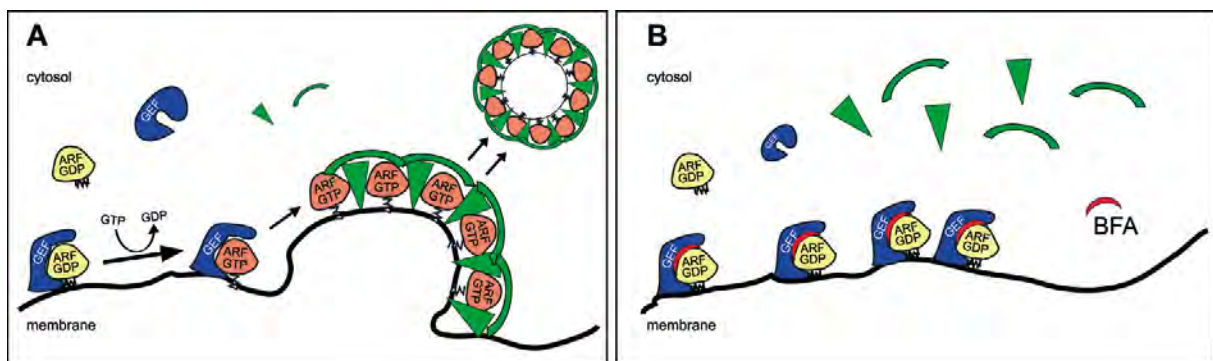


Figure 26 : Schéma illustratif de l'inhibition des protéines Arf par la BFA.

A) en absence de BFA, la protéine GEF facilite l'échange nucléotidique et permet à la protéine Arf d'incorporer le GTP. Cette dernière sera capable de recruter les effecteurs, par exemple les protéines de manteau COP pour former les vésicules. B) en présence de BFA, le complexe Arf-GDP/GEF/BFA est bloqué au niveau des membranes, gardant Arf à l'état GDP incapable de recruter les effecteurs.

2.4.2. Le Golgicide A (GCA)

La BFA inhibe BIG1, BIG2 et GBF1 dans les cellules humaines. La découverte du GCA a permis de mieux disséquer les voies cellulaires. Le GCA est un inhibiteur spécifique de GBF1 en bloquant le complexe GBF1-Arf-GDP et n'a aucun effet sur les complexes formés par BIG1 ni BIG2 (Sáenz et al., 2009). Les études morphologiques réalisées en présence de GCA ont permis de montrer un effet identique au niveau du cis-Golgi mais différent au niveau du trans-Golgi. Ce dernier en présence d'un temps court de traitement BFA montre une morphologie en tubules contrairement à un traitement GCA où les protéines

du TGN sont redistribuées en vésicules dispersées dans le cytoplasme (Sáenz et al., 2009). Le mécanisme d'interaction du GCA avec le complexe GBF1-Arf-GDP est similaire à celui de la BFA. Le GCA est spécifique d'une boucle tripeptidique de GBF1 qui est absente des BIG (Sáenz et al., 2009).

2.4.3. QS11

QS11 a été identifié comme inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine, voie clé dans de nombreux cancers humains. La cible spécifique de QS11 est la protéine ArfGAP1, la GAP décrite comme responsable de l'hydrolyse du phosphate au niveau des protéines Arf-GTP afin de les rendre à l'état inactif Arf-GDP (Zhang et al., 2007) (Singh et al., 2015). QS11 bloque aussi la voie de sécrétion plus tardivement et ceci par l'absence de protéines Arf-GDP qui modifie l'équilibre. QS11 est un outil qui permet d'étudier la voie Arf1-COP-I avec un blocage différent de celui de la BFA.

3. La régulation de GBF1 et ArfGAP1 au niveau des membranes

Une série de facteurs cellulaires participe à la régulation de GBF1 ainsi qu'à sa localisation. Nous allons détailler 2 protéines qui sont essentielles à ce mécanisme. La protéine p115 interagit avec la partie C-terminale de GBF1 et régule son fonctionnement. Ceci a été observé en surexprimant le domaine C-terminal de GBF1, ce qui a inhibé le recrutement de GBF1 aux membranes du cis-Golgi (García-Mata et al., 2003). L'association de GBF1 aux membranes du Golgi est très dynamique et s'effectue d'une manière cyclique. Peu est connu sur le recrutement de GBF1 au niveau des membranes. Il a été montré que Rab1b, protéine G appartenant à la superfamille Ras, serait impliquée dans le recrutement de GBF1 au niveau du cis-Golgi. Rab1b semble interagir avec la région N-terminale de GBF1 pour recruter ce dernier aux membranes du cis-Golgi par un mécanisme inconnu jusqu'à présent (Monetta et al., 2007). Ce recrutement serait indispensable à la régulation des protéines Arf1 afin de recruter les vésicules COP-I ainsi que d'autres effecteurs (Palmer et al., 1993). Une autre hypothèse suggère que GBF1

pourrait interagir directement avec COP-I et ceci indépendamment de la protéine Arf1(Deng et al., 2009). Il semble par ailleurs que la protéine ArfGAP1 ait été trouvée avec Arf1-GTP dans les vésicules COP-I. ArfGAP1 participerait à la courbure de la membrane afin de fabriquer des vésicules (Lee et al., 2005). Cette hypothèse est renforcée par le fait que ArfGAP1 est nécessaire pour le relargage des protéines de manteau par les vésicules (Renault et al., 2003). À l'heure actuelle, il a été établi que GBF1, Arf1 et COP-I sont des protéines clés de la voie de transport rétrograde mais semblent faire intervenir d'autres protéines cellulaires.

4. L'effet de la BFA sur les infections virales

Le cycle viral commence par une étape d'entrée des virions qui une fois internalisés libèrent leur matériel génétique dans la cellule hôte. Les étapes ultérieures du cycle font intervenir ou même détournent plusieurs voies cellulaires. Depuis plusieurs années les voies cellulaires inhibées par la BFA ont été décrites comme essentielles aux étapes post-entrée de plusieurs virus. La BFA inhibe l'infection par le HSV (*herpes simplex virus*) en inhibant la voie de sécrétion nécessaire à la réplication de ce virus (Cheung et al., 1991). La BFA inhibe aussi l'infection par le VSV (*vesicular stomatitis virus*) en inhibant l'étape de glycosylation des protéines et la réplication de l'ARN viral. Ces étapes sont nécessaires pour l'infection par ce virus (Irurzun et al., 1993). En effet, comme pour le VHC, la BFA inhibe la réplication d'autres virus à ARN de polarité positive (Tableau 2). La réplication de ces virus nécessite des remaniements membranaires générés à partir des membranes du RE et régulés par les voies cellulaires sensibles à la BFA. Ces membranes matures forment les complexes de réplication de ces virus. Le mécanisme par lequel GBF1 intervient dans la réplication de ces différents virus semble ne pas être identique. Le mécanisme d'action de GBF1 reste non-élucidé pour la majorité des virus de la liste du Tableau 2.

Le virus de l'hépatite murine (MHV) est un coronavirus à ARN simple brin de polarité positive qui induit des remaniements membranaires. La formation de ses remaniements n'est pas sensible à la BFA. Par contre, la réplication virale est inhibée par la BFA ainsi que par les siRNA GBF1 confirmant ainsi que GBF1 est le facteur cellulaire sensible à la BFA et nécessaire à la réplication virale. Il semble que la forme Arf-GTP est nécessaire à

la réplication du MHV suggérant que l'action de GBF1 consiste à réguler les protéines Arf (Verheije et al., 2008).

La réplication de l'entérovirus EV71 (ssARN+), sensible à la BFA, est fortement dépendante de la voie GBF1-Arf1-COP-I. Il a été proposé que l'action combinée des protéines Arf de classe I soit nécessaire à sa réplication (Wang et al., 2014b).

La réplication du poliovirus (PV) est sensible à l'inhibition par la BFA. Les protéines Arf semblent être relocalisées au niveau des complexes de réplication. Il a été montré également que l'expression de la protéine virale 3A était capable de recruter GBF1 au niveau de ces membranes alors que l'expression de la protéine virale 3CD permettait le recrutement de BIG1 et BIG2 (Belov et al. 2008). GBF1 est le seul facteur cellulaire sensible à la BFA et nécessaire à la réplication de PV. La réplication en présence de BFA est restaurée par l'expression du domaine N-terminal de GBF1 (dépourvu du domaine catalytique sec7) (Belov et al. 2010). Vu que la formation des complexes de réplication est indépendante de la BFA, il semble que GBF1 régule la maturation et le fonctionnement de ces complexes. Par ailleurs, vu que le domaine N-terminal (dépourvu de sec7) est capable de sauver l'infection en présence de BFA, un autre mode d'action de GBF1, encore non élucidé) pendant l'infection par le PV est proposé. Les résultats de double-hybride de levure ainsi que les co-immunoprécipitations indiquent que in-vitro GBF1 interagit avec la protéine 3A du PV (Teterina et al. 2011).

Concernant notre virus d'intérêt le HCV, la réplication du HCV est sensible à l'inhibition par la BFA (Tai et al. 2009, Goueslain et al. 2010). GBF1 est le seul facteur cellulaire sensible à la BFA nécessaire à la réplication du HCV (Goueslain et al. 2010). La BFA n'inhibe pas la formation des complexes de réplication de HCV mais semble être nécessaire à leur fonctionnement (Goueslain et al. 2010). L'action de la BFA est réduite par la surexpression de GBF1 ou par l'expression du mutant (M832L) de résistance à la BFA et non pas par l'expression du mutant E794K qui est catalytiquement inactif. La réplication en présence de la BFA n'est pas restaurée par l'expression du domaine N-terminal de GBF1, contrairement à ce qui est observé pour le PV.

Les protéines Arf1 (Matto et al. 2010) (Zhang et al. 2012) et les protéines Arf de classe II (Arf4 et 5) (Farhat et al. 2016) ont été impliquées dans la réplication de HCV. Ces études suggèrent que les protéines Arf régulent les enzymes de modification des lipides ainsi que le maintien d'un environnement riche en PI4P et nécessaire à la réplication de HCV (Zhang et al. 2012) (Farhat et al. 2016). Toutefois le lien direct indiquant que GBF1 régule directement les protéines Arf dans le cadre de l'infection n'a pas été décrit. Pour

cela, nous nous sommes intéressé à une éventuelle interaction de GBF1 avec l'une des protéines virales de HCV comme c'est le cas pour PV. L'hypothèse de ce travail sera détaillée dans la partie suivante.

Tableau 2 : Les virus inhibés par la BFA.

Virus	Famille / Genre	Références
Poliovirus	<i>Picornaviridae</i> /Enterovirus	(Belov et al., 2008)
GFLV (grapevine fanleaf virus)	<i>Secoviridae</i> /Nepovirus	(Ritzenthaler et al., 2002)
MHV (mouse hepatitis virus)	<i>Coronaviridae</i> /Betacoronavirus	(Verheije et al., 2008)
Coxsackievirus B3	<i>Picornaviridae</i> /Enterovirus	(Lanke et al., 2009)
HCV (hepatitis C virus)	<i>Flaviviridae</i> /Hepacivirus	(Goueslain et al., 2010)
EV71 (enterovirus 71)	<i>Picornaviridae</i> /Enterovirus	(Wang et al., 2014b)
Virus de la dengue	<i>Flaviviridae</i> /Flavivirus	(Carpp et al., 2014)
CSFV (classic swine fever virus)	<i>Flaviviridae</i> /Pestivirus	(Liang et al., 2017)
HEV (hepatitis E virus)	<i>Hepeviridae</i> /Orthohepevirus	(Farhat et al., 2018)

Objectifs

Le VHC est un petit virus enveloppé à ARN de polarité positive qui infecte les hépatocytes humains et induit une infection chronique chez un grand nombre de patients infectés. La réplication du VHC a lieu dans le cytoplasme au niveau de structures vésiculaires induites par le virus appelées *membranous web*. Ces *membranous web* comportent de simples ou doubles membranes provenant majoritairement du RE. Toutes les protéines non-structurales ainsi que l'ARN viral ont été détectés au niveau de ces sites. En plus des protéines virales, plusieurs protéines cellulaires sont recrutées aux complexes de réplication et constituent des facteurs importants pour l'étape de réplication.

La réplication du VHC est fortement associée au trafic vésiculaire et membranaire dans la cellule. Lorsque celui est inhibé par la BFA, la réplication est drastiquement affectée. Cette observation a conduit à l'identification du facteur cellulaire requis pour la réplication qui est une cible directe de la BFA (Goueslain et al., 2010) (Farhat et al., 2013). Il s'agit du facteur d'échange nucléotidique GBF1 dont la fonction physiologique principale est la régulation du transport membranaire à travers l'activation des petites protéines G de la famille des Arf. Certaines de ces protéines notamment Arf1 et la paire Arf 4/5 ont également été décrites comme étant impliquées dans la réplication du VHC (Matto et al., 2011) (Zhang et al., 2012) (Farhat et al., 2016).

GBF1 n'est pas un composant des complexes de réplication (Goueslain et al., 2010). Il intervient au début de la réplication du VHC probablement au cours de la mise en place des complexes de réplication. Une fois ceux-ci sont formés, l'importance de GBF1 devient alors mineure. Le mécanisme par lequel GBF1 est impliqué et sa fonction précise au cours de la réplication ne sont encore pas élucidés. Cette question constitue l'objectif principal de cette étude. Afin de mieux comprendre la fonction de GBF1 dans la régulation de l'infection par le VHC, nous avons tenté d'explorer les interactions entre GBF1 et les protéines du VHC.

Pour certains virus, nécessitant également GBF1 durant la réplication, une interaction a été montrée avec une de leurs protéines virales. C'est le cas du virus de la dengue où une interaction entre GBF1 et sa protéine NS5 a été montrée (Carpp et al., 2014). C'est aussi le cas pour deux entérovirus, le poliovirus et le coxsackievirus B3 dont la protéine non-structurale 3A interagit avec GBF1 (Wessels et al., 2006). Il n'était pas encore connu si la fonction de GBF1 dans la réplication du VHC s'effectuait à travers une interaction directe avec une des protéines virales, comme est le cas pour les virus cités, ou si GBF1 accomplissait son rôle bien en amont à travers l'activation d'une cascade sans pour autant interagir avec des protéines virales. Au cours de cette étude nous avons pu répondre à cette question à travers diverses approches. Les premiers résultats de cette étude nous ont également permis d'aborder d'autres questions. Nous avons pu démontrer l'existence d'une interaction entre GBF1 et une des protéines virales non-structurales, NS3. Nous avons également cerné les domaines impliqués dans l'interaction de chacune des protéines et enfin nous avons identifié un résidu ayant une importance fonctionnelle dans cette interaction.

L'identification de cette interaction entre GBF1 et NS3 permettrait de mieux orienter les recherches futures dont l'objectif serait de comprendre la fonction de GBF1 dans la réplication du VHC et son mécanisme d'action.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication qui est actuellement en révision favorable :

Nadjet Lebsir, Lucie Goueslain, Rayan Farhat, Nathalie Callens, Jean Dubuisson, Catherine L. Jackson, Yves Rouillé. (2018) **Functional and physical interaction between the Arf 1 activator GBF1 and hepatitis C virus NS3 protein.** Jvirol.

Résultats

Au cours des 20 dernières années, GBF1 a émergé en tant que facteur cellulaire nécessaire à la réplication de plusieurs virus à ARN de polarité positive dont le VHC. Au cours de l'infection par le VHC, GBF1 est essentiel pour les étapes précoces de la réplication, bien qu'il soit dispensable lorsque celle-ci est établie. Afin de mieux comprendre la fonction de GBF1 dans la régulation de l'infection par le VHC, nous avons tenté d'explorer les interactions entre GBF1 et les protéines du VHC. Dans un premier temps, les protéines du VHC ont été testées pour leur capacité à interagir avec le facteur cellulaire GBF1 grâce à la technique du double hybride en levure. Un résultat positif de l'interaction avec GBF1 a été uniquement montré pour la protéine virale NS3. Afin d'affiner l'investigation, nous avons disséqué les domaines de chacune des deux protéines, NS3 et GBF1, qui seraient impliqués précisément dans cette interaction. L'approche du double hybride en levure a donc révélé que GBF1 interagit via son domaine catalytique Sec7 avec le domaine protéase de NS3. Toutefois, l'interaction avec GBF1 semble légèrement plus importante avec la protéine NS3 complète. Cette interaction a été également confirmée par d'autres approches, notamment par co-immunoprécipitation qui a permis de valider l'interaction dans des cellules humaines, et par l'approche de ligature de proximité ou PLA (*proximity ligation assay*) qui a été réalisée avec le système réplicon. Il est à noter que cette interaction a été observée avec différentes souches virales de HCV : Con1, H77 et JFH1.

Pour évaluer l'impact de NS3 sur la localisation subcellulaire de GBF1, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur des cellules inducibles pour l'expression de la protéine NS3/4A, la protéine NS5A et la polyprotéine entière du VHC. Nous avons constaté que la localisation de GBF1 dans les cellules exprimant NS3-4A était altérée contrairement aux cellules qui expriment NS5A ou la polyprotéine entière où GBF1 est distribué de manière similaire à des cellules contrôles (exprimant la GFP).

Nous avons également analysé la localisation subcellulaire de GBF1 et de NS3 en présence de BFA ou de Golgicide A (GCA). Ces inhibiteurs de GBF1 déstabilisent la structure du Golgi induisant la fusion du Golgi et du RE, et permettent de stabiliser GBF1 au niveau des membranes.

De manière surprenante, les cellules exprimant la NS3/4A avaient un profil de cellules non-traitées à la BFA/GCA avec une distribution de GBF1 au niveau du cytoplasme mais aussi au niveau des structures où GBF1 colocalise avec NS3. Ce qui n'est pas le cas concernant les cellules contrôles (exprimant la GFP seule) ou des cellules NS5A traitées à la BFA/GCA où GBF1 présente une distribution au niveau des membranes Golgi-RE. Les cellules exprimant la polyprotéine possèdent plutôt un profil intermédiaire, où l'on peut retrouver GBF1 au niveau de structures associées à NS3 et sur les compartiments issus de la fusion Golgi-RE.

Le marquage du cis-Golgi ou de protéines associées au Golgi tel que Rab1a/b, permet de montrer que l'expression de la NS3/4A seule induit des changements au niveau de la

morphologie du Golgi. Ces résultats indiquent qu'il existe un lien étroit entre NS3 et GBF1 et que ces deux protéines se retrouveraient dans un compartiment cis-Golgi-ERGIC auquel appartient la protéine Rab1a.

Afin de mieux caractériser l'interaction entre GBF1 et NS3, nous avons généré par mutagenèse aléatoire des mutants de NS3 et avons sélectionné grâce à l'approche du double hybride en levure les mutants de NS3 dont l'interaction avec GBF1 est altérée. A l'issue de ce criblage, 12 mutations individuelles (**V36A, L44Q, N77D, L82P, C97R, L104P, L106S, V107A, I114T, G141D, L143P, I153T**) ont été identifiées affectant l'interaction NS3-GBF1.

L'analyse de la modélisation de la structure tridimensionnelle de NS3 indique que parmi ces résidus mutés, 3 d'entre eux sont exposés à la surface de la protéine (**N77D, C97R et I114T**), donc susceptibles à appartenir à la zone d'interaction avec GBF1. Les autres résidus mutés sont situés dans le cœur hydrophobe de la protéine et l'impact de ces mutations pourrait affecter le repliement de la protéine et ainsi altérer la fonction de la protéine.

Nous avons ensuite vérifié l'effet de ces mutations sur la réplication virale du VHC. Ainsi, ces mutations ont été introduites dans le réplicon de souche Con1 ayant pour gène rapporteur la *Firefly Luciferase*. L'électroporation dans des cellules Huh-7.5 des ARN mutés transcrits *in vitro* permet d'étudier leur capacité de réplication en suivant l'activité luciférase sur une durée de 96h. Les mutations suivantes V36A, L44Q, V107A et I114T n'avaient aucun impact sur la réplication virale alors que les 8 autres affectaient drastiquement la réplication virale de manière similaire au mutant non-répliatif Δ GDD, utilisé ici comme témoin négatif.

Nous avons ensuite testé la sensibilité à la BFA des 4 mutants répliatifs afin de vérifier si leur interaction avec GBF1 était affectée. Cependant, le résultat de cette expérience n'indique pas une différence de sensibilité à la BFA par rapport aux réplicon sauvage (WT). De plus, les résultats de co-immunoprécipitation établie entre GBF1 et les mutants répliatifs de NS3, indiquent que leur interaction est tout aussi intacte que celle de GBF1 et NS3 WT, contrairement à ce qu'il a été observé en double hybride en levure. On peut donc émettre l'hypothèse que le repliement de ces mutants différents entre les systèmes levure et cellules Huh-7, peut-être en raison de la présence de NS4A dans le second cas et de son absence dans les expériences en levure.

L'activité protéase de NS3 est nécessaire à la réplication virale, pour cela nous avons vérifié si les mutations avaient un impact sur l'activité enzymatique de la protéine. D'une manière attendue, les mutants répliatifs (V36A, L44Q, V107A and I114T) présentaient une activité protéase similaire à la NS3 WT. Les mutants L104P, L106S et I153T avaient une activité protéase partiellement réduite. Tandis que l'activité protéase des mutants L82P, C97R, G141D et L143P était complètement abolie. Ce défaut dans l'activité protéase est probablement dû au fait que ces mutations affectent le repliement de la protéine et sa stabilité. Seul le mutant non-répliatif N77D conserve une activité protéase identique au WT.

Nous nous sommes donc intéressés au mutant N77D qui n'est pas répliatif malgré une activité protéase bien conservée. Par ailleurs, nous avons retrouvé le même phénotype avec la mutation équivalente dans la souche JFH1, qui est la souche de référence en culture cellulaire et qui est plus répliatif que la souche Con1. Le résidu asparagine en position 77 dans la souche Con1 est remplacé par une sérine dans la souche JFH1. Ainsi, le mutant S77D introduit dans la souche JFH1 la rend également incapable de répliquer, que ce soit en système réplicon ou en système HCVcc, tout en conservant une bonne activité protéase à l'enzyme.

Nous avons tenté de générer des virus révertants ou pseudo-révertants du mutant S77D pour tester si cette mutation affectait une interaction entre NS3 et une autre protéine virale. Des cellules Huh7.5 électroporées avec l'ARN du virus muté ont été cultivées et passées. Le mutant étant non-répliatif donc non-infectieux, il ne peut se propager et devenir infectieux qu'en intégrant des mutations d'adaptation lui permettant de se répliquer correctement et d'effectuer un cycle infectieux complet.

Cette évolution du virus muté a pu être suivie par des marquages d'immunofluorescence dirigés contre l'épitope A4 de la protéine E1 du virus. Au bout de 25 jours après électroporation, quelques foyers infectieux sont apparus dans la culture, puis se sont propagés. Quand toutes les cellules de la culture ont été positives, l'ARN a été isolé et la séquence des protéines non-structurales déterminée, dans le but d'identifier les mutations d'adaptation. Le résultat du séquençage a révélé deux mutations du virus révertant. Le résidu d'aspartate en position 77 de la protéine NS3 s'est reconverti en asparagine, résidu présent dans la protéine de la souche con1. En plus de cette mutation de reconversion, une seconde mutation a aussi été observée dans la protéine NS3, mais cette fois-ci dans son domaine hélicase, la mutation Q221L. Ces deux mutations ont été retrouvées dans deux essais de culture cellulaire. Aucune autre mutation n'a été trouvée dans les autres protéines non-structurales. La mutation Q221L a déjà été rapportée dans plusieurs études comme étant une mutation stimulatrice de la production virale mais sans impact sur la répliation. L'expérience a été répétée une seconde fois où on a pu obtenir une reconversion du résidu aspartate vers le résidu sérine à la position 77 qui est le résidu présent dans la souche JFH1. Nous n'avons pas retrouvé la mutation Q221L comme était le cas pour l'expérience précédente, ni aucune autre mutation. Ces résultats n'apportent aucune évidence que la mutation S77D aurait un impact sur l'interaction entre NS3 protéase et d'autres protéines non-structurales du VHC.

En parallèle à ces expériences, nous avons souhaité explorer l'interaction entre GBF1 et le mutant S77D, afin de regarder si la mutation avait un impact sur l'interaction GBF1-NS3. D'une manière inattendue, le mutant S77D était capable d'interagir avec GBF1 dans les expériences de CO-IP, de manière similaire à la protéine sauvage. En présence de BFA, la CO-IP pour le NS3 WT

avec GBF1 n'était pas altérée, tandis que celle du mutant S77D était diminuée d'environ 50% indiquant que la mutation S77D altère l'interaction entre GBF1 et NS3.

Les résultats décrits brièvement sont détaillées dans le manuscrit soumis au "Journal of Virology" et qui est en étape de révision. Le manuscrit est inclus en annexe.

Discussion & conclusions

Dans cette étude, nous avons exploré les interactions pouvant exister entre le facteur cellulaire proviral GBF1 et les protéines virales durant l'infection par le VHC.

Les résultats montrent une interaction entre GBF1 et la protéine NS3 et plus précisément entre le domaine catalytique sec7 de GBF1 et le domaine protéase de NS3. Cette interaction a été montrée par plusieurs approches, notamment, par l'approche double hybride en levure, par co-immunoprécipitation et par ligature de proximité (PLA).

L'expression de NS3-4A impacte la localisation subcellulaire de GBF1 en accord avec l'existence d'une interaction entre les 2 protéines. De plus, l'impact de l'expression de NS3-4A s'étend aussi sur la structure et la morphologie du Golgi régulée par GBF1. Ce changement de morphologie du Golgi a été également montré dans une étude précédente et ceci dans des cellules infectées par la souche JFH1 du VHC (Hansen et al., 2017). En effet, GBF1 est localisé au niveau du Golgi (Kawamoto et al., 2002)(Zhao et al., 2002) et joue un rôle important dans le maintien de son intégrité (Manolea et al., 2008). Le changement dans la morphologie du Golgi serait donc une conséquence directe de l'effet du VHC sur la fonction de GBF1 (Hansen et al., 2017). Dans notre étude, GBF1 colocalise avec la protéine NS3-4A dans les cellules inductibles pour l'expression de NS3-4A. Le traitement par la BFA n'affecte pas cette colocalisation et la morphologie du compartiment où sont présents GBF1 et NS3 semble résister à l'effet de la BFA en présence de NS3-4A, suggérant un effet protecteur de NS3-4A sur la morphologie de ce compartiment, qui est probablement en relation avec le Golgi. L'ensemble de ces observations suggèrent l'existence d'une interaction physique et fonctionnelle entre GBF1 et NS3.

GBF1 a été également décrit pour être un facteur cellulaire essentiel au cours de l'infection par plusieurs virus, que ce soit des virus à ARN de polarité positive comme pour le VHC, le poliovirus, le virus de l'hépatite murine (Verheije et al., 2008) mais aussi des virus à ARN négatif tel que le virus Ebola (Yamayoshi et al., 2010), le virus de la grippe (*influenza*)(Watanabe et al., 2014) et diverses autres familles de virus à ARN négatif (Panda et al., 2011).

Pour tous ces virus, GBF1 est impliqué de manière différente durant l'infection. Certains virus tel que le virus Ebola et le virus de la méningo-encéphalite à tique (TBEV) requièrent GBF1 dans la formation des particules virales (étapes tardives du cycle viral) (Yamayoshi et al., 2010)(Vonderstein et al., 2017). En revanche la plupart des virus nécessitent GBF1 pendant l'étape de réplication de l'ARN viral. En effet, comme pour le VHC, la BFA inhibe la réplication d'autres virus de la même famille, le virus de la dengue (Carpp et al., 2014), le virus de la peste porcine (CSFV)(Liang et al., 2017) et le virus de la fièvre jaune (YFV)(Ferlin et al., 2018). C'est aussi le cas pour des virus d'autres familles tel que les virus SARS-CoV (de Wilde et al., 2015) HCoV-229E (Ferlin et al., 2018) et MHV (Verheije et al., 2008) de la famille des *Coronaviridae* et

le poliovirus (Belov et al., 2008), le Coxsackievirus CVB3 (Wessels et al., 2007), et l'enterovirus EV71 (Wang et al., 2014b) de la famille des *Picornaviridae*.

Pour la majorité des virus décrits jusqu'à présent, GBF1 est impliqué très tôt pendant la réplication. Concernant le VHC l'inhibition de GBF1 au début de la réplication bloque l'infection par le VHC (Goueslain et al., 2010)(Hansen et al., 2017). En revanche, lorsque les complexes de réplication sont formés et que la réplication du VHC est établie, le rôle de GBF1 devient moindre et son inhibition n'a pas d'impact majeur sur la réplication virale à ce stade (Goueslain et al., 2010).

Dans notre étude l'interaction de NS3 avec GBF1 est en accord avec l'implication de celui-ci au cours des étapes précoces de la réplication, puisque c'est le cas aussi pour la protéase NS3-4A qui assure sa fonction dans la maturation de la polyprotéine au début de l'infection avant même que les complexes de réplication soient formés. Ce qui rend NS3 bien placée pour interagir avec des facteurs cellulaires impliqués précocement dans la réplication.

De la même manière que pour le VHC, la BFA inhibe la réplication des virus de la dengue (Carpp et al., 2014) et du MHV (Verheije et al., 2008) lorsque les cellules sont traitées juste après l'entrée virale, mais l'inhibition est moins importante lorsque le traitement a lieu plus tard. Durant l'infection par MHV et poliovirus, GBF1 colocalise avec les complexes de réplication, de manière transitoire au début de la réplication concernant le MHV (Verheije et al., 2008), et jusqu'à des étapes plus tardives en ce qui concerne le poliovirus où GBF1 reste toujours visible sur les sites de réplication (Richards et al., 2014).

Pour le VHC, GBF1 n'est pas un composant des complexes de réplication (Goueslain et al., 2010), ce qui corrèle avec le fait que GBF1 ne soit plus important lorsque les complexes de réplication sont formés. Cependant, il est impossible expérimentalement de vérifier si GBF1 est transitoirement recruté au moment où les complexes de réplication commencent à se former. Les expériences de cinétiques indiquent que la fonction de GBF1 est cruciale durant une période de la réplication qui correspond à la période de latence de 16-20h dans les cellules Huh7, où les protéines virales synthétisées sont encore en dessous du seuil de détection par immunofluorescence. C'est pourquoi, il ne nous a pas été possible de réaliser des co-marquages avec GBF1 et des protéines virales à ce stade d'infection. Au moment où les complexes de réplication sont détectables par immunofluorescence aucun recrutement de GBF1 n'a été observé, ce qui concorde avec l'importance fonctionnelle marginale de GBF1 à ce stade (Goueslain et al., 2010). Ainsi, nous pouvons seulement supposer que l'interaction entre NS3 et GBF1 participe à la fonction de GBF1 dans la réplication durant cette période de latence. La fonction précise de cette interaction est encore inconnue. D'autres études sont requises afin de discerner si cette interaction permet d'activer GBF1 localement, ou permet simplement de le recruter lui ou ses effecteurs à un endroit spécifique.

Dans cette étude, un résidu d'Asn ou de Ser en position 77, situé sur la surface du domaine protéase de la NS3 semble appartenir à la zone d'interaction avec GBF1. La substitution de ce résidu par un Asp dans les souches Con1 et JFH1 inhibe fortement la réplication sans pour autant affecter l'activité protéase de la protéine. Même si nous ne pouvons pas exclure que cette mutation pourrait rompre des interactions avec d'autres protéines virales ou cellulaires, en plus de GBF1, l'interaction réduite observée dans le double hybride suggère fortement que cette mutation affecte l'interaction avec GBF1. Les expériences de co-immunoprécipitation ne nous ont pas permis d'obtenir une évidence d'une réduction de l'interaction de NS3 avec GBF1, excepté lorsque les cellules ont été traitées à la BFA. Cependant, cette technique n'est certainement pas assez sensible pour pouvoir détecter de faibles réductions d'interaction pouvant avoir de telles conséquences fonctionnelles, comme les résultats du double hybride le suggèrent.

Pour certains virus qui nécessitent GBF1 pour la réplication, une interaction a été montrée avec une de leurs protéines virales. C'est le cas du virus de la dengue où une interaction entre GBF1 et sa protéine NS5 a été montrée mais les domaines impliqués dans l'interaction non pas été définis (Carpp et al., 2014). Une interaction avec GBF1 a été montrée pour la protéine non-structurale 3A de deux entérovirus, le poliovirus et le coxsackievirus B3 (Wessels et al., 2006). Contrairement au VHC, le domaine de GBF1 impliqué dans l'interaction pour ces deux entérovirus n'est pas le domaine catalytique sec7 mais la région en N-terminal de GBF1 (Wessels et al., 2007) (Belov et al., 2010). La différence des domaines de GBF1 impliqués dans l'interaction corrèle avec une différence de la fonction de GBF1 durant la réplication de VHC et la réplication des entérovirus. La fonction de GBF1 dans l'infection par le poliovirus ne nécessite pas le domaine Sec7, par conséquent elle ne dépend pas de l'activité ArfGEF de GBF1, mais nécessite plutôt le domaine N-terminal de GBF1 qui interagit avec la protéine 3A (Belov et al., 2010). En revanche, la réplication du VHC n'est pas dépendante de la région N-terminale du GBF1 et nécessite son activité ArfGEF assurée par le domaine catalytique Sec7. De manière plus précise, la fonction de GBF1 durant l'infection par le VHC est médiée par la paire des Arf de classe II, Arf4 et Arf5 et non pas Arf1 (Farhat et al., 2016), ce qui laisse penser que la voie empruntée par GBF1 lors de l'infection par le VHC est une voie non-canonique. Par conséquent, la fonction de GBF1 durant la réplication du VHC impliquerait probablement la régulation d'effecteurs spécifiques, encore non-identifiés, durant l'infection par le VHC. Récemment, il a été rapporté dans notre équipe, que d'autres virus à ARN de polarité positive notamment le virus de la fièvre jaune, le virus Sindbis et le HCoV-229E, dépendent de la paire d'Arf4/5 pour leur réplication (Ferlin et al., 2018). Ce n'est pas le cas concernant le CVB4 qui ne nécessite pas cette paire d'Arf pour sa réplication, ce qui de nouveau est en accord avec l'implication de GBF1 avec des fonctions distinctes au cours de l'infection par différents virus. Ainsi, les virus à ARN de polarité positive semblent employer différentes stratégies en utilisant différentes fonctions de GBF1 au cours de la réplication. Le VHC ainsi que d'autres virus de la famille des *Flaviviridae* et éventuellement la

famille des *Coronaviridae*, auraient besoin de l'activité ArfGEF de GBF1 pour activer les Arf de classe II, tandis que les entérovirus semblent plutôt engager GBF1 pour une fonction indépendante de son activité ArfGEF. Toujours est-il que le rôle de GBF1 dans le cadre infectieux n'est toujours pas connu. Néanmoins, les données actuelles ont tendance à montrer que GBF1 serait impliqué dans une voie non-canonique, différente de la fonction physiologique connue de GBF1 dans la régulation de la voie de sécrétion précoce qui dépend aussi de l'activité ArfGEF mais qui est médiée par une autre paire d'Arf, Arf1 et Arf4 (Farhat et al., 2016)(Ferlin et al., 2018). Les recherches futures sur la nature des effecteurs des Arf de classe II impliqués dans la réplication virale devraient apporter davantage d'éclaircissements à propos de la fonction de GBF1 sur laquelle il est engagé au cours de l'infection par le VHC et permettrait éventuellement de définir le mécanisme d'action de GBF1. D'autre part, l'identification de ces effecteurs permettraient aussi de développer de nouvelles thérapies antivirales.

En plus de leur activité protéase essentielle au clivage et à la maturation des polyprotéines virales, les protéases virales possèdent des fonctions alternatives telles que le clivage de certains facteurs cellulaires qui pourraient perturber le cycle viral notamment ceux impliqués dans l'immunité innée (Lin et al., 2006a). En outre, plusieurs protéases virales ont été retrouvées en étroite association avec les voies du trafic vésiculaire et la dynamique des membranes.

Par exemple, le rhinovirus, virus à ARN de polarité positive de la famille des *Picornaviridae*, possède une protéase virale appelée 2Apro. Son rôle majeur serait de cliver la polyprotéine virale aboutissant aux différentes protéines virales matures. Par ailleurs, la protéase 2Apro clive des protéines cellulaires de la famille des nucléoporines (Nup), impliquées dans la régulation du trafic et du transport nucléaires. Le trafic nucléo-cytoplasmique, qui semble interférer avec la réplication virale, est ainsi inhibé (Watters et al., 2017).

Concernant le VHC, la protéase NS3 a déjà été décrite pour interférer dans le transport nucléo-cytoplasmique. Récemment, il a été montré que la protéine NS3 induit le clivage de la protéine importin β 1 et inhibe ainsi le transport nucléaire d'IRF3 et de la sous-unité p65 de NF- κ B pour empêcher la production de l'IFN β (Gagné et al. 2017).

Un autre exemple de l'implication des protéases virales dans la machinerie vésiculaire, est le cas de la protéase de l'entérovirus D68 (EV-68), virus à ARN de polarité positive, qui modifie la signalisation de l'autophagie dans la cellule. L'autophagie semble être nécessaire à la réplication virale de l'EV-68. Il a été montré que la protéase virale de l'EV-68 était capable de cliver plusieurs protéines cellulaires et notamment la protéine SNAP29. SNAP29 est impliquée dans la fusion membranaire entre les autophagosomes, les amphisomes et les autolysosomes. Le virus préviendrait donc la dégradation par l'autophagie en clivant une des protéines impliquées dans ce processus (Corona et al., 2018)

Concernant le VHC, une interaction a été retrouvée entre la protéine NS3 du virus et la protéine IRGM (immunity-associated GTPase family M) (Grégoire et al., 2011) connue pour contribuer à l'autophagie chez plusieurs virus, comme c'est le cas pour l'EV-68 (Corona et al., 2018) (Grégoire et al., 2012). IRGM interagit avec NS3 ainsi que différentes protéines autophagosomales induisant ainsi l'autophagie. Il a été montré que l'autophagie était induite et finement régulée durant l'infection par le VHC (Ait-Goughoulte et al., 2008)(Vescovo et al., 2014). Le mécanisme précis de l'implication de la protéine NS3 et son rôle dans l'autophagie n'est pas encore élucidé. Son rôle pourrait probablement être en lien avec l'échappement de la réponse immunitaire. De plus, il a été montré que l'inhibition de l'autophagie expérimentalement stimule la réponse innée contre le VHC (Shrivastava et al., 2011).

D'autre part, il a été montré que durant l'infection par le VHC, IRGM est localisée au niveau de l'appareil Golgi et contrôlerait la phosphorylation de GBF1, suggérant un rôle de GBF1 dans l'autophagie en faveur du virus (Hansen et al., 2017). Ce processus d'autophagie impliquant à la fois NS3 et GBF1 pourrait être une voie potentielle où ces deux protéines interagissent pour générer une atmosphère nécessaire à la mise en place de la réplication ou à l'inhibition de la réponse immunitaire innée très tôt durant le cycle viral.

Références bibliographiques

- Abdelwahab, K.S., and Ahmed Said, Z.N. (2016). Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World J. Gastroenterol.* 22, 862–873.
- Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., et al. (2007). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates the Toll-Like Receptor-MyD88-Dependent Signaling Pathway in Macrophage Cell Lines. *J. Virol.* 81, 8953–8966.
- Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., and Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Struct. Lond. Engl.* 1993 7, 1417–1426.
- Aguilera-Romero, A., Kaminska, J., Spang, A., Riezman, H., and Muñoz, M. (2008). The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 180, 713–720.
- Ahlenstiel, G., Titerence, R.H., Koh, C., Edlich, B., Feld, J.J., Rotman, Y., Ghany, M.G., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Heller, T., et al. (2010). Natural Killer Cells Are Polarized Toward Cytotoxicity in Chronic Hepatitis C in an Interferon- α -Dependent Manner. *Gastroenterology* 138, 325-335.e2.
- Ait-Goughoulte, M., Kanda, T., Meyer, K., Ryerse, J.S., Ray, R.B., and Ray, R. (2008). Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J. Virol.* 82, 2241–2249.
- Akazawa, D., Moriyama, M., Yokokawa, H., Omi, N., Watanabe, N., Date, T., Morikawa, K., Aizaki, H., Ishii, K., Kato, T., et al. (2013). Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology* 145, 447-455.e1-4.
- Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y., and Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatol. Baltim. Md* 55, 998–1007.
- Alter, M.J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 13, 2436–2441.
- Alter, H.J., Holland, P.V., Morrow, A.G., Purcell, R.H., Feinstone, S.M., and Moritsugu, Y. (1975). Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet Lond. Engl.* 2, 838–841.
- Anders, N., and Jürgens, G. (2008). Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 3433–3445.
- André, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Bréchet, C., and Lotteau, V. (2005). Hepatitis C Virus Particles and Lipoprotein Metabolism. *Semin. Liver Dis.* 25, 93–104.
- Ansaldi, F., Orsi, A., Sticchi, L., Bruzzone, B., and Icardi, G. (2014). Hepatitis C virus in the new era:

- Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J. Gastroenterol.* 20, 9633–9652.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLOS Pathog.* 4, e1000035.
- Asp, L., Kartberg, F., Fernandez-Rodriguez, J., Smedh, M., Elsner, M., Laporte, F., Bárcena, M., Jansen, K.A., Valentijn, J.A., Koster, A.J., et al. (2009). Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol. Biol. Cell* 20, 780–790.
- Atoom, A.M., Jones, D.M., and Russell, R.S. (2013). Evidence suggesting that HCV p7 protects E2 glycoprotein from premature degradation during virus production. *Virus Res.* 176, 199–210.
- Atoom, A.M., Taylor, N.G.A., and Russell, R.S. (2014). The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology* 462–463, 377–387.
- Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M., and Grompe, M. (2007). Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat. Biotechnol.* 25, 903–910.
- Banerjee, R., and Dasgupta, A. (2001). Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA. *J. Virol.* 75, 1708–1721.
- Baril, M., Racine, M.-E., Penin, F., and Lamarre, D. (2009). MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. *J. Virol.* 83, 1299–1311.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T., and Koch, J.O. (1995). Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J. Virol.* 69, 7519–7528.
- Bartenschlager, R., Frese, M., and Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* 63, 71–180.
- Barth, H., Cerino, R., Arcuri, M., Hoffmann, M., Schürmann, P., Adah, M.I., Gissler, B., Zhao, X., Ghisetti, V., Lavezzo, B., et al. (2005). Scavenger Receptor Class B Type I and Hepatitis C Virus Infection of Primary Tupaia Hepatocytes. *J. Virol.* 79, 5774–5785.
- Bartosch, B., and Cosset, F.-L. (2009). Studying HCV cell entry with HCV pseudoparticles (HCVpp). *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 510, 279–293.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003a). Infectious Hepatitis C Virus Pseudoparticles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J. Exp. Med.* 197, 633–642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F.-L. (2003b). Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 41624–41630.
- Bassett, S.E., Brasky, K.M., and Lanford, R.E. (1998). Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J. Virol.* 72, 2589–2599.
- Belov, G.A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C.L., and Ehrenfeld, E. (2008). A Critical Role of a Cellular Membrane Traffic Protein in Poliovirus RNA Replication. *PLoS Pathog.* 4, e1000216.

- Belov, G.A., Kovtunovych, G., Jackson, C.L., and Ehrenfeld, E. (2010). Poliovirus Replication Requires the N-terminus but not the Catalytic Sec7 Domain of ArfGEF GBF1. *Cell. Microbiol.* **12**, 1463–1479.
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernández, A., Aldabe, R., López-Cabrera, M., et al. (2009). The Tight Junction-Associated Protein Occludin Is Required for a Postbinding Step in Hepatitis C Virus Entry and Infection. *J. Virol.* **83**, 8012–8020.
- Beran, R.K.F., and Pyle, A.M. (2008). Hepatitis C Viral NS3-4A Protease Activity Is Enhanced by the NS3 Helicase. *J. Biol. Chem.* **283**, 29929–29937.
- Beran, R.K.F., Lindenbach, B.D., and Pyle, A.M. (2009). The NS4A Protein of Hepatitis C Virus Promotes RNA-Coupled ATP Hydrolysis by the NS3 Helicase. *J. Virol.* **83**, 3268–3275.
- Berger, K.L., Cooper, J.D., Heaton, N.S., Yoon, R., Oakland, T.E., Jordan, T.X., Mateu, G., Grakoui, A., and Randall, G. (2009). Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 7577–7582.
- Berman, M., Alter, H.J., Ishak, K.G., Purcell, R.H., and Jones, E.A. (1979). The chronic sequelae of non-A, non-B hepatitis. *Ann. Intern. Med.* **91**, 1–6.
- Bianco, A., Reghellin, V., Donnici, L., Fenu, S., Alvarez, R., Baruffa, C., Peri, F., Pagani, M., Abrignani, S., Neddermann, P., et al. (2012). Metabolism of Phosphatidylinositol 4-Kinase III α -Dependent PI4P Is Subverted by HCV and Is Targeted by a 4-Anilino Quinazoline with Antiviral Activity. *PLOS Pathog.* **8**, e1002576.
- Bility, M.T., Curtis, A., and Su, L. (2014). A Chimeric Mouse Model to Study Immunopathogenesis of HCV Infection. In *Animal Models for Stem Cell Therapy*, B. Christ, J. Oerlecke, and P. Stock, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 379–388.
- Blach, S., Zeuzem, S., Manns, M., Altraif, I., Duberg, A.-S., Muljono, D.H., Waked, I., Alavian, S.M., Lee, M.-H., Negro, F., et al. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 161–176.
- 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.
- Bode, J.G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P.C., and Häussinger, D. (2003). IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17**, 488–490.
- Borowski, P., Schalinski, S., and Schmitz, H. (2002). Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. *Antiviral Res.* **55**, 397–412.
- 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.
- Boulant, S., Douglas, M.W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2008). Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic* **9**, 1268–1282.

- Bouvier-Alias, M., Patel, K., Dahari, H., Beaucourt, S., Larderie, P., Blatt, L., Hezode, C., Picchio, G., Dhumeaux, D., Neumann, A.U., et al. (2002). Clinical utility of total HCV core antigen quantification: A new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 36, 211–218.
- Bradley, D.W., McCaustland, K.A., Cook, E.H., Schable, C.A., Ebert, J.W., and Maynard, J.E. (1985). Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 88, 773–779.
- Branch, A.D., Stump, D.D., Gutierrez, J.A., Eng, F., and Walewski, J.L. (2005). The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin. Liver Dis.* 25, 105–117.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). An Amino-terminal Amphipathic α -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J. Biol. Chem.* 277, 8130–8139.
- Brass, V., Moradpour, D., and Blum, H.E. (2007). Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. *J. Viral Hepat.* 14, 64–67.
- Brass, V., Berke, J.M., Montserret, R., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2008). Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14545–14550.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F.A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13034–13039.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A., and De Francesco, R. (2002). Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J. Virol.* 76, 3482–3492.
- Brouard, C., Boussac-Zarebska, M., Silvain, C., Durand, J., Lédighen, V. de, Pillonel, J., and Delarocque-Astagneau, E. (2017). Rapid and large-scale implementation of HCV treatment advances in France, 2007–2015. *BMC Infect. Dis.* 17, 784.
- Bukh, J. (2004). A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39, 1469–1475.
- Bukh, J. (2016). The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *New Perspect. HCV Infect.* 65, S2–S21.
- Bukh, J., and Purcell, R.H. (2006). A milestone for hepatitis C virus research: a virus generated in cell culture is fully viable in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3500–3501.
- Bukh, J., Purcell, R.H., and Miller, R.H. (1993). At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8234–8238.
- Bukh, J., Forns, X., Emerson, S.U., and Purcell, R.H. (2001). Studies of hepatitis C virus in chimpanzees and their importance for vaccine development. *Intervirology* 44, 132–142.
- Carpp, L.N., Rogers, R.S., Moritz, R.L., and Aitchison, J.D. (2014). Quantitative proteomic analysis of host-virus interactions reveals a role for Golgi brefeldin A resistance factor 1 (GBF1) in dengue infection. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 13, 2836–2854.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J.

- (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J. Virol.* 76, 3720–3730.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier, C., Lorenzo, L., Brulin, B., Cocquerel, L., Belouzard, S., Penin, F., and Dubuisson, J. (2004). Regulation of Hepatitis C Virus Polyprotein Processing by Signal Peptidase Involves Structural Determinants at the p7 Sequence Junctions. *J. Biol. Chem.* 279, 41384–41392.
- Carter, W., Connelly, S., and Struble, K. (2017). Reinventing HCV Treatment: Past and Future Perspectives. *J. Clin. Pharmacol.* 57, 287–296.
- Catamo, E., Zupin, L., Freato, N., Polesello, V., Celsi, F., Crocè, S.L., Masutti, F., Pozzato, G., Segat, L., and Crovella, S. (2017). HLA-G regulatory polymorphisms are associated with susceptibility to HCV infection. *HLA* 89, 135–142.
- 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. U. S. A.* 110, 9505–9510.
- Champeimont, R., Laine, E., Hu, S.-W., Penin, F., and Carbone, A. (2016). Coevolution analysis of *Hepatitis C* virus genome to identify the structural and functional dependency network of viral proteins. *Sci. Rep.* 6, 26401.
- Chang, J., Guo, J.-T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J.M., and Block, T.M. (2008). Liver-Specific MicroRNA miR-122 Enhances the Replication of Hepatitis C Virus in Nonhepatic Cells. *J. Virol.* 82, 8215.
- Chen, S.L., and Morgan, T.R. (2006). The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.* 3, 47–52.
- Chen, J., Zhao, Y., Zhang, C., Chen, H., Feng, J., Chi, X., Pan, Y., Du, J., Guo, M., Cao, H., et al. (2014). Persistent hepatitis C virus infections and hepatopathological manifestations in immune-competent humanized mice. *Cell Res.* 24, 1050.
- Chen, S., Wu, Z., Wang, M., Cheng, A., Chen, S., Wu, Z., Wang, M., and Cheng, A. (2017). Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses* 9, 291.
- Chen, Z., Simeon, R.L., Chockalingam, K., and Rice, C.M. (2010). Creation and characterization of a cell-death reporter cell line for hepatitis C virus infection. *Antiviral Res.* 86, 220–223.
- Cheung, P., Banfield, B.W., and Tufaro, F. (1991). Brefeldin A arrests the maturation and egress of herpes simplex virus particles during infection. *J. Virol.* 65, 1893–1904.
- Chevaliez, S. (2011). Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 116–121.
- Chevaliez, S., and Pawlotsky, J.-M. (2012). Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 26, 381–389.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.

- Chowdhury, J.B., Kim, H., Ray, R., and Ray, R.B. (2013). Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates IRF-7-Mediated Interferon- α Signaling. *J. Interferon Cytokine Res.* 34, 16–21.
- Claude, A., Zhao, B.P., Kuziemsky, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.P., Arnold, A.D., Sullivan, E.M., and Melançon, P. (1999). GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J. Cell Biol.* 146, 71–84.
- Cocquerel, L., Beeck, A.O. de, Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J.* 21, 2893–2902.
- Cocquerel, L., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J. Gen. Virol.* 87, 1075–1084.
- Coller, K.E., Heaton, N.S., Berger, K.L., Cooper, J.D., Saunders, J.L., and Randall, G. (2012). Molecular Determinants and Dynamics of Hepatitis C Virus Secretion. *PLOS Pathog.* 8, e1002466.
- Corona, A.K., Saulsbery, H.M., Corona Velazquez, A.F., and Jackson, W.T. (2018). Enteroviruses Remodel Autophagic Trafficking through Regulation of Host SNARE Proteins to Promote Virus Replication and Cell Exit. *Cell Rep.* 22, 3304–3314.
- Dansako, H., Yamane, D., Welsch, C., McGivern, D.R., Hu, F., Kato, N., and Lemon, S.M. (2013). Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003345.
- Daw, M.A., El-Bouzedi, A.A., Ahmed, M.O., Dau, A.A., Agnan, M.M., and Drah, A.M. (2016). Geographic integration of hepatitis C virus: A global threat. *World J. Virol.* 5, 170–182.
- De Francesco, R., Urbani, A., Nardi, M.C., Tomei, L., Steinkühler, C., and Tramontano, A. (1996). A Zinc Binding Site in Viral Serine Proteinases. *Biochemistry* 35, 13282–13287.
- Delang, L., Paeshuyse, J., and Neyts, J. (2012). The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1400–1408.
- Deng, Y., Golinelli-Cohen, M.-P., Smirnova, E., and Jackson, C.L. (2009). A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor. *EMBO Rep.* 10, 58–64.
- Deterding, K., Wiegand, J., Grüner, N., Hahn, A., Jäckel, E., Jung, M.C., Buggisch, P., Galle, P., Berg, T., Hinrichsen, H., et al. (2009). The German Hep-Net Acute Hepatitis C Cohort: Impact of Viral and Host Factors on the Initial Presentation of Acute Hepatitis C Virus Infection. *Z. Für Gastroenterol.* 47, 531–540.
- Dhingra, S., Ward, S.C., and Thung, S.N. (2016). Liver pathology of hepatitis C, beyond grading and staging of the disease. *World J. Gastroenterol.* 22, 1357–1366.
- Diamond, D.L., Syder, A.J., Jacobs, J.M., Sorensen, C.M., Walters, K.-A., Proll, S.C., McDermott, J.E., Gritsenko, M.A., Zhang, Q., Zhao, R., et al. (2010). Temporal Proteome and Lipidome Profiles Reveal Hepatitis C Virus-Associated Reprogramming of Hepatocellular Metabolism and Bioenergetics. *PLOS Pathog.* 6, e1000719.
- Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P., and Schuster, C. (2003). Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 77, 5401–5414.
- Ding, Q., Cao, X., Lu, J., Huang, B., Liu, Y.-J., Kato, N., Shu, H.-B., and Zhong, J. (2013). Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity. *J. Hepatol.*

59, 52–58.

Domitrovich, A.M., Diebel, K.W., Ali, N., Sarker, S., and Siddiqui, A. (2005). Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* 335, 72–86.

Donaldson, J.G., Finazzi, D., and Klausner, R.D. (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360, 350–352.

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.

Dorner, M., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Labitt, R.N., Budell, W.C., Friling, T., Vogt, A., Catanese, M.T., Satoh, T., Kawai, T., et al. (2013). Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* 501, 237.

Drummer, H.E. (2014). Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. *Front. Microbiol.* 5.

Drummer, H.E., Maerz, A., and Pountourios, P. (2003). Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett.* 546, 385–390.

D’Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 347.

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.

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* 76, 5974–5984.

Einav, S., Elazar, M., Danieli, T., and Glenn, J.S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J. Virol.* 78, 11288–11295.

Einav, S., Gerber, D., Bryson, P.D., Sklan, E.H., Elazar, M., Maerkl, S.J., Glenn, J.S., and Quake, S.R. (2008). Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat. Biotechnol.* 26, 1019–1027.

Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2004). An N-Terminal Amphipathic Helix in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates Membrane Association, Correct Localization of Replication Complex Proteins, and HCV RNA Replication. *J. Virol.* 78, 11393–11400.

Eltahla, A.A., Luciani, F., White, P.A., Lloyd, A.R., and Bull, R.A. (2015). Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses* 7, 5206–5224.

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

Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J., and Dragic, T. (2007). Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J. Virol.* 81, 8072–8079.

Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees

by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 15394–15399.

Farci, P., Munoz, S.J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Wong, D.C., Coiana, A., Peddis, G., Rubin, R., and Purcell, R.H. (1999). Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J. Infect. Dis.* **179**, 1007–1011.

Farhat, R., Goueslain, L., Wychowski, C., Belouzard, S., Fénéant, L., Jackson, C.L., Dubuisson, J., and Rouillé, Y. (2013). Hepatitis C Virus Replication and Golgi Function in Brefeldin A-Resistant Hepatoma-Derived Cells. *PLoS ONE* **8**, e74491.

Farhat, R., Séron, K., Ferlin, J., Fénéant, L., Belouzard, S., Goueslain, L., Jackson, C.L., Dubuisson, J., and Rouillé, Y. (2016). Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cell. Microbiol.* n/a-n/a.

Farhat, R., Ankavay, M., Lebsir, N., Gouttenoire, J., Jackson, C.L., Wychowski, C., Moradpour, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y., and Cocquerel, L. (2018). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cell. Microbiol.* **20**.

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.

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

Fénéant, L., Levy, S., Cocquerel, L., Fénéant, L., Levy, S., and Cocquerel, L. (2014). CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Viruses* **6**, 535–572.

Ferlin, J., Farhat, R., Belouzard, S., Cocquerel, L., Bertin, A., Hober, D., Dubuisson, J., and Rouillé, Y. (2018). Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **99**, 1086–1096.

Fernandes, F., Ansari, I.H., and Striker, R. (2010). Cyclosporine inhibits a direct interaction between cyclophilins and hepatitis C NS5A. *PLoS One* **5**, e9815.

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

Fogeron, M.-L., Paul, D., Jirasko, V., Montserret, R., Lacabanne, D., Molle, J., Badillo, A., Boukadida, C., Georgeault, S., Roingeard, P., et al. (2015). Functional expression, purification, characterization, and membrane reconstitution of non-structural protein 2 from hepatitis C virus. *Protein Expr. Purif.* **116**, 1–6.

Francesco, R.D., and Migliaccio, G. (2005). Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C.

Freedman, H., Logan, M.R., Law, J.L.M., and Houghton, M. (2016). Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infect. Dis.* **2**, 749–762.

Frick, D.N. (2007). The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr. Issues Mol. Biol.* **9**, 1–20.

Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2002). Genetic Analysis of Sequences in the 3' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus That Are Important for RNA Replication. *J. Virol.* **76**, 5326–5338.

- Gale, M.J., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.-L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence That Hepatitis C Virus Resistance to Interferon Is Mediated through Repression of the PKR Protein Kinase by the Nonstructural 5A Protein. *Virology* 230, 217–227.
- Gane, E.J., Stedman, C.A., Hyland, R.H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W.T., Hindes, R.G., and Berrey, M.M. (2013). Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* 368, 34–44.
- 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.
- García-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C., and Sztul, E. (2003). ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol. Biol. Cell* 14, 2250–2261.
- Garry, R.F., and Dash, S. (2003). Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* 307, 255–265.
- Gastaminza, P., Kapadia, S.B., and Chisari, F.V. (2006). Differential Biophysical Properties of Infectious Intracellular and Secreted Hepatitis C Virus Particles. *J. Virol.* 80, 11074–11081.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* 82, 2120–2129.
- Gastaminza, P., Dryden, K.A., Boyd, B., Wood, M.R., Law, M., Yeager, M., and Chisari, F.V. (2010). Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J. Virol.* 84, 10999–11009.
- Gawlik, K., and Gallay, P.A. (2014). HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunol. Res.* 60, 1–10.
- Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P.M., Frentzen, A., Kaderali, L., and Pietschmann, T. (2013). Hepatitis C Virus p7 is Critical for Capsid Assembly and Envelopment. *PLOS Pathog.* 9, e1003355.
- Ghasemi, F., Rostami, S., and Meshkat, Z. (2015). Progress in the development of vaccines for hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 21, 11984–12002.
- Giang, E., Dorner, M., Prentoe, J.C., Dreux, M., Evans, M.J., Bukh, J., Rice, C.M., Ploss, A., Burton, D.R., and Law, M. (2012). Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6205–6210.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F.-L., Montpellier, C., and Dubuisson, J. (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 79, 8400–8409.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J. Virol.* 77, 5487–5492.
- Gottwein, J.M., Scheel, T.K.H., Jensen, T.B., Lademann, J.B., Prentoe, J.C., Knudsen, M.L., Hoegh, A.M., and Bukh, J. (2009). Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7

cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology*. Baltimore, Md 49, 364–377.

Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., and Rouillé, Y. (2010). Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* 84, 773–787.

Gouklani, H., Bull, R.A., Beyer, C., Coulibaly, F., Gowans, E.J., Drummer, H.E., Netter, H.J., White, P.A., and Haqshenas, G. (2012). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5B Is Involved in Virus Morphogenesis. *J. Virol.* 86, 5080–5088.

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

Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.-H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. (2003). HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. *Science* 302, 659–662.

Grégoire, I.P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., Deloire, A., Azocar, O., Baguet, J., Le Breton, M., et al. (2011). IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* 7, e1002422.

Grégoire, I.P., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2012). Autophagy and RNA virus interactomes reveal IRGM as a common target. *Autophagy* 8, 1136–1137.

Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D., and Harris, M. (2005). Signal Peptide Cleavage and Internal Targeting Signals Direct the Hepatitis C Virus p7 Protein to Distinct Intracellular Membranes. *J. Virol.* 79, 15525–15536.

Gu, M., and Rice, C.M. (2013). Structures of hepatitis C virus nonstructural proteins required for replicase assembly and function. *Curr. Opin. Virol.* 3, 129–136.

Gutti, T.L., Knibbe, J.S., Makarov, E., Zhang, J., Yannam, G.R., Gorantla, S., Sun, Y., Mercer, D.F., Suemizu, H., Wisecarver, J.L., et al. (2014). Human Hepatocytes and Hematolymphoid Dual Reconstitution in Treosulfan-Conditioned uPA-NOG Mice. *Am. J. Pathol.* 184, 101–109.

von Hahn, T., Yoon, J.C., Alter, H., Rice, C.M., Rehermann, B., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132, 667–678.

Haid, S., Pietschmann, T., and Pécheur, E.-I. (2009). Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J. Biol. Chem.* 284, 17657–17667.

Hansen, M.D., Johnsen, I.B., Stiberg, K.A., Sherstova, T., Wakita, T., Richard, G.M., Kandasamy, R.K., Meurs, E.F., and Anthonsen, M.W. (2017). Hepatitis C virus triggers Golgi fragmentation and autophagy through the immunity-related GTPase M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201616683.

Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G.L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., et al. (2010). Claudin Association with CD81 Defines Hepatitis C Virus Entry. *J. Biol. Chem.* 285, 21092–21102.

He, L.-F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1987). Determining the Size of Non-A, Non-B Hepatitis Virus by Filtration. *J. Infect. Dis.* 156, 636–640.

Heim, M.H. (2013). Innate immunity and HCV. *J. Hepatol.* 58, 564–574.

- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z.-Y., Foug, S., Penin, F., Dubuisson, J., and Voisset, C. (2007). The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J. Virol.* *81*, 8101–8111.
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.-I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingard, P., Duverlie, G., and Dubuisson, J. (2010). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J. Virol.* *84*, 11905–11915.
- Hirst, J., Barlow, L.D., Francisco, G.C., Sahlender, D.A., Seaman, M.N.J., Dacks, J.B., and Robinson, M.S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol.* *9*, e1001170.
- 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.
- Honda, M., Ping, L.-H., Rijnbrand, R.C.A., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., and Lemon, S.M. (1996). Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA. *Virology* *222*, 31–42.
- Hoofnagle, J.H. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology* *26*, 15S-20S.
- Hope, V.D., Eramova, I., Capurro, D., and Donoghoe, M.C. (2014). Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. *Epidemiol. Infect.* *142*, 270–286.
- Horner, S.M. (2014). Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus. *J. Mol. Biol.* *426*, 1198–1209.
- Horner, S.M. (2015). Insights into antiviral innate immunity revealed by studying hepatitis C virus. *Cytokine* *74*, 190–197.
- 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.
- Houghton, M. (2009). Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int.* *29*, 82–88.
- Hsu, V.W., and Yang, J.-S. (2009). Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett.* *583*, 3758–3763.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7271–7276.
- Hu, B., Li, S., Zhang, Z., Xie, S., Hu, Y., Huang, X., and Zheng, Y. (2016). HCV NS4B targets Scribble for proteasome-mediated degradation to facilitate cell transformation. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 12387–12396.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., and Ye, J. (2007a). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 5848–5853.
- Huang, J.-T., Tseng, C.-P., Liao, M.-H., Lu, S.-C., Yeh, W.-Z., Sakamoto, N., Chen, C.-M., and Cheng, J.-C. (2013). Hepatitis C Virus Replication Is Modulated by the Interaction of Nonstructural Protein NS5B and Fatty Acid Synthase. *J. Virol.* *87*, 4994–5004.

- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R.S., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., and Cameron, C.E. (2005). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A (NS5A) Is an RNA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 36417–36428.
- Huang, Y., Staschke, K., Francesco, R.D., and Tan, S.-L. (2007b). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: A new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* **364**, 1–9.
- Hwang, D.-R., Lai, H.-Y., Chang, M.-L., Hsu, J.T.A., and Yeh, C.-T. (2005). Emergence of mutation clusters in the HCV genome during sequential viral passages in Sip-L expressing cells. *J. Virol. Methods* **129**, 170–177.
- Irshad, M., and Dhar, I. (2006). Hepatitis C Virus Core Protein: An Update on Its Molecular Biology, Cellular Functions and Clinical Implications. *Med. Princ. Pract.* **15**, 405–416.
- Irurzun, A., Pérez, L., and Carrasco, L. (1993). Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett.* **336**, 496–500.
- Ito, T., and Lai, M.M. (1999). An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* **254**, 288–296.
- Jackson, C.L., and Bouvet, S. (2014). Arfs at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 4103–4109.
- Jackson, C.L., and Casanova, J.E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* **10**, 60–67.
- Jackson, D., Tabor, E., and Gerety, R.J. (1979). ACUTE NON-A, NON-B HEPATITIS: SPECIFIC ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS IN ENDOPLASMIC RETICULUM OF INFECTED HEPATOCYTES. *The Lancet* **313**, 1249–1250.
- Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., et al. (2011). Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection.
- Jensen, T.B., Gottwein, J.M., Scheel, T.K.H., Hoegh, A.M., Eugen-Olsen, J., and Bukh, J. (2008). Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. *J. Infect. Dis.* **198**, 1756–1765.
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2008). Structural and Functional Characterization of Nonstructural Protein 2 for Its Role in Hepatitis C Virus Assembly. *J. Biol. Chem.* **283**, 28546–28562.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010). Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. *PLOS Pathog.* **6**, e1001233.
- Jo, J., Lohmann, V., Bartenschlager, R., and Thimme, R. (2011). Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **92**, 477–493.
- Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J., and Rice, C.M. (2007). Hepatitis C Virus p7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus. *J. Virol.* **81**, 8374–8383.
- Jones, C.T., Catanese, M.T., Law, L.M.J., Khetani, S.R., Syder, A.J., Ploss, A., Oh, T.S., Schoggins, J.W., MacDonald, M.R., Bhatia, S.N., et al. (2010). Real-time imaging of hepatitis C virus infection

using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat. Biotechnol.* **28**, 167–171.

Jones, D.M., Patel, A.H., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2009). The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. *J. Virol.* **83**, 2163–2177.

Jones, D.M., Atoom, A.M., Zhang, X., Kottlilil, S., and Russell, R.S. (2011). A Genetic Interaction between the Core and NS3 Proteins of Hepatitis C Virus Is Essential for Production of Infectious Virus[▽]. *J. Virol.* **85**, 12351–12361.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577.

Kahn, R.A., Bruford, E., Inoue, H., Logsdon, J.M., Nie, Z., Premont, R.T., Randazzo, P.A., Satake, M., Theibert, A.B., Zapp, M.L., et al. (2008). Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *J. Cell Biol.* **182**, 1039–1044.

Kao, C.C., Yi, G., and Huang, H.-C. (2016). The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* **17**, 66–73.

Kato, H., Takahashi, K., and Fujita, T. (2011). RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol. Rev.* **243**, 91–98.

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

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

Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S., and Nakayama, K. (2002). GBF1, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-Ribosylation Factors, is Localized to the cis-Golgi and Involved in Membrane Association of the COPI Coat. *Traffic* **3**, 483–495.

Khan, A.G., Whidby, J., Miller, M.T., Scarborough, H., Zatorski, A.V., Cygan, A., Price, A.A., Yost, S.A., Bohannon, C.D., Jacob, J., et al. (2014). Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* **509**, 381–384.

Kielian, M., and Rey, F.A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 67–76.

Kim, J., Morgenstern, K., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M., Landro, J., Chambers, S., Markland, W., Lepre, C., O'Malley, E., et al. (1996). Crystal Structure of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain Complexed with a Synthetic NS4A Cofactor Peptide. *Cell* **87**, 343–355.

Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C., and Caron, P.R. (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **6**, 89–100.

Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 187–198.

Klausner, R.D., Donaldson, J.G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* **116**, 1071–1080.

- Kolykhalov, A.A., Agapov, E.V., and Rice, C.M. (1994). Specificity of the hepatitis C virus NS3 serine protease: effects of substitutions at the 3/4A, 4A/4B, 4B/5A, and 5A/5B cleavage sites on polyprotein processing. *J. Virol.* **68**, 7525–7533.
- Kolykhalov, A.A., Agapov, E.V., Blight, K.J., Mihalik, K., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570–574.
- Kong, L., Giang, E., Nieusma, T., Kadam, R.U., Cogburn, K.E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Ward, A.B., et al. (2013). Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Core Structure. *Science* **342**, 1090–1094.
- Krieger, N., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *J. Virol.* **75**, 4614–4624.
- Kumar, A., Das, S., Mullick, R., Lahiri, P., Tatineni, R., Goswami, D., Bhat, P., Torresi, J., Gowans, E.J., Karande, A.A., et al. (2016). Immune responses against hepatitis C virus genotype 3a virus-like particles in mice: A novel VLP prime-adenovirus boost strategy. *Vaccine* **34**, 1115–1125.
- Kumthip, K., Chusri, P., Jilg, N., Zhao, L., Fusco, D.N., Zhao, H., Goto, K., Cheng, D., Schaefer, E.A., Zhang, L., et al. (2012). Hepatitis C Virus NS5A Disrupts STAT1 Phosphorylation and Suppresses Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* **86**, 8581–8591.
- Kwong, A.D., Rao, B.G., and Jeang, K.-T. (2005). Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 845–853.
- Lan, K.-H., Lan, K.-L., Lee, W.-P., Sheu, M.-L., Chen, M.-Y., Lee, Y.-L., Yen, S.-H., Chang, F.-Y., and Lee, S.-D. (2007). HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *J. Hepatol.* **46**, 759–767.
- Lanke, K.H.W., Schaar, H.M. van der, Belov, G.A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C.L., Ehrenfeld, E., and Kuppeveld, F.J.M. van (2009). GBF1, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Arf, Is Crucial for Cocksackievirus B3 RNA Replication. *J. Virol.* **83**, 11940–11949.
- Lavanchy, D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* **29**, 74–81.
- Lavie, M., and Goffard, A. Assembly of a Functional HCV Glycoprotein Heterodimer. **17**.
- 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, S.Y., Yang, J.-S., Hong, W., Premont, R.T., and Hsu, V.W. (2005). ARFGAP1 plays a central role in coupling COPI cargo sorting with vesicle formation. *J. Cell Biol.* **168**, 281–290.
- Lefèvre, M., Felmler, 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.
- Levin, M.K., Wang, Y.-H., and Patel, S.S. (2004). The Functional Interaction of the Hepatitis C Virus Helicase Molecules Is Responsible for Unwinding Processivity. *J. Biol. Chem.* **279**, 26005–26012.
- Li, K., and Lemon, S.M. (2013). Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin. Immunopathol.* **35**, 53–72.

- Li, H., Yang, X., Yang, G., Hong, Z., Zhou, L., Yin, P., Xiao, Y., Chen, L., Chung, R.T., and Zhang, L. (2014). Hepatitis C Virus NS5A Hijacks ARFGAP1 To Maintain a Phosphatidylinositol 4-Phosphate-Enriched Microenvironment. *J. Virol.* *88*, 5956–5966.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., and Lemon, S.M. (2005a). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2992–2997.
- Li, K., Li, N.L., Wei, D., Pfeffer, S.R., Fan, M., and Pfeffer, L.M. (2012a). Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *55*, 666–675.
- Li, S., Ye, L., Yu, X., Xu, B., Li, K., Zhu, X., Liu, H., Wu, X., and Kong, L. (2009). Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF- κ B activation. *Virology* *391*, 257–264.
- Li, S., Yu, X., Guo, Y., and Kong, L. (2012b). Interaction networks of hepatitis C virus NS4B: implications for antiviral therapy. *Cell. Microbiol.* *14*, 994–1002.
- Li, X.-D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2005b). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17717–17722.
- Liang, W., Zheng, M., Bao, C., and Zhang, Y. (2017). CSFV proliferation is associated with GBF1 and Rab2. *J. Biosci.* *42*, 43–56.
- Liang, Y., Cao, X., Ding, Q., Zhao, Y., He, Z., and Zhong, J. (2018). Hepatitis C virus NS4B induces the degradation of TRIF to inhibit TLR3-mediated interferon signaling pathway. *PLoS Pathog.* *14*, e1007075.
- Lin, C. (2006). HCV NS3-4A Serine Protease. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*, S.-L. Tan, ed. (Norfolk (UK): Horizon Bioscience), p.
- Lin, C., Lindenbach, B.D., Prágai, B.M., McCourt, D.W., and Rice, C.M. (1994). Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* *68*, 5063–5073.
- Lin, R., Lacoste, J., Nakhaei, P., Sun, Q., Yang, L., Paz, S., Wilkinson, P., Julkunen, I., Vitour, D., Meurs, E., et al. (2006a). Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J. Virol.* *80*, 6072–6083.
- Lin, W., Kim, S.S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Kim, K.A., Holtzman, M.J., and Chung, R.T. (2006b). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J. Virol.* *80*, 9226–9235.
- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 688–700.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* *309*, 623–626.
- Lindenbach, B.D., 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.
- Lindenbach, B.D., Prágai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K.F., Pyle, A.M., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). The C Terminus of Hepatitis C Virus NS4A Encodes an Electrostatic Switch That Regulates NS5A Hyperphosphorylation and Viral Replication. *J. Virol.* **81**, 8905–8918.
- Lingala, S., and Ghany, M.G. (2015). Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **44**, 717–734.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R.D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**, 601–616.
- 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.
- Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10149–10154.
- Lohmann, V. (2013). Hepatitis C virus RNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **369**, 167–198.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* **285**, 110–113.
- Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A., and Bartenschlager, R. (2001). Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *J. Virol.* **75**, 1437–1449.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2003). Viral and Cellular Determinants of Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *J. Virol.* **77**, 3007–3019.
- Lombana, L., Ortega-Atienza, S., Gómez-Gutiérrez, J., Yélamos, B., Peterson, D.L., and Gavilanes, F. (2016). The deletion of residues 268-292 of E1 impairs the ability of HCV envelope proteins to induce pore formation. *Virus Res.* **217**, 63–70.
- Loo, Y.-M., Owen, D.M., Li, K., Erickson, A.K., Johnson, C.L., Fish, P.M., Carney, D.S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., et al. (2006). Viral and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 6001–6006.
- Loomba, R., Rivera, M.M., McBurney, R., Park, Y., Haynes-Williams, V., Rehmann, B., Alter, H.J., Herrine, S.K., Liang, T.J., Hoofnagle, J.H., et al. The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33**, 559–565.
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., and Rice, C.M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831–835.
- Love, R.A., Parge, H.E., Wickersham, J.A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E.W., Adachi, T., and Hostomska, Z. (1996). The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* **87**, 331–342.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Dwek, R.A., Biggin, P.C., Vénien-Bryan,

- C., and Zitzmann, N. (2009). The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 12712–12716.
- Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Von Heijne, G., and Persson, M.A.A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J. Virol.* *77*, 5428–5438.
- Luo, G., Hamatake, R.K., Mathis, D.M., Racela, J., Rigat, K.L., Lemm, J., and Colonno, R.J. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* *74*, 851–863.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* *17*, 589–595.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011). Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins. *J. Virol.* *85*, 86–97.
- Maasoumy, B., and Wedemeyer, H. (2012). Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *26*, 401–412.
- Macdonald, A., and Harris, M. (2004). Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* *85*, 2485–2502.
- Madan, V., and Bartenschlager, R. (2015). Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin. *Viruses* *7*, 4461–4481.
- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R., and Budkowska, A. (2001). Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J. Virol.* *75*, 8240–8250.
- Mandiyan, V., Andreev, J., Schlessinger, J., and Hubbard, S.R. (1999). Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *EMBO J.* *18*, 6890–6898.
- Manolea, F., Claude, A., Chun, J., Rosas, J., and Melançon, P. (2008). Distinct functions for Arf guanine nucleotide exchange factors at the Golgi complex: GBF1 and BIGs are required for assembly and maintenance of the Golgi stack and trans-Golgi network, respectively. *Mol. Biol. Cell* *19*, 523–535.
- Mansour, S.J., Herbrick, J.A., Scherer, S.W., and Melançon, P. (1998). Human GBF1 is a ubiquitously expressed gene of the sec7 domain family mapping to 10q24. *Genomics* *54*, 323–327.
- Marascio, N., Torti, C., Liberto, M.C., and Focà, A. (2014). Update on different aspects of HCV variability: focus on NS5B polymerase. *BMC Infect. Dis.* *14*, S1.
- Markov, P.V., Laar, T.J. van de, Thomas, X.V., Aronson, S.J., Weegink, C.J., Berk, G.E. van den, Prins, M., Pybus, O.G., and Schinkel, J. (2012). Colonial History and Contemporary Transmission Shape the Genetic Diversity of Hepatitis C Virus Genotype 2 in Amsterdam. *J. Virol.* *86*, 7677–7687.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., et al. (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol.* *82*, 7964–7976.

- Masavuli, M.G., Wijesundara, D.K., Torresi, J., Gowans, E.J., and Grubor-Bauk, B. (2017). Preclinical Development and Production of Virus-Like Particles As Vaccine Candidates for Hepatitis C. *Front. Microbiol.* **8**.
- Matto, M., Sklan, E.H., David, N., Melamed-Book, N., Casanova, J.E., Glenn, J.S., and Aroeti, B. (2011). Role for ADP ribosylation factor 1 in the regulation of hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **85**, 946–956.
- 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.
- van der Meer, A.J., Feld, J.J., Hofer, H., Almasio, P.L., Calvaruso, V., Fernández-Rodríguez, C.M., Aleman, S., Ganne-Carrié, N., D'Ambrosio, R., Pol, S., et al. (2017). Risk of cirrhosis-related complications in patients with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *J. Hepatol.* **66**, 485–493.
- 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.T., et al. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* **7**, 927–933.
- Merz, A., Long, G., Hiet, M.-S., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J. Biol. Chem.* **286**, 3018–3032.
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antonny, B. (2013). A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* **155**, 830–843.
- 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., Bukh, J., Verhoye, L., Farhoudi, A., Vanwolleghem, T., Wang, R.Y., Desombere, I., Alter, H., Purcell, R.H., and Leroux-Roels, G. (2011). In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology* **53**, 755–762.
- Meunier, J.C., Fournillier, A., Choukhi, A., Cahour, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J., and Wychowski, C. (1999). Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 4), 887–896.
- Meunier, J.-C., Engle, R.E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S.U., Cosset, F.-L., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4560–4565.
- Meyers, N.L., Fontaine, K.A., Kumar, G.R., and Ott, M. (2016). Entangled in a membranous web: ER and lipid droplet reorganization during hepatitis C virus infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* **41**, 117–124.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172.
- Micallef, J.M., Kaldor, J.M., and Dore, G.J. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J. Viral Hepat.* **13**, 34–41.

- Miot, C., Beaumont, E., Duluc, D., Guillou-Guillemette, H.L., Preisser, L., Garo, E., Blanchard, S., Fouchard, I.H., Créminon, C., Lamourette, P., et al. (2015). IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* 64, 1466–1475.
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., and Ikehara, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 11398–11403.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9, 1089–1097.
- Monazahian, M., Böhme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and Thomssen, R. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* 57, 223–229.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N., and Alvarez, C. (2007). Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol. Biol. Cell* 18, 2400–2410.
- Moosavy, S.H., Davoodian, P., Nazarnezhad, M.A., Nejatizadeh, A., Eftekhari, E., and Mahboobi, H. (2017). Epidemiology, transmission, diagnosis, and outcome of Hepatitis C virus infection. *Electron. Physician* 9, 5646–5656.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H.E., and Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Proc. Tenth Int. Symp. Viral Hepatitis* 60, 103–109.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lohmann, V. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 78, 13278–13284.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 453–463.
- 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.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13–22.
- Murphy, D.G., Sablon, E., Chamberland, J., Fournier, E., Dandavino, R., and Tremblay, C.L. (2015). Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa. *J. Clin. Microbiol.* 53, 967–972.
- Nakagawa, M., Sakamoto, N., Tanabe, Y., Koyama, T., Itsui, Y., Takeda, Y., Chen, C.-H., Kakinuma, S., Oooka, S., Maekawa, S., et al. (2005). Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 129, 1031–1041.
- Nascimbeni, M., Mizukoshi, E., Bosmann, M., Major, M.E., Mihalik, K., Rice, C.M., Feinstone, S.M., and Rehermann, B. (2003). Kinetics of CD4+ and CD8+ Memory T-Cell Responses during Hepatitis C Virus Rechallenge of Previously Recovered Chimpanzees. *J. Virol.* 77, 4781–4793.
- Neufeldt, C.J., Joyce, M.A., Van Buuren, N., Levin, A., Kirkegaard, K., Gale, M., Tyrrell, D.L.J., and

- Wozniak, R.W. (2016). The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. *PLoS Pathog.* 12, e1005428.
- Neumann-Haefelin, C., and Thimme, R. (2013). Adaptive Immune Responses in Hepatitis C Virus Infection. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 243–262.
- Niepmann, M. (2013). Hepatitis C Virus RNA Translation. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, R. Bartenschlager, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 143–166.
- Niepmann, M., Shalamova, L.A., Gerresheim, G.K., and Rossbach, O. (2018). Signals Involved in Regulation of Hepatitis C Virus RNA Genome Translation and Replication. *Front. Microbiol.* 9.
- Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., Azuma, S., et al. (2013). Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 46–58.
- Niu, T.-K., Pfeifer, A.C., Lippincott-Schwartz, J., and Jackson, C.L. (2005). Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol. Biol. Cell* 16, 1213–1222.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., and Seya, T. (2009). Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284, 807–817.
- Oshiumi, H., Miyashita, M., Matsumoto, M., and Seya, T. (2013). A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* 9, e1003533.
- Pacheco, A., and Martinez-Salas, E. (2010). Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 458927.
- Palmer, D.J., Helms, J.B., Beckers, C.J., Orci, L., and Rothman, J.E. (1993). Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* 268, 12083–12089.
- Panda, D., Das, A., Dinh, P.X., Subramaniam, S., Nayak, D., Barrows, N.J., Pearson, J.L., Thompson, J., Kelly, D.L., Ladunga, I., et al. (2011). RNAi screening reveals requirement for host cell secretory pathway in infection by diverse families of negative-strand RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19036–19041.
- Papatheodoridis, G.V., Hatzakis, A., Cholongitas, E., Baptista-Leite, R., Baskozos, I., Chhatwal, J., Colombo, M., Cortez-Pinto, H., Craxi, A., Goldberg, D., et al. Hepatitis C: The beginning of the end—key elements for successful European and national strategies to eliminate HCV in Europe. *J. Viral Hepat.* 25, 6–17.
- Park, C.-Y., Jun, H.-J., Wakita, T., Cheong, J.H., and Hwang, S.B. (2009). Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 9237–9246.
- Park, Y., Lee, J.-H., Kim, B.S., Kim, D.Y., Han, K.-H., and Kim, H.-S. (2010). New Automated Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen Assay as an Alternative to Real-Time PCR for HCV RNA Quantification. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2253–2256.
- Pasqualato, S., Renault, L., and Cherfils, J. (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-

- binding proteins with a structural device for “front-back” communication. *EMBO Rep.* 3, 1035–1041.
- 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.
- Paul, D., Madan, V., Ramirez, O., Bencun, M., Stoeck, I.K., Jirasko, V., and Bartenschlager, R. (2018). Glycine Zipper Motifs in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Are Required for the Establishment of Viral Replication Organelles. *J. Virol.* 92.
- Pawlotsky, J.M., and Germanidis, G. (1999). The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* 6, 343–356.
- Peeling, R.W., Boeras, D.I., Marinucci, F., and Easterbrook, P. (2017). The future of viral hepatitis testing: innovations in testing technologies and approaches. *BMC Infect. Dis.* 17, 699.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.-M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5–19.
- Phan, T., Beran, R.K.F., Peters, C., Lorenz, I.C., and Lindenbach, B.D. (2009). Hepatitis C Virus NS2 Protein Contributes to Virus Particle Assembly via Opposing Epistatic Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. *J. Virol.* 83, 8379–8395.
- Phan, T., Kohlway, A., Dimberu, P., Pyle, A.M., and Lindenbach, B.D. (2011). The Acidic Domain of Hepatitis C Virus NS4A Contributes to RNA Replication and Virus Particle Assembly. *J. Virol.* 85, 1193–1204.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.-L., et al. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7408–7413.
- Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Leroux-Roels, G., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2009). Production of Infectious Genotype 1b Virus Particles in Cell Culture and Impairment by Replication Enhancing Mutations. *PLOS Pathog.* 5, e1000475.
- Piñeiro, D., Martinez-Salas, E., Piñeiro, D., and Martinez-Salas, E. (2012). RNA Structural Elements of Hepatitis C Virus Controlling Viral RNA Translation and the Implications for Viral Pathogenesis. *Viruses* 4, 2233–2250.
- Ploss, A., and Evans, M.J. (2012). Hepatitis C virus host cell entry. *Curr. Opin. Virol.* 2, 14–19.
- 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.
- Popescu, C.-I., and Dubuisson, J. (2010). Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol. Cell* 102, 63–74.
- Preciado, M.V., Valva, P., Escobar-Gutierrez, A., Rahal, P., Ruiz-Tovar, K., Yamasaki, L., Vazquez-Chacon, C., Martinez-Guarneros, A., Carpio-Pedroza, J.C., Fonseca-Coronado, S., et al. (2014). Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* 20, 15992–16013.
- Quinkert, D., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2005). Quantitative Analysis of the Hepatitis C

Virus Replication Complex. *J. Virol.* 79, 13594–13605.

Rai, R., and Deval, J. (2011). New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: Targeting NS4B. *Antiviral Res.* 90, 93–101.

Randall, G., Panis, M., Cooper, J.D., Tellinghuisen, T.L., Sukhodolets, K.E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B.D., et al. (2007). Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12884–12889.

Raney, K.D., Sharma, S.D., Moustafa, I.M., and Cameron, C.E. (2010). Hepatitis C Virus Non-structural Protein 3 (HCV NS3): A Multifunctional Antiviral Target. *J. Biol. Chem.* 285, 22725–22731.

Ray, U., Roy, C.L., Kumar, A., Mani, P., Joseph, A.P., Sudha, G., Sarkar, D.P., Srinivasan, N., and Das, S. (2013). Inhibition of the Interaction Between NS3 Protease and HCV IRES With a Small Peptide: A Novel Therapeutic Strategy. *Mol. Ther.* 21, 57–67.

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.

Reiss, S., Harak, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Klein, R., Ruggieri, A., Rebhan, I., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2013). The Lipid Kinase Phosphatidylinositol-4 Kinase III Alpha Regulates the Phosphorylation Status of Hepatitis C Virus NS5A. *PLOS Pathog.* 9, e1003359.

Renault, L., Guibert, B., and Cherfils, J. (2003). Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 426, 525–530.

Repasky, G.A., Chenette, E.J., and Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.* 14, 639–647.

Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E., and Bradley, D.W. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247, 1335–1339.

Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1995). Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4942–4946.

Richards, A.L., Soares-Martins, J.A.P., Riddell, G.T., and Jackson, W.T. (2014). Generation of Unique Poliovirus RNA Replication Organelles. *MBio* 5.

Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piéquet, A., Loudes, A.M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C., et al. (2002). Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *J. Virol.* 76, 8808–8819.

Romano, A., Angeli, P., Piovesan, S., Noventa, F., Anastassopoulos, G., Chemello, L., Cavalletto, L., Gambato, M., Russo, F.P., Burra, P., et al. (2018). Newly diagnosed hepatocellular carcinoma in patients with advanced hepatitis C treated with DAAs: A prospective population study. *J. Hepatol.*

Romero-Brey, I., and Bartenschlager, R. (2014). Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses* 6, 2826–2857.

Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., et al. (2012). Three-Dimensional Architecture and

- Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLOS Pathog.* 8, e1003056.
- Romero-López, C., and Berzal-Herranz, A. (2017). The 5BSL3.2 Functional RNA Domain Connects Distant Regions in the Hepatitis C Virus Genome. *Front. Microbiol.* 8, 2093.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., et al. (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J. Virol.* 80, 2832–2841.
- Sabahi, A., Uprichard, S.L., Wimley, W.C., Dash, S., and Garry, R.F. (2014). Unexpected Structural Features of the Hepatitis C Virus Envelope Protein 2 Ectodomain. *J. Virol.* 88, 10280–10288.
- Sáenz, J.B., Sun, W.J., Chang, J.W., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N.S., and Haslam, D.B. (2009). Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nat. Chem. Biol.* 5, 157–165.
- Sagan, S.M., Rouleau, Y., Leggiadro, C., Supekova, L., Schultz, P.G., Su, A.I., and Pezacki, J.P. (2006). The influence of cholesterol and lipid metabolism on host cell structure and hepatitis C virus replication. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 84, 67–79.
- Sagan, S.M., Chahal, J., and Sarnow, P. (2015). cis-Acting RNA elements in the hepatitis C virus RNA genome. *Virus Res.* 206, 90–98.
- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454, 523–527.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11646–11651.
- Santos, C., and Herrine, S.K. (2010). Making the Best of a Bad Situation: Early Chronic Nosocomial HCV infection. *Dig. Dis. Sci.* 55, 1509–1511.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017–5025.
- Scheel, T.K.H., and Rice, C.M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* 19, 837–849.
- Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F., and Tautz, N. (2009). Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5342–5347.
- Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739–789.
- Sedeño-Monge, V., Vallejo-Ruiz, V., Sosa-Jurado, F., and Santos-López, G. (2017). Polymorphisms in the hepatitis C virus core and its association with development of hepatocellular carcinoma. *J. Biosci.* 42, 509–521.
- Semmo, N., Lucas, M., Krashias, G., Lauer, G., Chapel, H., and Klenerman, P. (2006). Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood* 107, 4570–4571.

- Serti, E., Chepa-Lotrea, X., Kim, Y.J., Keane, M., Fryzek, N., Liang, T.J., Ghany, M., and Rehermann, B. (2015). Successful Interferon-Free Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection Normalizes Natural Killer Cell Function. *Gastroenterology* *149*, 190-200.e2.
- Sharma, N.R., Mateu, G., Dreux, M., Grakoui, A., Cosset, F.-L., and Melikyan, G.B. (2011). Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J. Biol. Chem.* *286*, 30361–30376.
- Shawky, S.M., Awad, A.M., Allam, W., Alkordi, M.H., and El-Khamisy, S.F. (2017). Gold aggregating gold: A novel nanoparticle biosensor approach for the direct quantification of hepatitis C virus RNA in clinical samples. *Biosens. Bioelectron.* *92*, 349–356.
- Shi, G., and Suzuki, T. (2018). Molecular Basis of Encapsidation of Hepatitis C Virus Genome. *Front. Microbiol.* *9*.
- Shi, S.T., and Lai, M.M.C. (2006). HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*, S.-L. Tan, ed. (Norfolk (UK): Horizon Bioscience), p.
- Shi, G., Ando, T., Suzuki, R., Matsuda, M., Nakashima, K., Ito, M., Omatsu, T., Oba, M., Ochiai, H., Kato, T., et al. (2016). Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLOS Pathog.* *12*, e1005441.
- Shi, Q., Jiang, J., and Luo, G. (2013). Syndecan-1 Serves as the Major Receptor for Attachment of Hepatitis C Virus to the Surfaces of Hepatocytes. *J. Virol.* *87*, 6866–6875.
- Shimizu, Y.K., Feinstone, S.M., Purcell, R.H., Alter, H.J., and London, W.T. (1979). Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* *205*, 197–200.
- Shin, E., Park, S., DeMino, M., Nascimbeni, M., Mihalik, K., Major, M., Veerapu, N.S., Heller, T., Feinstone, S.M., Rice, C.M., et al. (2011). Delayed Induction, Not Impaired Recruitment, of Specific CD8⁺ T Cells Causes the Late Onset of Acute Hepatitis C. *Gastroenterology* *141*, 686-695.e1.
- Shinotsuka, C., Yoshida, Y., Kawamoto, K., Takatsu, H., and Nakayama, K. (2002). Overexpression of an ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation. *J. Biol. Chem.* *277*, 9468–9473.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002). Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity. *J. Biol. Chem.* *277*, 11149–11155.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8⁺ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J. Exp. Med.* *197*, 1645–1655.
- Shrivastava, S., Raychoudhuri, A., Steele, R., Ray, R., and Ray, R.B. (2011). Knockdown of autophagy enhances innate immune response in hepatitis C virus infected hepatocytes. *Hepatology* *53*, 406–414.
- Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.-A., Chan, S.-W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J., and Urdea, M.S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* *74*, 2391–2399.

- Singal, A.G., Volk, M.L., Jensen, D., Di Bisceglie, A.M., and Schoenfeld, P.S. (2010). A Sustained Viral Response Is Associated With Reduced Liver-Related Morbidity and Mortality in Patients With Hepatitis C Virus. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 280-288.e1.
- Singh, M.K., Gao, H., Sun, W., Song, Z., Schmalzigaug, R., Premont, R.T., and Zhang, Q. (2015). Structure-activity relationship studies of QS11, a small molecule Wnt synergistic agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 4838–4842.
- Sklan, E.H., and Glenn, J.S. (2006). HCV NS4B: From Obscurity to Central Stage. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*, S.-L. Tan, ed. (Norfolk (UK): Horizon Bioscience), p.
- Smith, D.B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J., Yap, P.L., and Simmonds, P. (1997). The origin of hepatitis C virus genotypes. *J. Gen. Virol.* 78, 321–328.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., and Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59, 318–327.
- Smith, D.B., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, A.S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Stapleton, J.T., et al. (2016). Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J. Gen. Virol.* 97, 2894–2907.
- Spang, A. (2002). ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 423–427.
- Spångberg, K., Wiklund, L., and Schwartz, S. (2001). Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J. Gen. Virol.* 82, 113–120.
- Spengler, U. (2018). Direct antiviral agents (DAAs) - A new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacol. Ther.* 183, 118–126.
- Stapleford, K.A., and Lindenbach, B.D. (2011). Hepatitis C Virus NS2 Coordinates Virus Particle Assembly through Physical Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. *J. Virol.* 85, 1706–1717.
- Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* 2, 2078–2095.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLOS Pathog.* 3, e103.
- Stiasny, K., Fritz, R., Pangerl, K., and Heinz, F.X. (2011). Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids* 41, 1159–1163.
- Sulkowski, M.S., Gardiner, D.F., Rodriguez-Torres, M., Reddy, K.R., Hassanein, T., Jacobson, I., Lawitz, E., Lok, A.S., Hiney, F., Thuluvath, P.J., et al. (2014). Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 370, 211–221.
- Swadling, L., Capone, S., Antrobus, R.D., Brown, A., Richardson, R., Newell, E.W., Halliday, J., Kelly, C., Bowen, D., Fergusson, J., et al. (2014). A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci. Transl. Med.* 6, 261ra153-261ra153.
- Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., and Hotta, H.

- (2004). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J. Gen. Virol.* **85**, 959–969.
- Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., and Chisari, F.V. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7431–7436.
- Tamura, G., Ando, K., Suzuki, S., Takatsuki, A., and Arima, K. (1968). Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. *J. Antibiot. (Tokyo)* **21**, 160–161.
- Tarr, A., Khera, T., Hueging, K., Sheldon, J., Steinmann, E., Pietschmann, T., Brown, R., Tarr, A.W., Khera, T., Hueging, K., et al. (2015). Genetic Diversity Underlying the Envelope Glycoproteins of Hepatitis C Virus: Structural and Functional Consequences and the Implications for Vaccine Design. *Viruses* **7**, 3995–4046.
- Tasaka, M., Sakamoto, N., Itakura, Y., Nakagawa, M., Itsui, Y., Sekine-Osajima, Y., Nishimura-Sakurai, Y., Chen, C.-H., Yoneyama, M., Fujita, T., et al. (2007). Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J. Gen. Virol.* **88**, 3323–3333.
- Te, H.S., Randall, G., and Jensen, D.M. (2007). Mechanism of Action of Ribavirin in the Treatment of Chronic Hepatitis C. *Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 218–225.
- 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. (2008a). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* **4**, e1000032.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J.C., and Rice, C.M. (2008b). Identification of Residues Required for RNA Replication in Domains II and III of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *J. Virol.* **82**, 1073–1083.
- Teterina, N.L., Pinto, Y., Weaver, J.D., Jensen, K.S., and Ehrenfeld, E. (2011). Analysis of poliovirus protein 3A interactions with viral and cellular proteins in infected cells. *J. Virol.* **85**, 4284–4296.
- Thi, V.L.D., 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 Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *J. Biol. Chem.* **287**, 31242–31257.
- Thibeault, D., Maurice, R., Pilote, L., Lamarre, D., and Pause, A. (2001). In Vitro Characterization of a Purified NS2/3 Protease Variant of Hepatitis C Virus. *J. Biol. Chem.* **276**, 46678–46684.
- Thimme, R., Lohmann, V., and Weber, F. (2006). A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res.* **69**, 129–141.
- Thimme, R., Binder, M., and Bartenschlager, R. (2012). Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 663–683.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.H., Köchel, H.G., and Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **181**, 293–300.
- Thomssen, R., Bonk, S., and Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in

- human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **182**, 329–334.
- Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., Francesco, R.D., and Monica, N.L. (1993). NS3 Is a Serine Protease Required for Processing of Hepatitis C Virus Polyprotein. *J VIROL* **67**, 10.
- Tong, Y., Chi, X., Yang, W., and Zhong, J. (2017). Functional Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Envelope Protein E1 Using a trans-Complementation System Reveals a Dual Role of a Putative Fusion Peptide of E1 in both HCV Entry and Morphogenesis. *J. Virol.* **91**.
- Tong, Y., Lavillette, D., Li, Q., and Zhong, J. (2018). Role of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly. *Front. Immunol.* **9**, 1411.
- Torresi, J. (2017). The Rationale for a Preventative HCV Virus-Like Particle (VLP) Vaccine. *Front. Microbiol.* **8**.
- Tripathi, L.P., Kataoka, C., Taguwa, S., Moriishi, K., Mori, Y., Matsuura, Y., and Mizuguchi, K. (2010). Network based analysis of hepatitis C virus core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.* **6**, 2539–2553.
- Tsuchihara, K., Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., Yamamoto, N., and Shimotohno, K. (1997). Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J. Virol.* **71**, 6720–6726.
- Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., and Kohara, M. (2017). Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 23.
- Uzri, D., and Gehrke, L. (2009). Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities. *J. Virol.* **83**, 4174–4184.
- Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., and Mavromara, P. (2002). Alternate Translation Occurs within the Core Coding Region of the Hepatitis C Viral Genome. *J. Biol. Chem.* **277**, 17713–17721.
- Vassilaki, N., and Mavromara, P. (2009). The HCV ARFP/F/core+1 protein: Production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* **61**, 739–752.
- Vercauteren, K., Jong, Y.P. de, and Meuleman, P. (2014). HCV animal models and liver disease. *J. Hepatol.* **61**, S26–S33.
- Vercauteren, K., de Jong, Y.P., and Meuleman, P. (2015). Animal models for the study of HCV. *Curr. Opin. Virol.* **13**, 67–74.
- Verheije, M.H., Raaben, M., Mari, M., Lintelo, E.G. te, Reggiori, F., Kuppeveld, F.J.M. van, Rottier, P.J.M., and Haan, C.A.M. de (2008). Mouse Hepatitis Coronavirus RNA Replication Depends on GBF1-Mediated ARF1 Activation. *PLoS Pathog.* **4**.
- Vescovo, T., Refolo, G., Romagnoli, A., Ciccocanti, F., Corazzari, M., Alonzi, T., and Fimia, G.M. (2014). Autophagy in HCV Infection: Keeping Fat and Inflammation at Bay. *BioMed Res. Int.* **2014**.
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., and Dubuisson, J. (2010). Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *J. Virol.* **84**, 10159–10168.
- Vieyres, G., Dubuisson, J., and Pietschmann, T. (2014). Incorporation of Hepatitis C Virus E1 and

- E2 Glycoproteins: The keystones on a peculiar virion. *Viruses* **6**, 1149–1187.
- Voisset, C., and Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol. Cell* **96**, 413–413.
- Volpicelli-Daley, L.A., Li, Y., Zhang, C.-J., and Kahn, R.A. (2005). Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4495–4508.
- Vonderstein, K., Nilsson, E., Hubel, P., Skalman, L.N., Upadhyay, A., Pasto, J., Pichlmair, A., Lundmark, R., and Överby, A.K. (2017). Viperin targets flavivirus virulence by inducing assembly of non-infectious capsid particles. *J. Virol.* JVI.01751-17.
- 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.
- Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D., and Branch, A.D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* **7**, 710–721.
- Wang, H., and Tai, A.W. (2016). Mechanisms of Cellular Membrane Reorganization to Support Hepatitis C Virus Replication. *Viruses* **8**, 142.
- Wang, C.C., Krantz, E., Klarquist, J., Krows, M., McBride, L., Scott, E.P., Shaw-Stiffel, T., Weston, S.J., Thiede, H., Wald, A., et al. (2007). Acute Hepatitis C in a Contemporary US Cohort: Modes of Acquisition and Factors Influencing Viral Clearance. *J. Infect. Dis.* **196**, 1474–1482.
- Wang, H., Perry, J.W., Lauring, A.S., Neddermann, P., De Francesco, R., and Tai, A.W. (2014a). Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* **146**, 1373-1385.e1-11.
- Wang, J., Du, J., and Jin, Q. (2014b). Class I ADP-ribosylation factors are involved in enterovirus 71 replication. *PLoS One* **9**, e99768.
- Waris, G., Felmler, D.J., Negro, F., and Siddiqui, A. (2007). Hepatitis C Virus Induces Proteolytic Cleavage of Sterol Regulatory Element Binding Proteins and Stimulates Their Phosphorylation via Oxidative Stress. *J. Virol.* **81**, 8122.
- 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.
- Watanabe, T., Sugauchi, F., Tanaka, Y., Matsuura, K., Yatsunami, H., Murakami, S., Iijima, S., Iio, E., Sugiyama, M., Shimada, T., et al. (2013). Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut* **62**, 1340–1346.
- Watanabe, T., Kawakami, E., Shoemaker, J.E., Lopes, T.J.S., Matsuoka, Y., Tomita, Y., Kozuka-Hata, H., Gorai, T., Kuwahara, T., Takeda, E., et al. (2014). Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe* **16**, 795–805.
- Watahi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* **19**, 111–122.
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays Biochem.* **59**, 43–69.

- Watters, K., Inankur, B., Gardiner, J.C., Warrick, J., Sherer, N.M., Yin, J., and Palmenberg, A.C. (2017). Differential Disruption of Nucleocytoplasmic Trafficking Pathways by Rhinovirus 2A Proteases. *J. Virol.* **91**.
- Welbourn, S., and Pause, A. (2006). HCV NS2/3 Protease. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*, S.-L. Tan, ed. (Norfolk (UK): Horizon Bioscience), p.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843–846.
- Wessels, E., Duijsings, D., Niu, T.-K., Neumann, S., Oorschot, V.M., de Lange, F., Lanke, K.H.W., Klumperman, J., Henke, A., Jackson, C.L., et al. (2006). A Viral Protein that Blocks Arf1-Mediated COP-I Assembly by Inhibiting the Guanine Nucleotide Exchange Factor GBF1. *Dev. Cell* **11**, 191–201.
- Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K.H.W., Melchers, W.J.G., Jackson, C.L., and van Kuppeveld, F.J.M. (2007). Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *J. Virol.* **81**, 5238–5245.
- Westbrook, R.H., and Dusheiko, G. (2014). Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.* **61**, S58–S68.
- White, P.W., Llinas-Brunet, M., and Bös, M. (2006). 2 Blunting the Swiss Army Knife of Hepatitis C Virus: Inhibitors of NS3/4A Protease. In *Progress in Medicinal Chemistry*, F.D. King, and G. Lawton, eds. (Elsevier), pp. 65–107.
- de Wilde, A.H., Wannee, K.F., Scholte, F.E.M., Goeman, J.J., Ten Dijke, P., Snijder, E.J., Kikkert, M., and van Hemert, M.J. (2015). A Kinome-Wide Small Interfering RNA Screen Identifies Proviral and Antiviral Host Factors in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication, Including Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase and Early Secretory Pathway Proteins. *J. Virol.* **89**, 8318–8333.
- Wilson, E.M., Bial, J., Tarlow, B., Bial, G., Jensen, B., Greiner, D.L., Brehm, M.A., and Grompe, M. (2014). Extensive double humanization of both liver and hematopoiesis in FRGN mice. *Stem Cell Res.* **13**, 404–412.
- Wong, M.-T., and Chen, S.S.-L. (2016). Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 11–35.
- Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010). Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. *PLOS Pathog.* **6**, e1001087.
- Wu, W., Shao, S., Zhao, L., Luan, J., Cao, J., Gao, J., Zhu, S., and Qi, Z. (2007). Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* **50**, 341–346.
- Xu, Y., and Zhong, J. (2016). Innate immunity against hepatitis C virus. *Curr. Opin. Immunol.* **42**, 98–104.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S.B., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.J., and Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* **20**, 3840–3848.
- Yamayoshi, S., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2010). Role of the GTPase Rab1b in ebolavirus particle formation. *J. Virol.* **84**, 4816–4820.

- Yanagi, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U., and Bukh, J. (1997). Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 8738–8743.
- Yang, D.-R., and Zhu, H.-Z. (2015). Hepatitis C virus and antiviral innate immunity: Who wins at tug-of-war? *World J. Gastroenterol.* *21*, 3786–3800.
- Yang, F., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kenworthy, R., and Tang, H. (2008). Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J. Virol.* *82*, 5269–5278.
- Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A.D., Le, H.V., and Weber, P.C. (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat. Struct. Biol.* *4*, 463–467.
- Yao, N., Reichert, P., Taremi, S.S., Prosise, W.W., and Weber, P.C. (1999). Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease–helicase. *Structure* *7*, 1353–1363.
- Yi, M., and Lemon, S.M. (2004). Adaptive Mutations Producing Efficient Replication of Genotype 1a Hepatitis C Virus RNA in Normal Huh7 Cells. *J. Virol.* *78*, 7904–7915.
- Yi, G., Wen, Y., Shu, C., Han, Q., Konan, K.V., Li, P., and Kao, C.C. (2016). Hepatitis C Virus NS4B Can Suppress STING Accumulation To Evade Innate Immune Responses. *J. Virol.* *90*, 254–265.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J., and Lemon, S.M. (2007). Compensatory Mutations in E1, p7, NS2, and NS3 Enhance Yields of Cell Culture-Infectious Intergenotypic Chimeric Hepatitis C Virus. *J. Virol.* *81*, 629.
- Yu, Y., Ji, H., Doudna, J.A., and Leary, J.A. (2005). Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: Native and HCV IRES-bound complexes. *Protein Sci.* *14*, 1438–1446.
- Zeeh, J.-C., Zeghouf, M., Grauffel, C., Guibert, B., Martin, E., Dejaegere, A., and Cherfils, J. (2006). Dual specificity of the interfacial inhibitor brefeldin a for arf proteins and sec7 domains. *J. Biol. Chem.* *281*, 11805–11814.
- Zeuzem, S. (2008). Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and future perspectives. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *5*, 610–622.
- Zhang, J., Yamada, O., Yoshida, H., Iwai, T., and Araki, H. (2002). Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* *293*, 141–150.
- Zhang, L., Hong, Z., Lin, W., Shao, R.-X., Goto, K., Hsu, V.W., and Chung, R.T. (2012). ARF1 and GBF1 generate a PI4P-enriched environment supportive of hepatitis C virus replication. *PLoS One* *7*, e32135.
- Zhang, Q., Major, M.B., Takanashi, S., Camp, N.D., Nishiya, N., Peters, E.C., Ginsberg, M.H., Jian, X., Randazzo, P.A., Schultz, P.G., et al. (2007). Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 7444–7448.
- Zhang, S., Kodys, K., Li, K., and Szabo, G. (2013). Human Type 2 Myeloid Dendritic Cells Produce Interferon-λ and Amplify Interferon-α in Response to Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* *144*, 414-425.e7.
- Zhang, Z., Kim, T., Bao, M., Facchinetti, V., Jung, S.Y., Ghaffari, A.A., Qin, J., Cheng, G., and Liu, Y.-J. (2011). DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to

sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity* 34, 866–878.

Zhao, P., Han, T., Guo, J.-J., Zhu, S.-L., Wang, J., Ao, F., Jing, M.-Z., She, Y.-L., Wu, Z.-H., and Ye, L.-B. (2012). HCV NS4B induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. *Virus Res.* 169, 1–7.

Zhao, X., Lasell, T.K.R., Melanción, P., and Pfeffer, S.R. (2002). Localization of Large ADP-Ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factors to Different Golgi Compartments: Evidence for Distinct Functions in Protein Traffic. *Mol. Biol. Cell* 13, 119–133.

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.

Zhong, W., Uss, A.S., Ferrari, E., Lau, J.Y., and Hong, Z. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* 74, 2017–2022.

Zhu, Y.-Z., Qian, X.-J., Zhao, P., and Qi, Z.-T. (2014). How hepatitis C virus invades hepatocytes: The mystery of viral entry. *World J. Gastroenterol.* 20, 3457–3467.

Annexe

Functional and physical interaction between the Arf activator GBF1 and hepatitis C virus NS3 protein

Running title: NS3-GBF1 interaction

Authors: Nadjat Lebsir^{1*}, Lucie Goueslain^{2*}, Rayan Farhat^{1§}, Nathalie Callens¹, Jean Dubuisson¹, Catherine L. Jackson², Yves Rouillé¹

Affiliations: ¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CILL- Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France; ² Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS, Université Paris Diderot-Paris7, Paris, France

* contributed equally to the study

§ present address: Inserm U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR-5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France

Correspondence: Yves Rouillé, yves.rouille@ibl.cnrs.fr and Cathy Jackson, cathy.jackson@ijm.fr

Keywords: ADP-ribosylation factor, hepatitis C virus, viral replication,

ABSTRACT

GBF1 has emerged as a host factor required for the replication of RNA viruses of different families. During the hepatitis C virus (HCV) life cycle, GBF1 performs a critical function at the onset of replication, but is dispensable when the replication is established. To better understand how GBF1 regulates HCV infection, we have looked for interactions between GBF1 and HCV proteins. NS3 was found to interact with GBF1 in yeast two-hybrid, in co-immunoprecipitation and in proximity ligation assays, and to interfere with GBF1 function and alter GBF1 intracellular localization in cells expressing NS3. The interaction was mapped to the Sec7 domain of GBF1 and the protease domain of NS3. A yeast two-hybrid screen for mutations altering NS3-GBF1 interaction yielded an NS3 mutant (N77D, Con1 strain) that is non-replicative despite conserved protease activity. The mutated residue is exposed at the surface of NS3, suggesting it could be part of the domain of NS3 that interacts with GBF1. The corresponding mutation in JFH-1 strain (S77D) produces the same phenotype. Our results provide evidence for an interaction between NS3 and GBF1 and suggest that an alteration of this interaction is detrimental to HCV replication.

IMPORTANCE

Single-stranded, positive-sense RNA viruses substantially rely on host factors to achieve the replication of their genome. GBF1 is such a cellular protein that is required for the replication of several RNA viruses, but its mechanism of action during viral infections is not yet defined. In this study, we investigated potential interactions that GBF1 engages with proteins of hepatitis C virus (HCV), a GBF1-dependent virus. We found that GBF1 interacts with NS3, a non-structural protein involved in HCV replication, and our results suggest that this interaction is important for GBF1 function during HCV replication. Interestingly, GBF1 interaction with HCV appears different from its interaction with enteroviruses, another group of GBF1-dependent RNA viruses, in keeping with the fact that HCV and enteroviruses use different functions of GBF1.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a small enveloped single-stranded positive-sense RNA virus that infects human hepatocytes and causes persistent infection in most HCV-patients. HCV replicates its genome in the cytoplasm of the host cell. Its RNA-dependent RNA polymerase and other non-structural proteins implicated in replication are found in association with rearranged cellular membranes, which have been named membranous web (1). The membranous web is composed of single membrane and double membrane vesicles (2, 3) originating from the endoplasmic reticulum (ER) membrane. Two viral proteins, NS4B and NS5A, appear to play a major role in the induction of membrane rearrangements (3, 4). The protease and helicase NS3-4A and the RNA-dependent RNA polymerase NS5B are also included in HCV replication complexes, in addition to NS4B and NS5A. Cell host factors from the ER such as VAP-A (5) and the phosphatidylinositol-4-kinase alpha (PI4KIII α) (6-10) are recruited to the membranous web and are functionally involved in HCV replication. In addition, cellular factors from other cellular compartments, including Rab5 (11), OSBP (12) and FAPP2 (13) are also recruited to the membranous web and play essential functions in HCV replication. Interactions with NS5A appear to play important roles in the recruitment of most of these cellular factors.

We previously identified GBF1 as a host factor critical for HCV replication (14). GBF1 is a brefeldin A (BFA)-sensitive guanine nucleotide exchange factor (GEF) of Arf family members (15). Through Arf1 activation, it participates in the regulation of COP-I-dependent vesicular transport, phospholipid metabolism, the actin cytoskeleton dynamics at the Golgi and lipid droplet metabolism (16, 17). Its inhibition by BFA or golgicide A (GCA) leads to inhibition of secretion and disassembly of the Golgi complex. GBF1 has six conserved domains (18). Its Arf-GEF activity is catalyzed by the Sec7 domain and is selective for class I Arfs (Arf1-3) and class II Arfs (Arf4 and Arf5) (15, 19). The functions of the other conserved domains are less defined (18, 20). In addition to HCV, GBF1 is a host factor involved in the replication of RNA viruses of the families *Picornaviridae* (21-23), *Coronaviridae* (24), *Flaviviridae* (25) and *Hepeviridae* (26).

Little is known about the mechanism of action of GBF1 in HCV and other viral infections. Its Arf-GEF activity appears to be of special importance at the onset of HCV replication, but is not essential when the replication is established (14). However its Arf-GEF activity is not required for the formation of membrane rearrangements leading to the formation of the membranous web (14), suggesting that GBF1 is rather involved in a post-formation step of membrane-associated replication complex function. It has been proposed that GBF1 could be involved in the generation of phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P)-enriched replication complexes through Arf1-dependent activation of Golgi-resident PI4 kinase-III β (27). However, the involvement of this kinase during HCV replication is still controversial (28-32). Moreover, we recently demonstrated that the function of GBF1 during HCV replication is not mediated by Arf1, and is distinct from its regulatory functions in respect of the cellular secretory pathway and the morphology of the Golgi

complex (33). GBF1 function in HCV replication is mediated by the pair Arf4 and Arf5, whereas its function in the regulation of the secretory pathway is mediated by the pair Arf1 and Arf4 (33, 34). The involvement of class II Arfs in viral replication appears to be conserved for some, but not all RNA viruses (35). To get more insight into how GBF1 regulates HCV replication, we investigated in this study potential interactions between GBF1 and HCV proteins.

RESULTS

NS3 interacts with GBF1.

Potential interactions between HCV proteins and GBF1 were investigated using a yeast two-hybrid assay. The HCV proteins core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B were each tested individually for interaction with GBF1. In addition to GBF1, there are two other Golgi-localized Arf GEFs, BIG1 and BIG2, which are not required for HCV infection. To test potential specificity in interaction, BIG1 and BIG2 were each tested, in addition to GBF1, for interaction with HCV proteins. Because of the large size of the Arf GEFs, three domains of each GEF protein were tested individually: the N-terminus, the catalytic Sec7 domain and the C-terminus. Among the 90 combinations tested, only one interaction was found, between NS3 and the catalytic Sec7 domain of GBF1 (fig 1A). No interaction was observed with any other HCV protein, and only the Sec7 domain of GBF1 among the Arf GEFs tested gave a positive signal.

Deletion mutants were used to further map the interaction within NS3. We found an interaction between the Sec7 domain of GBF1 and the protease domain of NS3 (fig 1A). The interaction between the Sec7 domain of GBF1 and the protease domain of NS3 was observed with strains Con1, H77 and JFH-1 (data not shown), indicating a conservation of this interaction for the three strains tested, however with some difference concerning the strength of interaction.

To confirm this interaction, we used next a co-immunoprecipitation (co-IP) assay. An HA-tagged version of NS3-4A of JFH-1 strain was co-expressed with a FLAG-tagged version of YFP-GBF1 in HeLa cells and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. As a control, we used an HA-tagged version of human γ 1-COP, a COPI subunit previously shown to interact with GBF1 (36). In control conditions, a band of low intensity was observed with NS3, but not γ 1-COP, probably corresponding to non-specific binding of HA-NS3 to the beads. The intensity of the co-immunoprecipitated NS3 band was much stronger than the background observed in control condition (fig 1B). These results indicated that NS3, like the positive control γ 1-COP, interacted with GBF1 in this assay.

GBF1 localization is altered in cells overexpressing NS3-4A.

To assess the impact of NS3 on GBF1 intracellular localization, we made use of U-2 OS cells with an inducible expression of GFP (UGFP-9.22) (37), of NS3/4A (UNS3-4A-24) (38), of NS5A (UNS5Acon-6) (39) or of the entire HCV polyprotein (UHCV-11) (40). As expected in control non-induced cells, GBF1 had a Golgi-like localization and a less intense cytosolic localization (data not

shown). In induced cells, the distribution of GBF1 to the Golgi and cytosol appeared identical to control conditions in cells expressing GFP (data not shown), NS5A or the polyprotein (fig 2). In contrast, the Golgi-like localization of GBF1 was not observed in UNS3-4A-24 cells expressing NS3-4A (fig 2). Immunoblot analysis of GBF1 in UNS3-4A-24 cells revealed a similar level of expression of GBF1 in induced and non-induced conditions (data not shown), indicating that the loss of the Golgi localization did not result from GBF1 degradation, but rather from a change of intracellular localization induced by NS3-4A expression.

Next, we analyzed the intracellular localization of GBF1 and NS3 in cells treated with GBF1 inhibitors BFA or GCA. These inhibitors of GBF1 activity disrupt Golgi structure, causing fusion of the Golgi with the ER (41). In addition, BFA treatment stabilizes GBF1 association with membranes (42). In UNS3-4A-24 cells treated with BFA or GCA, the localization pattern of GBF1 was strikingly different than that of untreated cells. GBF1 was no longer only diffusely distributed throughout the cytoplasm as in uninduced UNS3-4A-24 cells, but rather was found additionally in structures in which it co-localized with NS3 (fig 3). GBF1 was localized to structures, likely corresponding to the ER-Golgi fused compartment, in cells expressing GFP (data not shown) or NS5A (fig 3). In BFA-treated UHCV-11 cells, a mixed pattern of association to ER-Golgi membranes and to NS3-positive structures was observed.

NS3-4A causes alterations in Golgi structure.

To better characterize the compartment where GBF1 and NS3 colocalize, we also analyzed the localization of other Golgi-associated proteins. First, we analyzed the localization of GM130, a cis-Golgi marker. With anti-NS3 and anti-GM130 antibodies we had available, it was not possible to perform a direct double labeling. Instead, we performed a double labeling of GM130 and GBF1. In induced UNS3-4A-24 cells showing an alteration of GBF1 localization resulting from NS3 expression (indicated with a white star in figure 4), the GM130 labeling pattern was altered compared to that observed in control cells with no NS3 expression. This result is consistent with previous reports showing that Golgi morphology undergoes changes upon HCV infection (43-45). Here we show that expression of NS3-4A alone induces changes in Golgi morphology. Interestingly, in BFA-treated, induced UNS3-4A-24 cells showing perinuclear structures strongly labeled with both NS3 and GBF1 (labeled with white stars in figure 4), GM130 partially colocalized with GBF1. Moreover, the GM130 staining pattern was not dispersed by BFA treatment in these cells, in contrast to what was observed in control cells with no NS3-4A expression. Since BFA causes fusion of the Golgi with the ER, and NS3-4A expression leads to formation of structures derived from the ER, these results are consistent with BFA causing a fusion of the altered Golgi in NS3-4A expressing cells with the NS3-4A ER-derived compartment.

Next we analyzed the localization of Rab1a, Rab1b (which are localized in the cis-Golgi and ERGIC) and Rab6 (which is localized in the trans-Golgi and the TGN). As expected, in non-induced conditions, the intracellular distribution of Rab1a, Rab1b and Rab6 was perinuclear in the

absence of BFA, and treatment with BFA caused a change to a more scattered distribution of Rab1a and Rab1b (data not shown). When NS3-4A expression was induced in UNS3-4A-24 cells, the intracellular distribution of Rab1b was very similar to its distribution in non-induced cells, in the absence or the presence of BFA, except for very few cells showing a colocalization of Rab1b and NS3 (data not shown). The intracellular distribution of Rab6 was also unchanged after induction, and no colocalization with NS3 was observed (data not shown). In contrast, the intracellular distribution of Rab1a was clearly altered in the majority of UNS3-4A-24 cells expressing NS3-4A, and a colocalization of both proteins was observed (fig 5). Rab1a localization was also analyzed in UHCV-11 cells, which express HCV polyprotein. In these cells, the intracellular distribution of Rab1a was not altered in cells expressing HCV proteins (including NS3), and expression of HCV proteins did not affect the dispersion of the Rab1a compartment in the presence of BFA (fig 5). However, in contrast to expression of NS3-4A alone, BFA did not result in colocalization of NS3 and Rab1a (fig 5b).

Altogether, these data indicate that NS3 interacts with GBF1, and that the two proteins colocalize upon expression of NS3-4A in a compartment that also contains Rab1a, an ERES-ERGIC resident protein. Upon BFA treatment, the morphology of this compartment is altered, and in addition to NS3-4A, GBF1 and Rab1a, it also contains the Golgi marker GM130.

GBF1 interacts with NS3 in cells replicating HCV.

Our data presented above indicated that NS3 interacts with GBF1, when expressed with NS4A. However, this interaction appeared to be reduced when NS3 was expressed as a part of the HCV polyprotein. To assess if NS3 interacts with GBF1 in HCV-replicating cells, we performed a proximity-ligation assay in Huh-7 cells containing a sub-genomic replicon using antibodies to NS3 and to GBF1. As a control, we also used naïve Huh-7 cells. In naïve cells, only very few fluorescent dots were observed, indicating that the antibodies yield a very low background when one interacting protein is absent (fig 6A). In replicon-containing cells, higher numbers of dots were observed. A signal to background ratio superior to 10 was calculated after quantification (fig 6B), indicating that a significant interaction occurred between NS3 and endogenous GBF1 in cells replicating HCV.

Isolation and characterization of NS3 mutants with reduced interaction to GBF1.

To better characterize the interaction between NS3 and GBF1, we used a yeast two-hybrid-based approach to isolate mutants of the protease domain of NS3 with a reduced interaction with the Sec7 domain of GBF1. Mutations were introduced into NS3 by PCR-based random mutagenesis and mutants were screened by reverse two-hybrid to isolate yeast clones growing in non-selective medium, but not in selective medium requiring expression of the reporter gene for the yeast two-hybrid interaction. Out of 148 clones screened, 95 were selected with the reverse two-hybrid assay, 49 of which expressed an NS3 construct of expected size in western blot. The plasmids pGBKT7-NS3protease of these clones were isolated and sequenced. 18 clones had no

mutation, 25 had one mutation, 5 had two mutations and 1 clone had three mutations in the coding sequence of the NS3 protease domain. This led to the identification of 12 individual mutations, 4 double mutations and 1 triple mutation, which inhibit NS3 protease – GBF1 Sec7 domain interaction.

We then focused on individual mutations. Mutated plasmids were re-introduced into yeast cells to confirm their phenotype. As expected, all the mutants had a growth defect on selective medium (fig 7A). The localization of the mutated residues in the 3D structure of the protease domain of NS3 was analyzed. Three residues, Asn-77, Cys-97 and Ile-114, are exposed at the surface of the protein (fig 7B), with calculated exposure of 20%, 15% and 4%, respectively (the maximal exposure possible of a residue is approximately 63%). Structural changes resulting from mutations of surface residues could directly alter GBF1 interaction, whereas those involving buried residues may be transmitted to other parts of the protein and indirectly affect surface structure. Alternatively, mutation of internal residues may affect the folding of the domain and lead to a non-functional protein. Concerning surface-exposed residues, it is noteworthy that Cys-97 is implicated in Zn²⁺ coordination (46-48). Its mutation to Arg could lead to a loss of Zn²⁺ binding and to a major structural alteration of the protease domain. The two other residues, Asn-77 and Ile-114, are located on different faces of the domain (fig 7B). It is therefore unlikely that they could be part of a single interaction area.

Impact of NS3 mutations on viral replication.

To assess the impact on replication of the mutations identified in the yeast two-hybrid assay, we introduced them into a Con1 replicon containing a luciferase reporter (49). In vitro-transcribed replicon RNAs were electroporated into Huh-7.5 cells and replication was assessed by measuring luciferase activity over a 96-h time course. The kinetics of replication of 4 mutants (V36A, L44Q, V107A and I114T) were very similar to that of the WT replicon (fig 8A). The 8 other mutants behaved as the non-replicative Δ GDD control and were therefore non-replicative.

To test if the replicative mutants were affected in their interaction with GBF1, we analyzed their sensitivity to BFA. Replicon RNAs were electroporated into Huh-7.5 cells; electroporated cells were treated with BFA for 8 h and then cultured without BFA. The luciferase activity was measured at 48 h post-electroporation. The replication was inhibited by BFA in a dose-dependent manner (fig 8B). All mutants displayed a dose-response very similar to that of the WT replicon, indicating that no alteration of BFA sensitivity was introduced by any of the 4 mutations. As expected from these results, all four mutants interacted with GBF1 in the co-immunoprecipitation assay (data not shown). Taken together, these results suggest that no physical or functional alteration was provided by the mutations V36A, L44Q, V107A and I114T concerning NS3-GBF1 interaction in a replicative model.

Protease activity of NS3 mutants.

To assess the protease activity of the mutants, we used a GFP-IPS construct (50) as a substrate. In this construct, EGFP is fused to the C-terminal sequence of interferon- β promoter stimulator protein 1 (IPS-1), which contains an NS3-cleavage site. When co-expressed with NS3, a 41-residue C-terminal peptide was removed from the substrate. This proteolytic cleavage could be visualized by immunoblotting with an anti-GFP antibody (fig 9A). NS3 mutants were co-expressed with GFP-IPS in Huh-7 cells (fig 9B). For all replicative mutants, cleavage efficiency was very similar to that of the WT protease. Non-replicative mutants yielded 3 phenotypes. L82P, C97R, G141D and L143P appeared inactive, since no cleavage product was detected. For mutants L104P, L106S and I153T, a partial cleavage was observed, suggesting that their protease activity was reduced. Finally, the protease activity of mutant N77D was similar to that of WT and replicative mutants.

The expression levels of NS3 mutants were also monitored by immunoblotting (fig 9B). An expression similar to WT was observed for all replicative mutants and for the non-replicative, protease-active mutant N77D, a reduced expression was observed for mutants L104P, L106S and I153T, and no expression was observed for inactive mutants L82P, C97R, G141D and L143P. We reasoned that reduced expression levels probably resulted from instability of the mutated proteins. To confirm this hypothesis, we treated transfected Huh-7 cells with MG132, a proteasome inhibitor, in order to inhibit the degradation of unstable proteins. As shown in figure 9C, MG132 treatment revealed the presence of a band migrating slightly slower than mature NS3 in lysates of cells transfected with inactive or partially active mutants. This band most probably represents uncleaved NS3-4A. This result suggests that mutations L82P, C97R, L104P, L106S, G141D, L131P and I153T induced folding defects, which explain their reduced protease activity. Uncleaved NS3-4A was detected in much lower amounts with active proteases (WT, replicative mutants V36A, L44Q, V107A and I114T, and non-replicative mutant N77D), as expected for correctly folded proteins. It is noteworthy that the auto-proteolytic cleavage efficiency (fig 9C) of mutated proteins correlated with the observed substrate cleavage efficiency (fig 9B) of the series of NS3 mutants.

We repeated these experiments in HeLa cells, which yield a better expression of NS3. Again, mutants L82P, C97R, G141D and L143P were inactive for both GFP-IPS cleavage (fig 9D) and auto-proteolytic processing (fig 9E). Mutants L104P, L106S and I153T were partially active, and mutants V36A, L44Q, N77D, V107A and I114T appeared as active as the WT construct. The proteolytic cleavage of GFP-IPS in both cell lines was quantified (fig 9F). The results of this quantification showed a better proteolytic activity of partially active mutants in HeLa cells than in Huh-7 cells, in keeping with their better expression levels in this cell line.

All together, the data indicate that NS3 protease domain mutants isolated using the yeast reverse two-hybrid screen include a series of 4 mutants (V36A, L44Q, V107A and I114T), which are very similar to WT concerning replication efficiency and proteolytic activity, a series of 7

mutants with a reduced proteolytic activity (L82P, C97R, L104P, L106S, G141D, L143P and I153T), which are not replicative probably because of folding defects and/or reduced protease activity, and a mutant (N77D), which is not replicative despite a normal protease activity. The distinguishing features of the mutants are summarized in table 1.

The residue Ser77 of NS3 is important for JFH1 replication.

Next, we investigated the phenotype of a mutation equivalent to N77D in the JFH-1 strain, which is much more replicative than Con1 in Huh-7 cells. At position 77, a Ser residue replaces in JFH-1 the Asn residue that is present in Con1 and H77 strains. A mutation S77D was introduced into a luciferase-expressing JFH-1 replicon and a replication assay was performed. Like mutant N77D of the Con1 strain, mutant S77D of the JFH-1 strain was not replicative (fig 10A). We also assessed the protease activity of mutant S77D using the GFP-IPS construct, and observed no difference between WT and S77D cleavage efficiency (data not shown). These results indicated that the phenotypes of Con1 N77D and JFH-1 S77D mutants are similar.

To assess if mutation S77D alters interactions between NS3 and other viral proteins, we made use of the high replicative potential of the JFH-1 strain to try to obtain pseudo-revertant mutant viruses that would rescue the phenotype of the S77D mutation. The S77D mutation was inserted into the full-length JFH-1 genome, and in vitro transcribed RNA was introduced into Huh-7 cells by electroporation. As expected, we did not observe any HCV-positive cells at 3 days post-electroporation. However, after approximately 2 weeks of culture, a few positive cells began to appear and their number rose at each cell passage, indicating the presence of replicative viruses in the cell population. The experiment was done twice and each selection was done in duplicate. A similar kinetics of infectious virus generation was observed in each experiment. We sequenced the non-structural proteins coding region of the viral genome. In one experiment, we found a reversion to a Ser residue at position 77 of NS3, which is the residue present in strain JFH-1. In the second experiment, the Asp-77 residue was converted into an Asn residue, which is found at this position in other HCV strains. In this second experiment an additional mutation was found at position 221 of NS3, in the helicase domain, changing a Gln residue for a Leu residue. This Q221L mutation, which has been found previously in several studies (51-55), is a titer-enhancing mutation with no impact on replication. Therefore it does not represent a pseudo-revertant mutation that would reveal the presence of any potential interaction between protease and helicase domains of NS3. No other mutation was found in NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B coding sequences in both experiments. Thus, we obtained no evidence that the mutation S77D could disrupt any interaction between NS3 protease and other non-structural proteins of the viral replication complex.

Next we assessed the impact of the mutation S77D on the interaction between NS3 and GBF1 by co-immunoprecipitation. Surprisingly, mutated NS3 bound to GBF1 (fig 10B). S77D co-immunoprecipitation signal was similar or slightly better than WT. This could be explained by a

slightly better expression of the mutated protein. Next, we investigated the impact of BFA on GBF1-NS3 interaction. Whereas no BFA effect on co-immunoprecipitation was observed for WT, a ~50% decrease of the signal was observed for S77D (fig 10C), indicating that its interaction with GBF1 is more sensitive to BFA than that of the WT protein. This result suggests that the interaction between GBF1 and NS3 is altered by the mutation S77D.

DISCUSSION

In this study, we investigated GBF1 interactions with viral proteins during HCV infection. We found that GBF1 interacts with NS3. The GBF1-NS3 interaction was observed by yeast two-hybrid assay, by co-immunoprecipitation, and the interaction between endogenous GBF1 and NS3 was also observed by proximity-ligation assay in cells replicating HCV. Moreover, GBF1-NS3 interaction was also supported by the impact of NS3-4A expression on GBF1 intracellular localization and function. We found that NS3-4A expression caused an alteration in Golgi structure, a change that has been reported for expression of the entire HCV polyprotein (43-45). This change in Golgi morphology is due to the effects of HCV on GBF1 function (45). Importantly, we found that NS3-4A expression induced a change of GBF1 intracellular localization from Golgi membranes to NS3-positive structures and that this association with NS3-positive structures was insensitive to BFA, indicating that it was independent of Arf activation. All of these observations are consistent with the existence of a physical and functional interaction between NS3 and GBF1.

This interaction with NS3 is consistent with the crucial role of GBF1 at the onset of replication, since the protease NS3-4A mediates one of the earliest steps of HCV replication, the proteolytic processing of the polyprotein. Therefore NS3 is well placed to interact with host factors implicated at the onset of replication. GBF1-NS3 interaction appears to be reduced when other viral proteins are co-expressed, as suggested by experiments using inducible cells and by moderate signals obtained in proximity ligation assay with replicon-containing cells. GBF1 is not a component of HCV replication complexes and its inhibition has a limited impact on HCV replication once the replication is established (14). In contrast, its inhibition during early times of the replication period strongly inhibits HCV infection. This suggests that GBF1 fulfills an essential function during the onset of replication, which is not required later on during the HCV life cycle. For other viruses, a similar involvement of GBF1 early during replication has also been reported. Much like for HCV, BFA inhibits the replication of dengue virus and mouse hepatitis coronavirus (MHV) when the cells are treated just after virus entry, but the inhibition is less important when BFA is added later on (24, 25). During MHV infection, GBF1 transiently co-localizes with replication complexes early in infection (24). During poliovirus infection, GBF1 is also recruited early on at RNA replication sites. In this case, the colocalization is still visible at later time points (56).

HCV replication includes a latent period of 16-20 h in Huh-7 cells, during which viral protein synthesis occurs at levels that are undetectable by immunofluorescence. Kinetics experiments indicated that GBF1 function is crucial for HCV replication during this period. Therefore, it is not possible to experimentally verify if a transient recruitment of GBF1 to nascent replication complexes actually occurs when its function is essential for replication. Later during HCV infection, when replication complexes become detectable by immunofluorescence, no GBF1 recruitment was observed (14), consistent with the limited functional importance of GBF1 for HCV replication at this time. Therefore, we can only speculate that the NS3-GBF1 interaction participates in the function of GBF1 in HCV replication during the latent period. The precise function of this interaction is still elusive. Whether it is involved in locally activating GBF1, or in merely recruiting GBF1 or some of its effectors to specific intracellular locations must await further studies.

The interaction was mapped to the protease domain of NS3 and the Sec7 domain of GBF1. An Asn or Ser residue at position 77, located on the surface of the protease domain appears to be part of the interaction region. Its replacement by an Asp residue in Con1 and JFH-1 strains strongly inhibits replication without altering NS3 protease activity. Although we cannot exclude that this mutation could also disrupt interactions with other viral and/or host proteins, in addition to GBF1, the reduced interaction observed in yeast two-hybrid strongly suggests that the interaction of this mutant with GBF1 is indeed altered. The lack of pseudo-revertant virus isolation argues against mutation Asp77 disrupting interaction of NS3 with any other viral protein. Co-immunoprecipitation experiments did not allow us to obtain a clear confirmation of the reduction of interaction between mutated NS3 and GBF1, except when cells were pretreated with BFA. However, this technique might not be sensitive enough to detect limited reductions of interaction, such as the one suggested by results of yeast two-hybrid experiments for this mutant.

Interactions between GBF1 and viral proteins have been reported for other GBF1-dependent viruses. GBF1 interacts with non-structural protein NS5 of dengue virus, however the interaction domains were not mapped (25). GBF1 also interacts with non-structural protein 3A of two enteroviruses, poliovirus and coxsackievirus B3 (57). In contrast to HCV NS3, the interaction with 3A was not mapped to the Sec7 domain, but to the N-terminal part of GBF1, upstream of the Sec7 domain (58). The difference of interacting domains correlates with a difference of function of GBF1 during HCV and enterovirus replication. GBF1 function in poliovirus infection does not require the Sec7 domain and therefore does not depend on the ArfGEF activity of GBF1, but rather requires the N-terminus of GBF1 that interacts with poliovirus 3A (59). In contrast, HCV replication is not supported by the N-terminal region of GBF1 and requires its ArfGEF activity within the Sec7 domain. More precisely, GBF1 function during HCV infection is mediated by the pair of class II Arfs, Arf4 and Arf5, but not by Arf1 (33). Therefore, it is likely that GBF1 function during HCV replication involves the regulation of specific, not yet identified effectors of Arf4

and/or Arf5. We recently reported that class II Arfs are also important for other GBF1-dependent RNA viruses from different families, but not for the enterovirus coxsackievirus B4 (35), again emphasizing the difference of GBF1 function during enterovirus and HCV replication. Therefore, positive-sense single-stranded RNA viruses appear to have evolved different strategies for using different functions of GBF1. HCV and other viruses of the families *Flaviviridae* and possibly *Coronaviridae* would require the ArfGEF activity of GBF1 to activate class II Arfs, whereas enteroviruses appear to use an ArfGEF-independent function of GBF1. Interestingly, both of these functions are different from the well-documented function of GBF1 in the regulation of the early secretory pathway, which depends on its ArfGEF activity, but is mediated by another pair of Arfs, Arf1 and Arf4 (33, 34). The future identification of effectors of class II Arfs implicated in viral replication might open the way to defining novel mechanisms of action of GBF1. Their identification could also lead to developing new antiviral therapies.

MATERIALS AND METHODS

Reagents.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), goat and fetal calf sera (FCS) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Life Technologies. 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) was from MP Biomedicals. Protease inhibitors mix (Complete) was from Roche. Other chemicals were from Sigma-Aldrich.

Antibodies. Mouse anti-NS3 mAb 1848 was from Virostat. Mouse anti-NS5A mAb 9E10 was kindly provided by C.M. Rice, the Rockefeller University, NY, USA. Rabbit anti-GBF1 serum 9D4 was kindly provided by P. Melançon, University of Alberta, AB, Canada. Mouse anti-GM130 mAb and anti-GBF1 mAbs were from BD Biosciences. Rabbit anti-Rab1a (reference sc-311) was from Santa Cruz Biotechnologies. Mouse anti-GFP mAb and rat anti-HA mAb 3F10 were from Roche. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, and goat anti-rat IgG were from Jackson ImmunoResearch. Alexa 647-conjugated goat anti-mouse IgG and Alexa 555-conjugated goat anti rabbit IgG were from Molecular Probes.

DNA constructs.

HCV NS3 of strains H77 and Con1 (full-length proteins and protease and helicase domains) and HCV NS3 protease of strain JFH-1 were cloned into pGBKT7 using *NdeI* and *BamHI* sites. HCV NS3 of strain JFH-1 was cloned into pGBKT7 using *EcoRI* and *BamHI* sites. HCV NS3 helicase of strain JFH-1 was cloned into pGBKT7 using *NcoI* and *BamHI* sites.

Plasmids for cell culture-adapted Con1 replicon named pFK-rep-PI-luc/ET (originally designated pFK-nt341-sp-PI-lucEI3420-9605/5.1) and the corresponding GDD mutant (49) were kindly provided by Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany). V36A, L44Q, N77D, L82P, C97R, L104P, L106S, V107A and I114T mutations were inserted by transferring the *HindIII-MreI* from the corresponding pGBKT7 plasmids into pFKi-rep-PI-Luc/ET plasmid. Mutations

G141D, L143P and I153T were inserted by site directed mutagenesis. All mutagenized fragments were verified by sequencing. The JFH-1 construct used for the replication assay (HCVcc-Rluc/ Δ E1E2) was as previously described (14). The mutation S77D was introduced by PCR-based site-directed mutagenesis.

pEYFP-GBF1 was described previously (42). To construct pEYFP-GBF1-FLAG used in co-immunoprecipitation experiments, the coding sequence of a FLAG tag was inserted between the last codon of GBF1 and the stop codon. To generate expression plasmids for HA-tagged NS3-4A of the Con1 strain, the coding sequence of the protease domain was amplified from pGBKT7 plasmids using primers 5'-CTAGAGGATCCATGGCGCCTATTACGGCCTAC-3' and 5'-GAAGACCGGTGACCGCATAG-3'. The coding sequence of NS3 helicase domain and NS4A was amplified from pFK-rep-PI-luc/ET using primers 5'-CTATGCGGTCACCGGTCTTC-3' and 5'-CGACGAATTCTTAGCACTCTCCATCTCATCGA-3'. Both PCR products were fused using external primers and inserted into pcDNA3.1-HA using *Bam*HI and *Eco*RI sites. The HA-tagged γ 1-COP construct was previously described (36).

To expression plasmid used to express the NS3 substrate GFP-IPS was generated in two steps. First, oligonucleotides 5'-AGCTTCACCAAAAAAAAAAGAAAAGTAGGAGG-3' and 5'-GATCCCTCCTACTTTTCTTTTTTTTTTTGGTGA-3' were phosphorylated, annealed and ligated into *Hind*III- and *Bam*HI-restricted pEGFP-C1 to generate pEGFP-NLS. Next, the coding sequence of IPS C-term was amplified by PCR with oligonucleotides 5'-AGTTATCTAGACTAGTGCAGACGCCCGGTACA-3' and 5'-TCCGAGGGCACCTTTGGGAT-3'. The PCR product was inserted into the *Bam*HI-*Xba*I sites of pEGFP-NLS.

Yeast two-hybrid.

Yeast two-hybrid analysis was performed in *Saccharomyces cerevisiae* strain AH109 (Clontech). Coding sequences for GBF1, BIG1 and BIG2 full-length proteins or domains were cloned into pGADT7, creating Gal4 activation domain fusion proteins. pGBKT7 plasmids carrying HCV genes, to produce Gal4 DNA binding domain fusion proteins, were a kind gift of Hyo-Young Chung and Charles Rice (Rockefeller University, New York, USA). These pGBKT7 plasmids contained each viral protein cloned from a Jc1 HCV genome that is a fusion of J6 and JFH-1 HCV genomes. The junction point of this J6-JFH-1 hybrid viral sequence is located in NS2. Thus the each sequence is as follows: J6-Core, E1, E2 & p7, Jc1-NS2 and JFH-1-NS3, NS4A, NS4B, NS5A & NS5B. HCV NS3 protease or helicase domain coding sequences were also cloned into pGBKT7 (this study). pGADT7 and pGBKT7 fusion constructs were transformed into yeast by the lithium acetate method using carrier DNA and plated on non-selective plates (lacking leucine and tryptophan) to select for the two yeast two-hybrid plasmids. After growth, the colonies were transferred to selective plates (lacking histidine) to assay expression of the reporter HIS3 gene, which only occurs if the fusion proteins interact.

Random mutagenesis, reverse two-hybrid assay and plasmid rescue.

Mutagenic PCR was performed with 0.5 µl of pGBKT7-protease (strain Con1) plasmid using 0.5 µl of *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs) in a 50-µl reaction mixture containing 200 nM of primer 5'-GGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTG-3', 200 nM of primer 5'-CCGGTAGAGGTGTGGTCAATAAGAGCGACCTCATGC-3', and 200 µM of each dNTP. Samples were placed at 95°C for 5 min, then with cycling parameters set to 95°C for 30 s, 65°C for 2.5 min and 72°C for 2 min, for 30 cycles and finally at 72°C for 5 min. In parallel, gapped plasmid was produced by enzymatic restriction of pGBKT7-protease (Con1 strain) plasmid using *NdeI* and *BamHI* sites. Both mutagenic PCR product and gapped plasmid were gel purified using QIA quick Gel Extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. They were transformed into AH109 yeast by the lithium acetate method using carrier DNA and plated on non-selective plates lacking tryptophan. After growth, transformants were pooled, transformed with pGADT7-Sec7GBF1 and plated on selective plates lacking leucine and tryptophan to select for the presence of the two plasmids. After growth, the colonies were transferred to His3 reporter expression selective plates (lacking histidine). Plasmids were rescued from yeast using NucleoSpin Plasmid Miniprep kit (Macherey-Nagel). Yeast cells resuspended in buffer A1 were disrupted by agitation with glass beads. Glass beads were removed by centrifugation. Lysis and plasmid isolation were performed according to the manufacturer's protocol. Plasmids were subsequently transformed into bacteria and purified using NucleoSpin Plasmid Miniprep kit according to the manufacturer's protocol.

Cell culture.

Huh-7 cells (60) and Huh-7.5 cells (61) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high glucose modification, supplemented with glutamax-I and 10% FCS. UNS3-4A-24 (38), UNS5Acon-6 (39) and UHCV-11 (40) cells were kindly provided by D. Moradpour (University of Lausanne, Switzerland). They were grown in DMEM supplemented with 10% FCS, 1 µg/ml puromycin (Gibco), 0.4 mg/ml G418 (PAA), and 1 µg/ml tetracycline (Sigma-Aldrich). HeLa cells were provided by B. Goud (Institut Curie, Paris, France). They were grown in minimal Eagle's medium alpha supplemented with glutamax-I and 10% FCS. All cell lines were grown at 37°C with 5% CO₂.

UNS3-4A-24, UNS5Acon6 and UHCV-11 cells induction.

One day before induction, cells were plated on glass coverslips in a medium containing 0.1 µg/ml tetracycline. For induction, cells were rinsed three times with PBS, to remove tetracycline, and cultured for 24-h in tetracycline-free medium. Control non-induced cells were cultured for 24 h in the presence of 1 µg/ml tetracycline.

Immunofluorescence microscopy.

For immunofluorescence microscopy, cells were grown on glass coverslips and fixed with 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) for 5 min on ice followed by 20 min at room temperature. All

subsequent steps were realized at room temperature. Cells were permeabilized by a 1-hour incubation in blocking buffer [2% BSA, 0.5% saponin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in PBS]. Both primary and secondary antibody incubations were carried out in blocking buffer, for respectively 1 hour and 45 min. Nuclei were stained by a 5-min incubation in PBS containing 1 µg/ml DAPI. Coverslips were mounted on glass slides using Prolong Antifade Gold (Invitrogen), sealed and stored at 4°C. Images were acquired using an inverted laser scanning confocal microscope (TCS SP5 AOBS Tandem, Leica). Signals were sequentially collected by using single fluorescence excitation and acquisition settings to avoid crossover. Images were assembled by using Image J software.

Replication assay.

Huh-7.5 cells were electroporated with HCVcc-Rluc/ Δ E1E2 or rep-PI-luc/ET in vitro transcribed RNA and seeded in 24-well plates. The luciferase activity was measured 2 h (Con1) or 4 h (JFH-1), 24 h, 48 h, 72 h and 96 h post-electroporation using the *Renilla* luciferase assay system kit from Promega.

NS3-4A protease assay.

Twenty-four hours before transfection, HeLa or Huh-7 cells were seeded in 24-well clusters to reach ~70% confluence the next day. Cells were co-transfected with 125 ng of pcDNA3.1 HA-NS3-4A and 125 ng of pEGFP-IPS mixed with Trans-IT LT1 reagent following the instructions of the manufacturer (Mirus). At 24 h post-transfection, EGFP-IPS and NS3 expression were monitored by immunoblotting using anti-GFP and anti-HA antibodies, respectively.

Immunoblotting.

Cells were rinsed 3 times with cold PBS, and lysed at 4°C for 20 min in a buffer containing 50 mM TrisCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton- X, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, and a mix of protease inhibitors (Complete). Insoluble material was removed by centrifugation at 4°C. The protein content was determined by the bicinchoninic acid method as recommended by the manufacturer (Sigma), using bovine serum albumin as the standard. The proteins were then resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham) using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). Proteins of interest were revealed with specific primary antibodies, followed by species-specific secondary antibodies conjugated to peroxidase. Proteins were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL Plus, GE healthcare). The signals were recorded using a LAS 3000 apparatus (Fujifilm). Quantification of unsaturated signals was carried out using the gel quantification function of ImageJ.

Co-immunoprecipitation.

HeLa cells were seeded in 6-well clusters the day before transfection, and were co-transfected with 750 ng of pcDNA3.1 HA-NS3-4A and 750 ng of pEYFP-GBF1 or pEYFP-GBF1-FLAG using the Trans-IT LT1 reagent as recommended by the manufacturer (Mirus). At 40 h post-

transfection, cells were rinsed 3 times with cold PBS, and lysed in 400 µl of a solution containing 50 mM TrisCl pH7.4, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 and protease inhibitors at 4°C. Insoluble material was removed by centrifugation at 4°C. 20 µl of lysate was removed for immunoblot analysis. Lysates were rotated at 4°C for 4 h with 30 µl of anti-FLAG M2 Affinity Agarose Gel (from Sigma Aldrich), previously rinsed twice with 1 ml of lysis solution. Beads were washed 3 times with the lysis solution and immunoprecipitated material was eluted by incubating the beads with 30 µl of SDS-PAGE loading buffer at 70°C for 10-15 min. Proteins of lysates and immunoprecipitations were quantified by immunoblotting using anti-GFP (GBF1) and anti-HA (NS3) antibodies.

Proximity ligation assay.

Naïve and replicon (JFH-1)-containing Huh-7 cells cultured on glass coverslips were fixed with 3% PFA for 20 min, rinsed with PBS, and permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 5 min. Proximity-ligation assay was performed using Duolink® in situ detection kit DUO92007 (Sigma), as recommended by the manufacturer, with mouse anti-NS3 mAb 486D39 (provided by JF Delagneau, BioRad) and rabbit anti-GBF1 affinity-purified antiserum (Abcam reference ab86701), both diluted to 1:100. Images were acquired using a laser-scanning confocal microscope (Zeiss LSM880) using a 63X oil immersion objective with a 1.4 numerical aperture. For each field, a stack of images corresponding to the total volume of the cells was acquired. Maximum-intensity projection images were generated using the Zen software. Representative images were assembled and dots were counted using the ImageJ software.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank C. M. Rice, P. Melançon, R. Bartenschlager, D. Moradpour and J.-F. Delagneau for kindly providing us with invaluable reagents, F. Penin for help with the localisation of mutated residues in the structure of NS3 protease domain, and S. Belouzard for the GFP-IPS construct. We thank M.-P. Golinelli, C. Guyot, M. Le Provost and A. Yu for excellent technical assistance and S Ung for help in assembling figures.

This work was supported in part by the French 'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales' (ANRS). LG was supported by a post-doctoral fellowship from ANRS.

REFERENCES

1. **Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D.** 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**:5487–5492.
2. **Ferraris P, Blanchard E, Roingard P.** 2010. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology* **91**:2230–2237.
3. **Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* **8**:e1003056.
4. **Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K.** 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**:5974–5984.
5. **Gao L, Aizaki H, He J-W, Lai MMC.** 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.
6. **Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet M-S, Longerich T, Diehl S, Ramirez F, Balla T, Rohr K, Kaul A, Bühler 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.
7. **Tai AW, Salloum S.** 2011. The role of the phosphatidylinositol 4-kinase PI4KA in hepatitis C virus-induced host membrane rearrangement. *PLoS ONE* **6**:e26300.
8. **Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G.** 2011. Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication. *J Virol* **85**:8870–8883.
9. **Bianco A, Reghellin V, Donnici L, Fenu S, Alvarez R, Baruffa C, Peri F, Pagani M, Abrignani S, Neddermann P, De Francesco R.** 2012. Metabolism of Phosphatidylinositol 4-Kinase III α -Dependent PI4P Is Subverted by HCV and Is Targeted by a 4-Anilino Quinazoline with Antiviral Activity. *PLoS Pathog* **8**:e1002576.
10. **Reiss S, Harak C, Romero-Brey I, Radujkovic D, Klein R, Ruggieri A, Rebhan I, Bartenschlager R, Lohmann V.** 2013. The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A. *PLoS Pathog* **9**:e1003359.
11. **Stone M, Jia S, Heo WD, Meyer T, Konan KV.** 2007. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* **81**:4551–4563.

12. Wang H, Perry JW, Lauring AS, Neddermann P, De Francesco R, Tai AW. 2014. Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* **146**:1373–85.e1–11.
13. Khan I, Katikaneni DS, Han Q, Sanchez-Felipe L, Hanada K, Ambrose RL, Mackenzie JM, Konan KV. 2014. Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and FAPP2 protein. *J Virol*.
14. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingeard P, Descamps V, Duverlie G, Ciczora Y, Wychowski C, Dubuisson J, Rouillé Y. 2010. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **84**:773–787.
15. Claude A, Zhao BP, Kuziemsky CE, Dahan S, Berger SJ, Yan JP, Arnold AD, Sullivan EM, Melançon P. 1999. GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol* **146**:71–84.
16. Donaldson JG, Jackson CL. 2011. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**:362–375.
17. Wright J, Kahn RA, Sztul E. 2014. Regulating the large Sec7 ARF guanine nucleotide exchange factors: the when, where and how of activation. *Cell Mol Life Sci* **71**:3419–3438.
18. Bui QT, Golinelli-Cohen M-P, Jackson CL. 2009. Large Arf1 guanine nucleotide exchange factors: evolution, domain structure, and roles in membrane trafficking and human disease. *Mol Genet Genomics* **282**:329–350.
19. Szul T, Grabski R, Lyons S, Morohashi Y, Shestopal S, Lowe M, Sztul E. 2007. Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J Cell Sci* **120**:3929–3940.
20. Bouvet S, Golinelli-Cohen M-P, Contremoulins V, Jackson CL. 2013. Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes. *J Cell Sci* **126**:4794–4805.
21. Belov GA, Feng Q, Nikovics K, Jackson CL, Ehrenfeld E. 2008. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* **4**:e1000216.
22. Lanke KHW, van der Schaar HM, Belov GA, Feng Q, Duijsings D, Jackson CL, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJM. 2009. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol* **83**:11940–11949.
23. Wang J, Du J, Jin Q. 2014. Class I ADP-Ribosylation Factors Are Involved in Enterovirus 71 Replication. *PLoS ONE* **9**:e99768.
24. Verheije MH, Raaben M, Mari M, Lintelo te EG, Reggiori F, van Kuppeveld FJM, Rottier PJM, de Haan CAM. 2008. Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathog* **4**:e1000088.
25. Carpp LN, Rogers RS, Moritz RL, Aitchison JD. 2014. Quantitative proteomic analysis of host-virus interactions reveals a role for Golgi brefeldin A resistance factor 1 (GBF1) in dengue infection. *Mol Cell Proteomics* **13**:2836–2854.

26. Farhat R, Ankavay M, Lebsir N, Gouttenoire J, Jackson CL, Wychowski C, Moradpour D, Dubuisson J, Rouillé Y, Cocquerel L. 2018. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cell Microbiol* **20**.

27. Zhang L, Hong Z, Lin W, Shao R-X, Goto K, Hsu VW, Chung RT. 2012. ARF1 and GBF1 Generate a PI4P-Enriched Environment Supportive of Hepatitis C Virus Replication. *PLoS ONE* **7**:e32135.

28. Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim S-S, Sakamoto N, Xavier RJ, Chung RT. 2009. A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication. *Cell Host Microbe* **5**:298–307.

29. Vaillancourt FH, Pilote L, Cartier M, Lippens J, Liuzzi M, Bethell RC, Cordingley MG, Kukolj G. 2009. Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* **387**:5–10.

30. Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE, Jordan TX, Mateu G, Grakoui A, Randall G. 2009. Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:7577–7582.

31. Borawski J, Troke P, Puyang X, Gibaja V, Zhao S, Mickanin C, Leighton-Davies J, Wilson CJ, Myer V, Cornellataracido I, Baryza J, Tallarico J, Joberty G, Bantscheff M, Schirle M, Bouwmeester T, Mathy JE, Lin K, Compton T, Labow M, Wiedmann B, Gaither LA. 2009. Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* **83**:10058–10074.

32. Trotard M, Lepère-Douard C, Régeard M, Piquet-Pellorce C, Lavillette D, Cosset F-L, Gripon P, Le Seyec J. 2009. Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *The FASEB Journal* **23**:3780–3789.

33. Farhat R, Séron K, Ferlin J, Fénéant L, Belouzard S, Goueslain L, Jackson CL, Dubuisson J, Rouillé Y. 2016. Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cell Microbiol* **18**:1121–1133.

34. Volpicelli-Daley LA, Li Y, Zhang C-J, Kahn RA. 2005. Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* **16**:4495–4508.

35. Ferlin J, Farhat R, Belouzard S, Cocquerel L, Bertin A, Hober D, Dubuisson J, Rouillé Y. 2018. Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *Journal of General Virology*.

36. Deng Y, Golinelli-Cohen M-P, Smirnova E, Jackson CL. 2009. A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor. *EMBO Rep* **10**:58–64.

37. Schmidt-Mende J, Bieck E, Hügle T, Penin F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **276**:44052–44063.

38. **Wolk B, Sansonno D, Kräusslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D.** 2000. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* **74**:2293–2304.
39. **Brass V, Bieck E, Montserret R, Wölk B, Hellings JA, Blum HE, Penin F, Moradpour D.** 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **277**:8130–8139.
40. **Moradpour D, Kary P, Rice CM, Blum HE.** 1998. Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins. *Hepatology* **28**:192–201.
41. **Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J.** 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**:1071–1080.
42. **Niu T-K, Pfeifer AC, Lippincott-Schwartz J, Jackson CL.** 2005. Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell* **16**:1213–1222.
43. **Jones DM, Atoom AM, Zhang X, Kottlilil S, Russell RS.** 2011. A genetic interaction between the core and NS3 proteins of hepatitis C virus is essential for production of infectious virus. *J Virol* **85**:12351–12361.
44. **Bishé B, Syed GH, Field SJ, Siddiqui A.** 2012. Role of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) and its binding protein GOLPH3 in hepatitis C virus secretion. *Journal of Biological Chemistry* **287**:27637–27647.
45. **Hansen MD, Johnsen IB, Stiberg KA, Sherstova T, Wakita T, Richard GM, Kandasamy RK, Meurs EF, Anthonsen MW.** 2017. Hepatitis C virus triggers Golgi fragmentation and autophagy through the immunity-related GTPase M. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**:E3462–E3471.
46. **Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, Adachi T, Hostomska Z.** 1996. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* **87**:331–342.
47. **Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA.** 1996. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* **87**:343–355.
48. **Stempniak M, Hostomska Z, Nodes BR, Hostomsky Z.** 1997. The NS3 proteinase domain of hepatitis C virus is a zinc-containing enzyme. *J Virol* **71**:2881–2886.
49. **Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R.** 2003. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* **77**:3007–3019.
50. **Jones CT, Catanese MT, Law LMJ, Khetani SR, Syder AJ, Ploss A, Oh TS, Schoggins JW, Macdonald MR, Bhatia SN, Rice CM.** 2010. Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat Biotechnol* **28**:167–171.

51. **Yi M, Ma Y, Yates J, Lemon SM.** 2007. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol* **81**:629–638.
52. **Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M.** 2008. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* **82**:7624–7639.
53. **Phan T, Beran RKF, Peters C, Lorenz IC, Lindenbach BD.** 2009. Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* **83**:8379–8395.
54. **Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD.** 2011. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog* **7**:e1002302.
55. **Chatel-Chaix L, Germain M-A, Motorina A, Bonneil É, Thibault P, Baril M, Lamarre D.** 2013. A host YB-1 ribonucleoprotein complex is hijacked by hepatitis C virus for the control of NS3-dependent particle production. *J Virol* **87**:11704–11720.
56. **Richards AL, Soares-Martins JAP, Riddell GT, Jackson WT.** 2014. Generation of unique poliovirus RNA replication organelles. *MBio* **5**:e00833–13.
57. **Wessels E, Duijsings D, Niu T-K, Neumann S, Oorschot VM, de Lange F, Lanke KHW, Klumperman J, Henke A, Jackson CL, Melchers WJG, van Kuppeveld FJM.** 2006. A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev Cell* **11**:191–201.
58. **Wessels E, Duijsings D, Lanke KHW, Melchers WJG, Jackson CL, van Kuppeveld FJM.** 2007. Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *J Virol* **81**:5238–5245.
59. **Belov GA, Kovtunovych G, Jackson CL, Ehrenfeld E.** 2010. Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell Microbiol* **12**:1463–1479.
60. **Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J.** 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**:3858–3863.
61. **Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk 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.

FIGURES

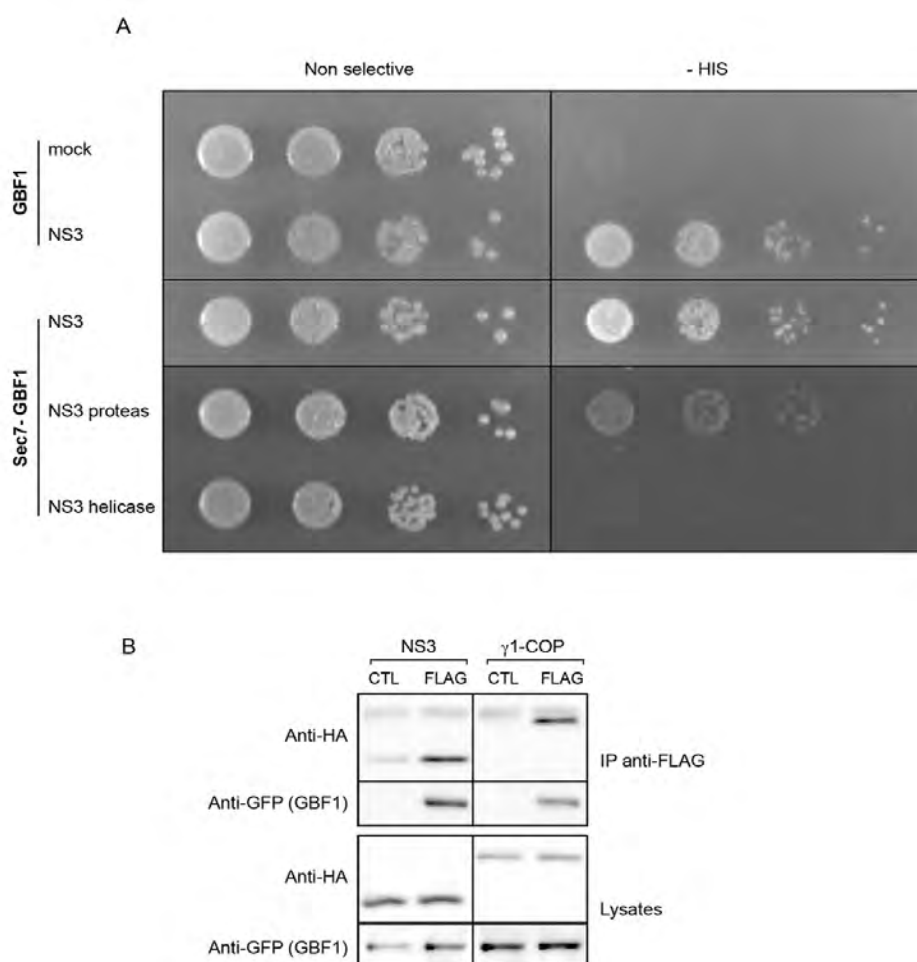


Figure 1. NS3 interacts with GBF1. (A) pGBKT7 plasmids carrying full-length NS3 or the indicated fragments from the Con1 strain, or pGBKT7 alone (mock) were co-transformed into yeast strain AH109 with the pGADT7 plasmids carrying full-length GBF1 (GBF1) or the catalytic Sec7 domain as indicated. Transformants were plated onto non-selective medium for expression of the reporter His3 (left panel), or on plates lacking histidine to monitor reporter expression (right panel). 10-fold serial dilutions of each culture were spotted from left to right for each transformed strain. (B) HA-tagged NS3-4A of JFH-1 or HA-tagged γ 1-COP were co-expressed with YFP-GBF1 (CTL) or YFP-GBF1-FLAG (FLAG) in HeLa cells. Cells were lysed and lysates precipitated with anti-FLAG beads. Immunoprecipitated material and 5% of lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA and anti-GFP antibodies.

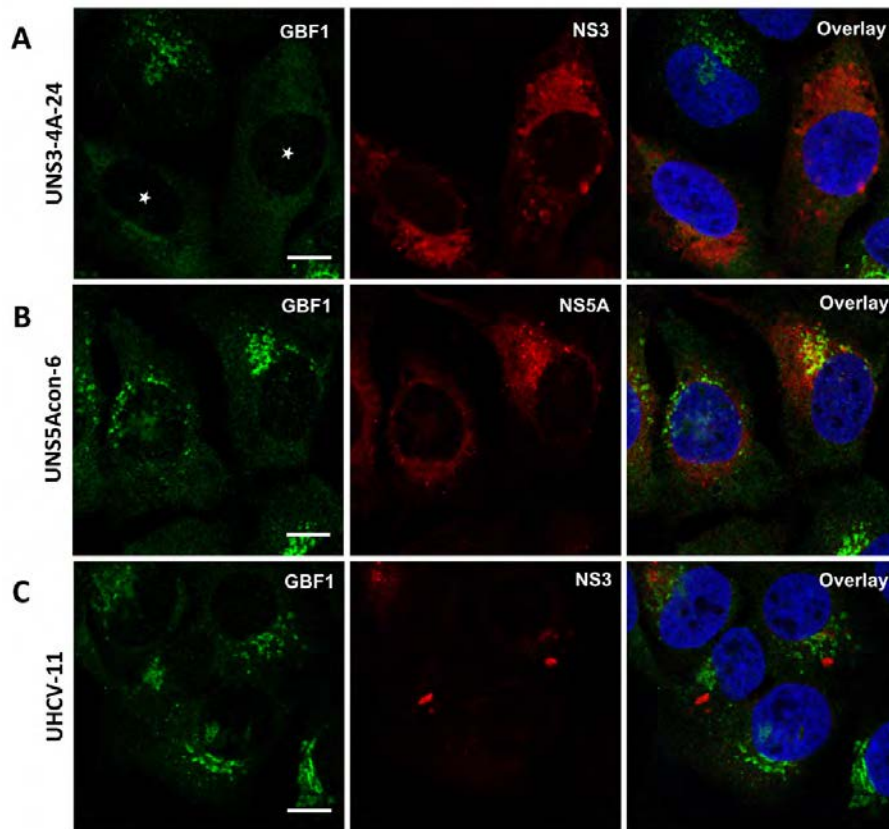


Figure 2. GBF1 localization is altered in cells expressing HCV NS3-4A. UNS3-4A-24 (A), UNS5Acon-6 (B) and UHCV-11 (C) cells were induced for 24 h and processed for immunofluorescence detection of GBF1 (green) and NS3 or NS5A (red), as indicated. White stars indicate cells expressing NS3. Bars, 10 μ m

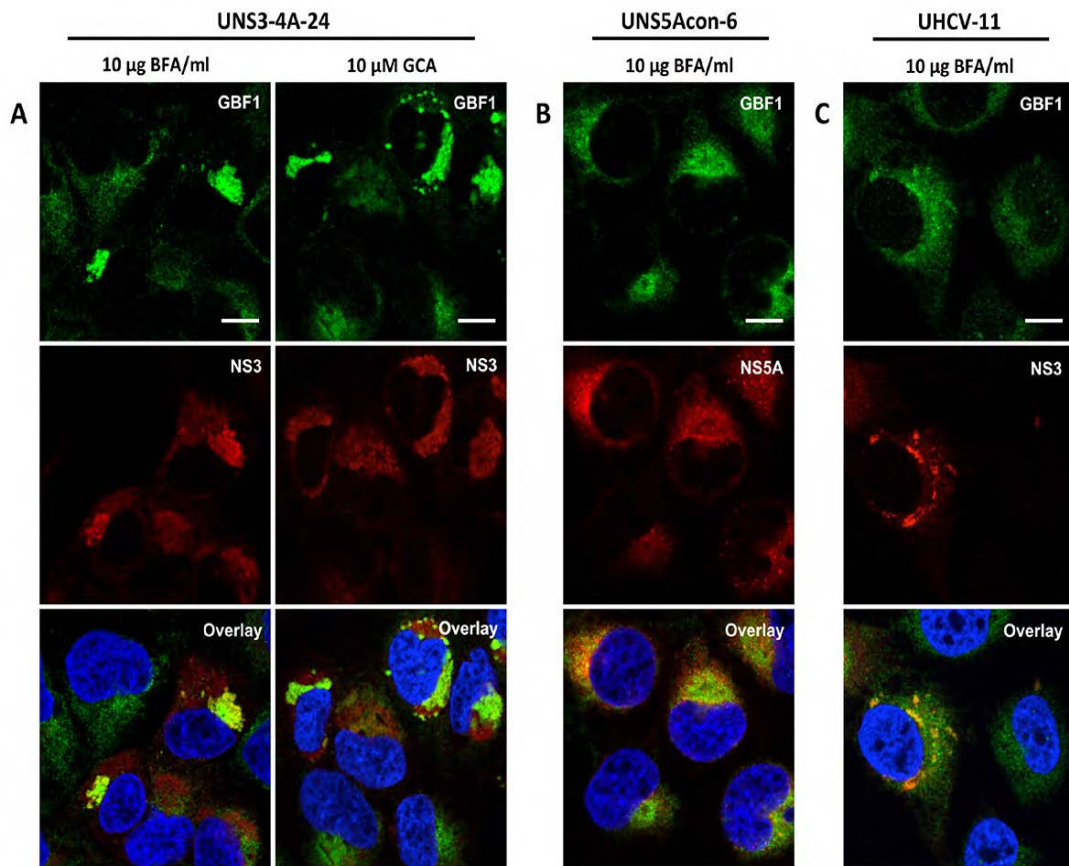


Figure 3. GBF1 colocalizes with HCV NS3 in cells treated with BFA or GCA. UNS3-4A-24 (A), UNS5Acon-6 (B) and UHCV-11 (C) cells were induced for 24 h, treated with BFA or GCA for 30 min, and processed for immunofluorescence detection of GBF1 (green) and NS3 or NS5A (red), as indicated. Bars, 10 µm

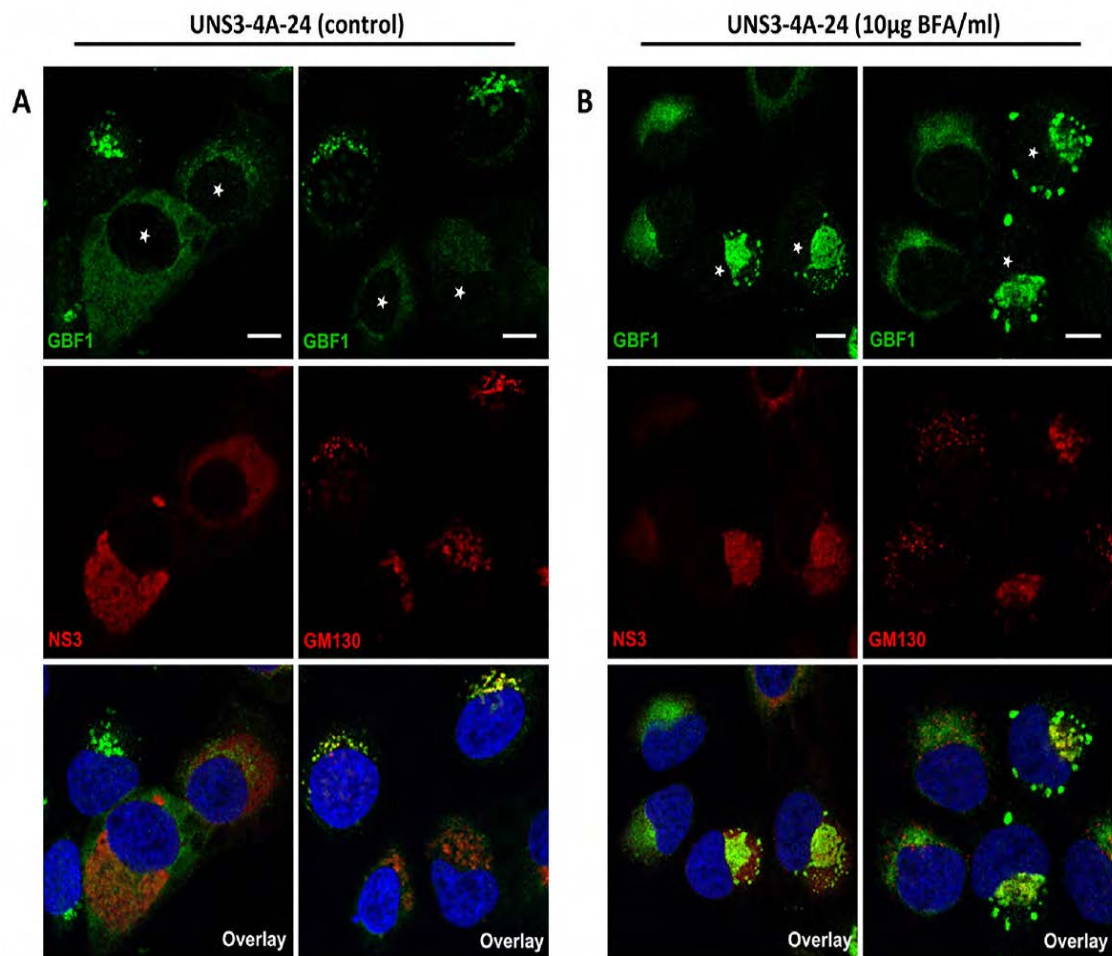


Figure 4. GBF1 and GM130 localization in cells expressing HCV NS3-4A. UNS3-4A-24 cells were induced for 24 h, treated with (A) DMSO (control) or (B) 10 µg/ml BFA for 30 min, and processed for immunofluorescence detection of GBF1 (green) and NS3 or GM130 (red), as indicated. White stars indicate cells expressing NS3. Bars, 10 µm

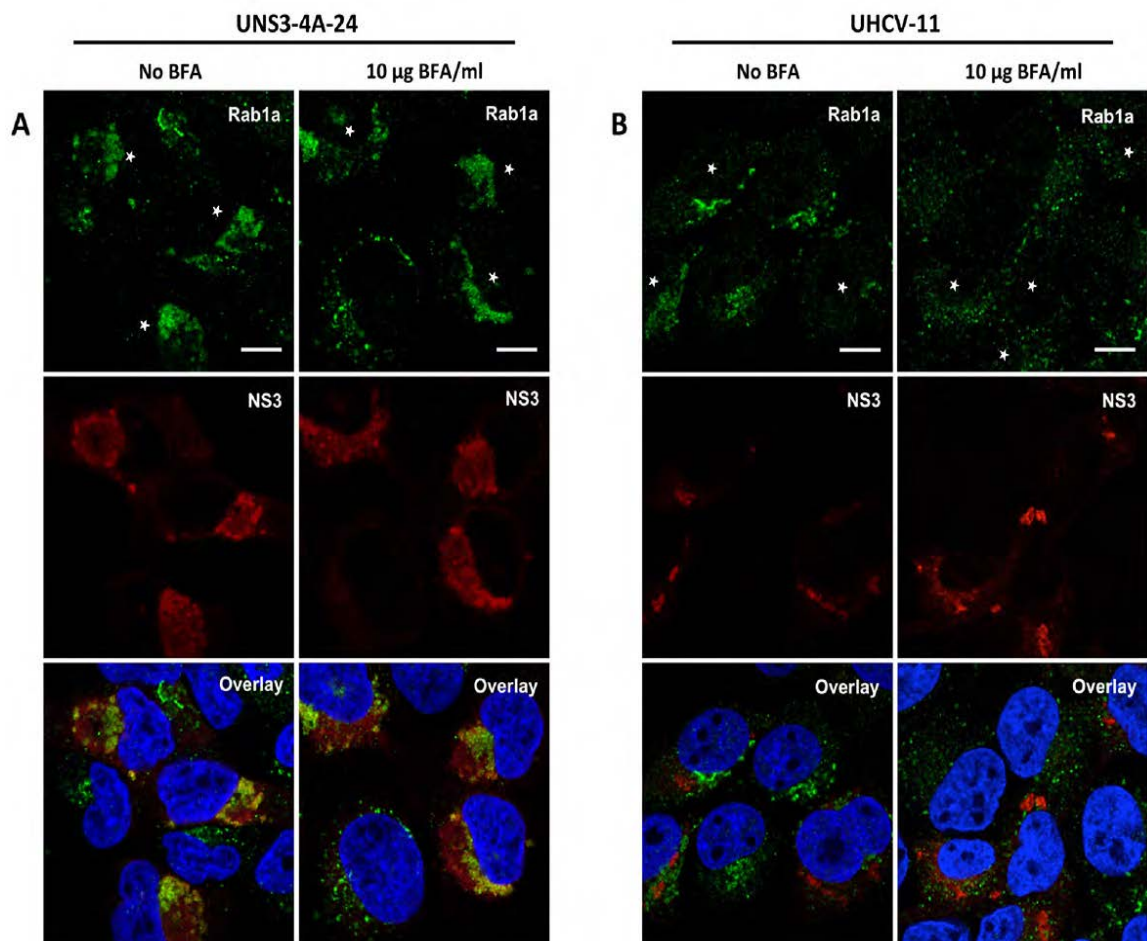


Figure 5. Localization of Rab1a in cells expressing NS3. UNS3-4A-24 (A) and UHCV-11 (B) cells were induced for 24 h, treated for 30 min with BFA 10 µg/ml, or left untreated, and processed for immunofluorescence detection of Rab1a (green) and NS3 (red), as indicated. White stars indicate cells expressing NS3. Bars, 10 µm

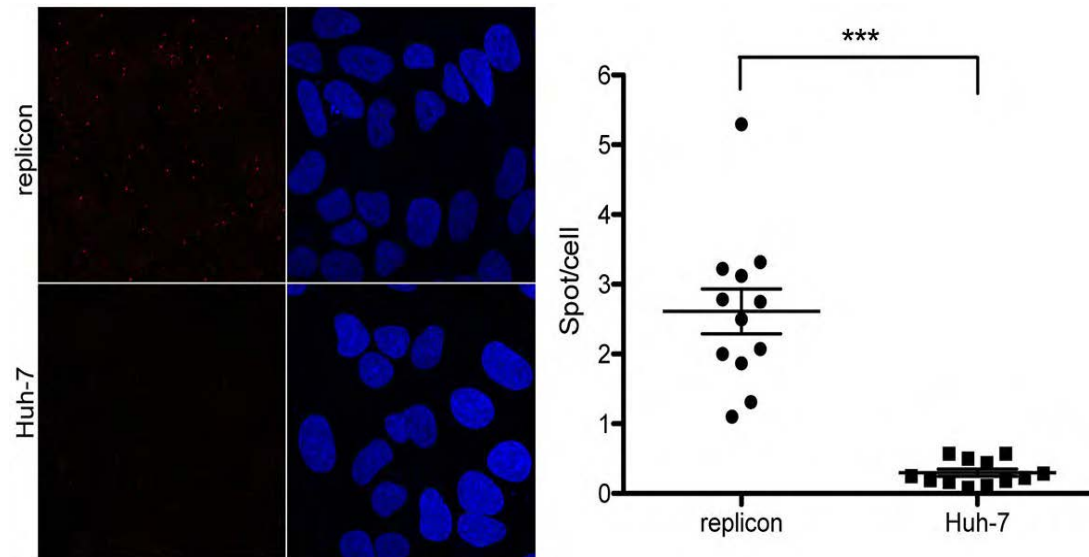


Figure 6. GBF1 interacts with NS3 in cells replicating HCV. Huh-7 cells containing a sub-genomic replicon of JFH-1 strain and naïve Huh-7 cells were processed for proximity ligation assay using antibodies to NS3 and GBF1. Stacks of images corresponding to the total volume of the cells were acquired and maximum intensity projections of the stacks were generated. (A) Representative images PLA signal (orange dots) and nuclei (blue). (B) Quantification of dots of 12 images from 2 independent experiments. *** $p < 0.001$.

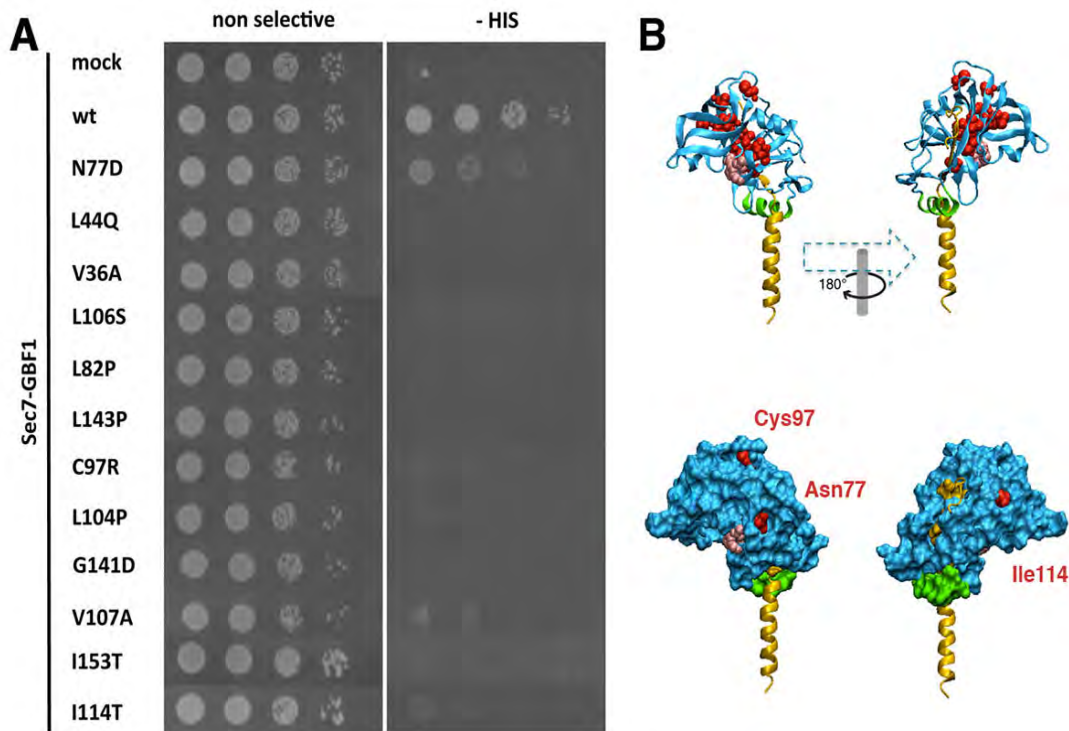


Figure 7. Interaction of Sec7-GBF1 with HCV NS3 protease mutants. (A) Yeast strain AH109 co-transformed with pGADT7-Sec7-GBF1 and pGBKT7 carrying mutants of the NS3 protease domain were grown on non-selective and selective (-His) media to monitor reporter expression. (B) Localization of mutated residues in the structure of NS3 protease domain. Mutated residues are shown in red, NS3 active site is shown in pink, NS3 membrane-associated α -helix is in green, NS4A is in yellow, other NS3 residues are in blue. 3 residues mutated in the yeast reverse two-hybrid assay, which are exposed at the surface of the protein are indicated.

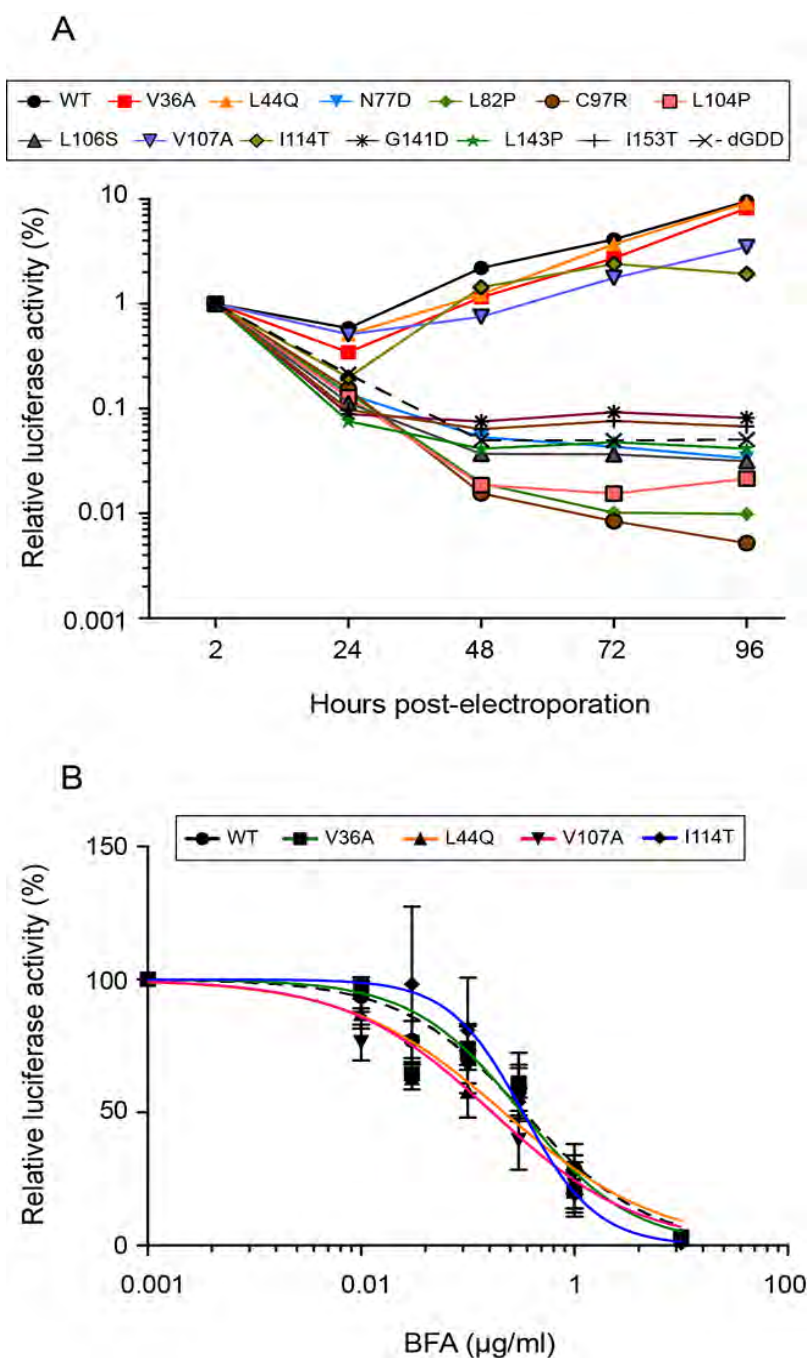


Figure 8. Replication and BFA sensitivity of NS3 protease domain mutants. (A) In vitro transcribed RNA of Con1 replicon pFK-rep-PI-luc/ET containing NS3 protease mutants were electroporated in Huh-7.5 cells. Cells were lysed at indicated times post-electroporation for luciferase assay. Data represent means of 4 independent experiments performed in triplicates. (B) Huh-7.5 cells electroporated with indicated replicons were cultured for 8 h in the presence of the indicated concentrations of BFA and lysed at 48 h post-electroporation for luciferase assay. Luciferase activities were expressed relative to the luciferase activity measured at 2 h post-electroporation. Data are means of 3 independent experiments performed in triplicate.

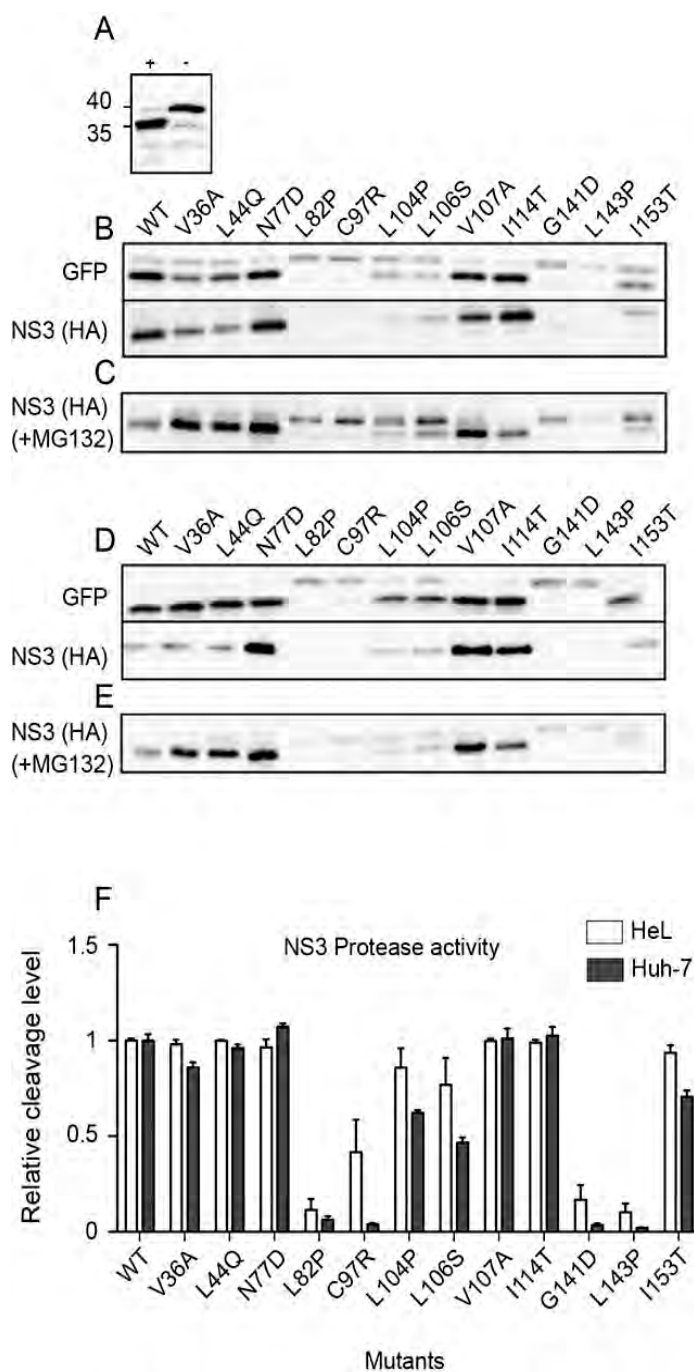


Figure 9. Protease activity of NS3 protease domain mutants. (A) GFP-IPS was expressed by transfection in Huh-7 cells with (+) or without (-) NS3-4A. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an anti-GFP antibody. (B) GFP-IPS was expressed in Huh-7 cells with indicated HA-tagged NS3-4A mutants. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-GFP and anti-HA antibodies. (C) Immunoblot analysis of Huh-7 cells expressing the indicated NS3-4A mutants and treated for 8 h with MG132. (D) Immunoblot analysis of GFP-IPS cleavage in HeLa cells. (E) Immunoblot analysis of NS3 in HeLa cells treated with MG132. (F) Quantification of GFP-IPS cleavage by NS3-4A mutants in Huh-7 and HeLa cells. Data are means and standard deviations from 3 independent experiments.

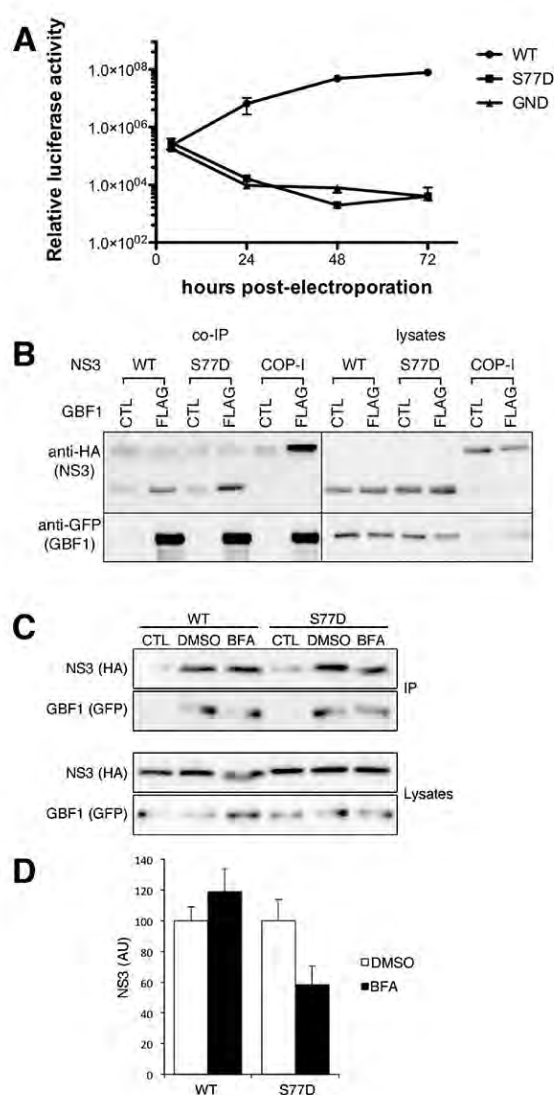


Figure 10. Phenotype of S77D mutation in NS3 of JFH-1 strain. In vitro transcribed RNA of Δ E1E2 JFH-1 containing the indicated mutations were electroporated in Huh-7.5 cells. Cells were lysed at indicated times post-electroporation and luciferase activity was measured. Data represent means of 3 independent experiments performed in triplicates. (B, C) HeLa cells were co-transfected with expression plasmids for HA-tagged WT or S77D NS3-4A, or HA-tagged γ 1-COP with YFP-GBF1 (CTL) or YFP-GBF1-FLAG (FLAG). Cells were (B) untreated, or (C) treated with BFA 10 μ g/ml (BFA) or DMSO 0.1% (DMSO). Cells were lysed and lysates incubated with anti-FLAG beads. Immunoprecipitated material and 5% of lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA and anti-GFP antibodies. (D) NS3 signals from 4 independent experiments were quantified and values of DMSO-treated cells were expressed as 100. Errors bars represent SD.

Table 1. Structural and functional properties of NS3 mutants

Position	Mutation (Con1)	Conservation		Accessibility	Replication	Protease activity	Self cleavage
		H77	JFH-1				
36	Val -> Ala	Val	Ile	-	+	+	+
44	Leu -> Gln	Leu	Leu	-	+	+	+
77	Asn -> Asp	Asn	Ser	20%	-	+	+
82	Leu -> Pro	Leu	Leu	-	-	-	-
97	Cys -> Arg	Cys	Cys	15%	-	-	-
104	Leu -> Pro	Leu	Leu	-	-	+/-	+/-
106	Leu -> Ser	Leu	Leu	-	-	+/-	+/-
107	Val -> Ala	Val	Val	-	+	+	+
114	Ile -> Thr	Ile	Ile	4%	+	+	+
141	Gly -> Asp	Gly	Gly	-	-	-	-
143	Leu -> Pro	Leu	Val	-	-	-	-
153	Ile -> Thr	Leu	Leu	-	-	+/-	+/-