

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**« Importance de l'activité autophagique pour la réplication du  
virus de l'hépatite C »**

Par  
Claudia Bélanger

Mémoire présenté  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
en virologie & immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne :	Angela Pearson INRS-Institut Armand Frappier
Examineur externe :	Martin Bisailon Département de biochimie Université de Sherbrooke
Directeur de recherche :	Patrick Labonté INRS-Institut Armand-Frappier



# REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Patrick Labonté de m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire, ainsi que mes camarades de laboratoire Carl Guévin et Syntia Begley pour leur aide. Un merci tout particulier à Syntia pour sa présence, mais surtout pour les moments de folie.

Merci à ma famille, sans qui je ne serais pas allée aussi loin dans la vie. Papa, tu as été un modèle de persévérance pour moi, tu m'as guidée durant tout mon cheminement académique et surtout tu es toujours là quand j'en ai besoin. Un grand merci à ma grande sœur Mélanie pour le support moral et les « lunchs-surprises » que tu m'as apportés le matin!

Pour toi maman, avec toute ma gratitude et tout mon amour ; je n'ai jamais abandonné, tel que tu nous l'as montré avec ton combat qui a duré 18 ans. Tu feras toujours partie de ma vie.

À mes amis, qui partagent mes peines et mes joies et qui ont su m'encourager et me remonter le moral quand ce fut le temps : Julie Latour, Julie Disnard, Veronique Bougie, Luc Bertrand et Alexandre Rochette-Legros.

Finalement, à mon conjoint et tendre amour Karim Julien qui donne un sens à ma vie. Merci pour ton support, ton encouragement, tes délicieux repas et tout ton amour ; chaque jour passé auprès de toi est un cadeau de la vie. Je t'aime.

# RÉSUMÉ

L'autophagie est un mécanisme de recyclage intracellulaire impliqué dans l'homéostasie, qui utilise des vésicules à double membrane (VDM) nommées autophagosomes. Plusieurs rôles lui ont été attribués, notamment dans le développement, dans la mort programmée de type II, dans l'apparition de maladies et dans l'immunité innée et adaptative. D'autres études montrent que plusieurs virus à ARN de polarité positive tels que les Artérovirus, le Poliovirus, le virus de la dengue, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et le virus de l'hépatite murine utilisent les VDM pour leur réplication. En effet, ces virus utiliseraient les autophagosomes formés durant l'autophagie comme charpente pour la formation de leur complexe de réplication. Par ailleurs, il a été démontré par électroporation d'ARN JFH1 (*Japanese fulminant hepatitis type 1*) dans des cellules humaines d'origine hépatocytaire que le VHC est en mesure d'induire l'autophagie (Sir *et al.* 2008a; Sir *et al.* 2008b).

Le but de notre étude était d'analyser l'importance de l'autophagie pour la réplication du VHC. Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent que le VHC peut non seulement induire fortement l'autophagie suite à l'infection mais a besoin de l'autophagie pour sa réplication. Ainsi, l'abolition de l'autophagie avant ou durant l'infection diminue fortement la réplication virale du VHC. Étonnamment, nous n'avons observé aucune colocalisation entre les protéines virales Core, NS3 et NS5A du VHC et la protéine autophagique LC3. Par contre, nos résultats nous permettent de conclure que l'autophagie est bénéfique à la réplication virale et que son effet est probablement produit après l'entrée mais avant l'encapsidation. Par conséquent, le virus peut contrecarrer l'effet antimicrobien de l'autophagie en sa faveur.

Nos résultats sont les premiers à démontrer une implication de l'autophagie dans la réplication virale du VHC en situation d'infection complète à l'aide du virus JFH1. En effet, il n'existe que deux autres études sur le sujet, toutes deux publiées dans la dernière année (Ait-Goughoulte *et al.* 2008; Sir *et*

*al.* 2008a; Sir *et al.* 2008b). L'une utilise une lignée cellulaire immortalisée par intégration du génome de la protéine Core du VHC, soit la lignée IHH (immortalized human hépatocytes) et le virus de génotype 1a, le clone H77. La deuxième étude utilise aussi le virus JFH1 et la lignée cellulaire Huh-7 ; cependant, toutes leurs infections sont produites par électroporation d'ARN viral.

---

Claudia Bélanger

---

Patrick Labonté

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE</b>	<b>4</b>
1. <b>VIRUS DE L'HÉPATITE C (VHC)</b>	<b>5</b>
1.1 TRANSMISSION	5
1.2 PATHOLOGIE ET TRAITEMENT	6
1.3 SOUCHES	9
2. <b>ASPECTS MOLÉCULAIRES DU VHC</b>	<b>9</b>
2.1 PROTÉINES STRUCTURALES	11
2.2 PROTÉINES NON STRUCTURALES	13
3. <b>CYCLE ET RÉPLICATION VIRALE</b>	<b>17</b>
3.1 SYSTÈMES DE RÉPLICATION	17
3.2 CYCLE DE RÉPLICATION VIRALE	19
3.2.1 Entrée	20
3.2.2 Décapsidation, traduction et réplication	21
3.2.3 Assemblage et relâche	24
4. <b>AUTOPHAGIE</b>	<b>25</b>
4.1 RÔLES DE L'AUTOPHAGIE	26
4.2 MÉCANISME D'ACTION	29



4.2.1	L'activation	30
4.2.2	Expansion et complétion de la vésicule	34
4.2.3	Ancrage, fusion avec le lysosome et dégradation	37
4.3	MODULATION DE L'AUTOPHAGIE	38
5.	<b>VIRUS ET AUTOPHAGIE</b>	<b>42</b>
5.1	VIRUS QUI EN TIRENT AVANTAGE	42
5.2	VIRUS QUI INHIBENT LE PHÉNOMÈNE	46
5.3	VHC ET AUTOPHAGIE	47
<b>PROBLÉMATIQUE</b>		<b>50</b>
<b>MÉTHODOLOGIE</b>		<b>52</b>
1.	<b>CELLULES ET VIRUS</b>	<b>53</b>
1.1	LIGNÉES CELLULAIRES	53
1.2	PRODUCTION DE VIRUS	53
2.	<b>INDUCTEURS ET INHIBITEURS DE L'AUTOPHAGIE</b>	<b>54</b>
2.1	INDUCTEURS	54
2.1.1	Milieu pauvre en nutriment	54
2.1.2	Rapamycine	54
2.2	INHIBITEURS	54
2.2.1	3-Méthyladénine	54
2.2.2	Inhibiteur du lysosome (E64D)	55
3.	<b>IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN</b>	<b>55</b>
3.1	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	55
3.2	ANTICORPS	56
3.3	IMMUNOBUVARDAGE	56
4.	<b>IMMUNOFLUORESCENCE</b>	<b>58</b>
4.1	MICROSCOPIE À BALAYAGE CONFOCAL	58
4.2	FOYER INFECTIEUX	59

	X
<b>5. DOSAGE DES ARN VIRAUX (TAQMAN)</b>	<b>60</b>
5.1 EXTRACTION DE L'ARN INTRACELLULAIRE	60
5.2 EXTRACTION ARN EXTRACELLULAIRE	60
5.3 TRANSCRIPTION INVERSE-RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR)	61
<b>RÉSULTATS</b>	<b>63</b>
1. CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ AUTOPHAGIQUE DES CELLULES.	64
2. INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE DANS LA LIGNÉE CELLULAIRE HUH-7 INFECTÉE	67
3. DIMINUTION DE L'INFECTION SUITE À L'INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE.	71
4. ABSENCE DE COLOCALISATION ENTRE LES PROTÉINES VIRALES ET AUTOPHAGIQUES.	75
<b>DISCUSSION</b>	<b>77</b>
1. ACTIVATION DE L'AUTOPHAGIE SUITE À L'INFECTION PAR LE VHC	79
2. IMPORTANCE DE L'AUTOPHAGIE SUR LA RÉPLICATION DU VHC	81
3. ABSENCE DE COLOCALISATION	82
4. HÉPATITE C, AUTOPHAGIE ET STRESS DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE	83
<b>CONCLUSION</b>	<b>86</b>
<b>APPENDICE</b>	<b>90</b>
1. ARTICLE SOUMIS	92
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>101</b>

## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Évolution clinique et virale du VHC.....</i>	<i>7</i>
<i>Figure 2 : Issue possible suite au traitement. ....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 3 : Organisation génomique du VHC.....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 4 : Systèmes de réplication du VHC.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 5 : Cycle de réplication du VHC.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 6 : Mécanisme de formation des autophagosomes.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 7 : Complexe d'initiation de l'autophagie .....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 8 : Site d'assemblage du phagophore.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 9 : Régulation de l'autophagie via mTOR .....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 10 : Observation de VDM en microscopie électronique. ....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 11 : Activité basale de l'autophagie dans la lignée Huh-7.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 12 : Activation de l'autophagie dans les cellules infectées par le VHC. ...</i>	<i>68</i>
<i>Figure 13 : Expression de la forme LC3-II suite à l'infection par le VHC. ....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 14 : Diminution de la réplication virale après abolition de l'autophagie....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 15 : Diminution de l'infection suite à une abolition de l'autophagie dans la lignée cellulaire Huh-7 déjà infectée.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 16 : Absence de colocalisation avec les protéines virales.....</i>	<i>76</i>

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Résumé des protéines virales du VHC et de leur fonction.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 2 : Protéines autophagiques .....</i>	<i>32</i>
<i>Tableau 3 : Tableau résumé des relations observées entre les virus et l'autophagie .....</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 4 : Résumé des anticorps d'immunobuvardage de type western.....</i>	<i>57</i>

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

%	Pourcentage
°C	Degrés Celcius
3-MA	3-Méthyladénine
a.a.	Acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN <sub>c</sub>	ADN complémentaire
Ambra1	<i>Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARN <sub>m</sub>	ARN messenger
ARN <sub>sb</sub>	ARN simple brin
ARN <sub>si</sub>	ARN silencieux
ASGPR	<i>Asialoglycoproteins</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATG	<i>Autophagy related gene</i>
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BECN1	<i>Coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein</i>
Bif-1	<i>Bax-interacting factor-1</i>
CD81	<i>Cluster of differentiation 81</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EBNA1	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen 1</i>
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
ECMV	<i>Encephalochoriomeningitis virus</i>
eIF3	<i>Initiation factor 3</i>
FKBP12	<i>Fk506 binding protein 12</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

GTP	Guanosine-5'-triphosphate
h	Heure
HRP	Péroxidase de raifort
hVsp34	<i>Mammalian vacuolar protein sorting 34</i>
HVR	<i>Hypervariable region</i>
IHH	<i>Immortalized human hepatocytes</i>
IRE1	<i>Inositol requirement 1</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
JFH1	<i>Japanese fulminant hepatitis type 1</i>
Kb	kilobase
KDa	KiloDalton
Kpb	Kilo pair de base
KV	Kilovolts
L-SIGN	<i>Adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LDLR	<i>Low-density lipoproteins receptor</i>
MEM NEAA	<i>Minimum Essential Media non-essential Amino Acid</i>
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Milimolaire
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycine</i>
mTORC	mTOR complexe
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
nm	Nanomètre
NTP	<i>Nucleoside triphosphate</i>
NTPase	<i>Nucleoside triphosphate hydrolase</i>
NTR	<i>Non translated region</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDK1	<i>3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>

PE	Phosphatidyléthanolamine
PEN/STREP	Pénicilline et streptomycine
PI-3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PtdIns3P	Phosphatidylinositol 3 phosphates
PKR	Protéine kinase R
PVDF	Polyvinylidene fluoride
Ras-MAPK	<i>Ras mitoyen-activated protein kinase</i>
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SR-B1	<i>Scavenger receptor class B type 1</i>
TGN	Réseau trans-golgien
TLR	Toll like receptor
TSC	Tuberous sclerosis complex
ug/ml	Microgramme par millilitre
ULK1	<i>Unc-51-like kinase 1</i>
uM	Micromolaire
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UVRAG	<i>UV radiation resistance associated gene</i>
VDM	Vésicule à double membrane lipidique
VHC	Virus de l'hépatite C
VHC <sub>cc</sub>	VHC adapté à la culture cellulaire
VHC <sub>pp</sub>	VHC pseudoparticles
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	<i>Very-low density lipoproteins</i>
WIP149	<i>Phospho-inosides (WIP1)-1alpha</i>





# **INTRODUCTION**

On estime que plus de 170 millions de personnes sont atteintes de l'hépatite C à travers le monde, représentant 3 % de la population mondiale (Wasley et Alter 2000). En plus d'être la première cause d'affections hépatiques chroniques telles que la cirrhose et le cancer du foie, le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème de santé publique majeur puisqu'aucun vaccin n'est encore disponible. À l'heure actuelle, la principale source de transmission est l'utilisation de drogue injectable. Qui plus est, le meilleur traitement actuellement disponible pour guérir d'une infection à l'hépatite C est constitué d'une combinaison d'interféron alpha 2b couplé au polyéthylène glycol et de ribavirine. Malheureusement, ce traitement provoque de nombreux effets secondaires indésirables et n'est efficace que dans 50 % des cas en ce qui concerne le génotype 1, génotype dominant en Amérique. Par conséquent, les études sur le virus de l'hépatite C ont connu un essor considérable ces dernières années, notamment grâce à la découverte d'un génome infectieux *in vitro*, JFH1, un génome complet du VHC, reconstitué à partir d'un sérum de patient japonais atteint d'une hépatite fulminante. En effet, avant que ce génome ne soit disponible en 2005, il était impossible d'étudier le cycle complet de réplication du virus *in vitro*. Bien que la découverte de ce génome ait permis d'étudier l'ensemble des étapes comprises durant la réplication du virus en culture cellulaire, bien des évidences restent encore à démontrer. D'ailleurs, le site d'assemblage du complexe de réplication nécessaire à la réplication du génome viral n'a toujours pas été élucidé. Ce qui en fait un sujet largement étudié et pour lequel quelques hypothèses sont toujours à l'étude.

Récemment, plusieurs études sur l'autophagie ont démontré que bon nombre de virus à ARN monocaténaire de polarité positive utilisaient l'autophagie pour leur réplication. Parmi ceux-ci figure le virus de la polio, le rhinovirus, le virus de la dengue, l'entérovirus 71, le virus de l'artérite équine, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) et le virus de l'hépatite

murine pour n'en nommer que quelques-uns. La plupart d'entre eux utilisent les autophagosomes produits durant le phénomène d'autophagie comme charpente pour l'assemblage de leur complexe de réplication. Ainsi, l'autophagie, un phénomène impliqué dans le recyclage des constituants cellulaires tels que les mitochondries, ribosomes et les protéines à longue durée de vie, pourrait favoriser la réplication virale. En effet, lors du phénomène d'autophagie, une vésicule à double membrane lipidique est formée. Celle-ci doit ultimement fusionner avec le lysosome où le contenu sera ensuite dégradé et redistribué afin de générer de nouvelles protéines et de l'énergie. Ce phénomène connu depuis plusieurs années n'avait jamais fait l'objet de nombreuses études. Récemment, après lui avoir découvert un large éventail de rôles, les études portant sur l'autophagie ont vu naître un élan fulgurant. L'autophagie est notamment impliquée dans la survie cellulaire, dans le développement, dans l'immunité innée et adaptative, dans l'apparition de maladies neurodégénératives, dans la mort programmée de type II et, plus récemment, dans la réplication de certains virus.

La grande ressemblance entre certains virus à ARN monocaténaire de polarité positive avec le VHC ainsi que la nécessité pour le complexe viral du VHC de se former à la surface d'une membrane ont soulevé le questionnement suivant : **est-ce que l'autophagie pourrait servir à la réplication du virus de l'hépatite C ?** Ainsi, notre but était d'étudier l'importance de l'autophagie dans la réplication du VHC.

Ce mémoire de maîtrise contient une revue de la littérature survolant l'ensemble des études portant sur le virus de l'hépatite C et sur le phénomène d'autophagie. Ensuite, la méthodologie employée pour répondre à notre question y est largement détaillée, suivie de la présentation de nos résultats sur le sujet. Finalement, une discussion mettant en lumière l'importance de notre étude y est présentée.

# **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. Virus de l'hépatite C (VHC)

Le virus de l'hépatite C (VHC) fut découvert en 1989 ; il fait partie de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Hepacivirus* (Tan 2006; Suzuki *et al.* 2007b). Environ 70 virus sont compris dans la même famille, parmi lesquels 13 sont à l'origine de pathologie humaine. Parmi ceux-ci, figurent le virus de la dengue, le virus du Nil occidental ainsi que le virus de la fièvre jaune (Suzuki *et al.* 2007b) auquel on doit notamment l'origine du nom de famille. En 2000, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 170 millions le nombre de porteurs chroniques du VHC à travers le monde et à trois à quatre millions de nouveaux cas par année. La prévalence des infections est plus élevée dans les pays d'Afrique, de Méditerranée orientale, d'Asie du Sud-Est et du Pacifique Occidental, où elle varie entre 2,15 % et 5,3 %, alors qu'en Amérique, sur une population d'environ 785 millions près de 13,1 millions sont porteurs chroniques, élevant la prévalence à environ 1,7 % (Murphy *et al.* 2000).

### 1.1 Transmission

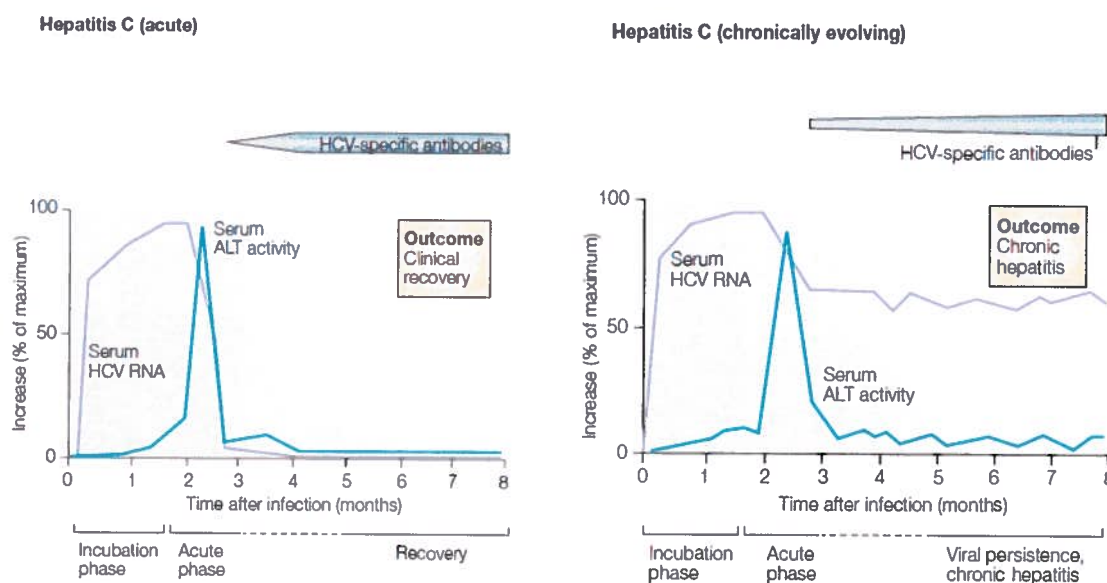
La transmission du VHC se fait par contact direct avec du sang contaminé, faisant de celui-ci un virus à transmission parentérale tout comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les principaux modes de transmission avant sa découverte en 1989 étaient la transplantation d'organe, la transfusion sanguine et l'utilisation d'outils contaminés (Thomson B. J. et Finch 2005). En effet, jusque dans les années 1990, aucune détection du VHC n'était effectuée lors des dons de sang. De plus, une importante vague de vaccination contre les infections parasitaires en Afrique fut opérée avant même la découverte du VIH en 1984 lors de laquelle la même seringue fut utilisée pour plus d'une personne. C'est pourquoi la prévalence est plus élevée dans les pays sous-développés, tel que mentionné ci-haut. Ces modes de transmission sont maintenant rares puisque tout le matériel médical doit être stérilisé entre chaque patient et que les banques de sang font maintenant le criblage systématique de

tous leurs dons de sang. Malgré tout, quelques rares cas surviennent encore dans les pays sous-développés où certaines pratiques telles que la circoncision, le perçage et la scarification font partie des coutumes locales. À l'heure actuelle, le principal mode de transmission du VHC est l'utilisation de drogue injectable (Thomson B. J. et Finch 2005). Ce mode de transmission est surtout observé dans les pays développés, chez les personnes âgées de 30 à 49 ans, où le nombre d'utilisateurs de drogue injectable est élevé. De plus, il est possible de contracter le VHC par transmission verticale de la mère à l'enfant et par pratique sexuelle multiple et non protégée. Dans les deux derniers cas, une coïnfection avec le VIH augmente pratiquement du double le risque de transmission du VHC (Thomson B. J. et Finch 2005).

## 1.2 Pathologie et traitement

L'estimation du nombre de porteurs chroniques du VHC à travers le monde est difficile d'autant plus que l'infection est asymptomatique chez 60 à 70 % des personnes contaminées, et ce, même en phase chronique de l'infection. Cependant, selon l'OMS, les premiers symptômes cliniques observés en phase aiguë de l'infection sont la fatigue et l'ictère et ils apparaissent après une période d'incubation allant de 15 à 150 jours. Suite à l'infection par le VHC, environ 20 à 30 % des personnes contaminées seront en mesure d'éliminer le virus alors que les autres 70 à 80 % vont plutôt développer une hépatite chronique (figure 1). Le mécanisme par lequel le virus serait éliminé par l'organisme n'est pas encore connu. Plusieurs études sur le phénomène ont tout de même pu déterminer qu'il faut en moyenne trois à six mois pour éliminer le virus (Rehermann et Nascimbeni 2005). De plus, 52 % des gens contaminés démontrant des symptômes cliniques éliminent le virus spontanément, alors que les individus infectés ne présentant aucun symptôme développent majoritairement une infection chronique (Rehermann et Nascimbeni 2005; Thomson B. J. et Finch 2005). Une fois l'infection chronique établie, 15 à 25 % des gens vont développer une cirrhose du foie après plus de 20 ans d'infection

et un à cinq pourcents des gens ayant eu la cirrhose vont développer un cancer hépatocellulaire.



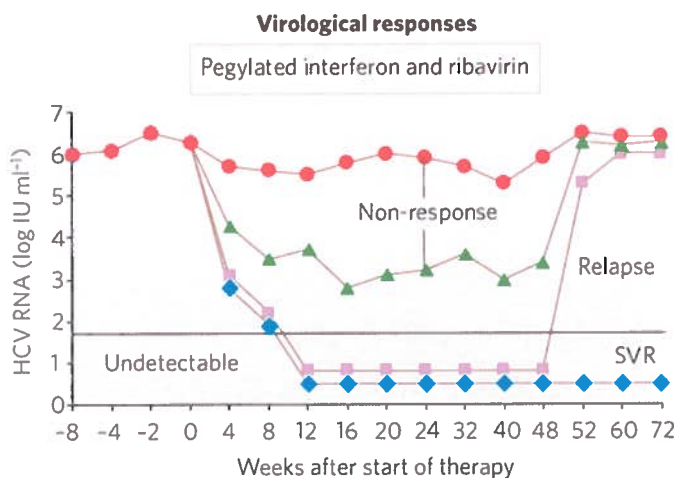
**Figure 1 : Évolution clinique et virale du VHC**

Suite à l'infection par le VHC, un haut titre viral est observé durant la phase d'incubation du virus. Environ 8 à 12 semaines suivant l'infection, nous observons une chute du titre viral suivie d'un pic d'activité des enzymes ALT dans le sérum. C'est aussi à ce moment que la détection d'anticorps spécifiques aux VHC est observée. Ceci ne détermine pas l'issue de l'infection. Ensuite, deux scénarios sont possibles : le virus est éliminé et le niveau d'ALT retourne à la normale ou le titre viral diminue d'environ 2 à 3 log et demeure constant. Si le virus n'est pas éliminé, l'individu développe une hépatite chronique et le niveau d'ALT demeure variable tout au long de l'infection. (Tiré de Rehmann et Nascimbeni 2005)

La cirrhose n'est pas uniquement due au virus, mais aussi à l'hôte puisque le VHC n'est pas connu pour être cytolytique. Les dommages produits au foie seraient plutôt associés à l'action combinée du virus et des défenses de l'hôte, qui tentent d'éliminer le virus (Cerny et Chisari 1999). Ainsi, les cellules hépatiques seraient à la longue remplacées par des cellules fibreuses d'où l'apparition de la cirrhose sur une longue période. Le développement de la tumeur est un phénomène linéaire, c'est-à-dire que celui-ci n'apparaît que chez les malades qui ont développé la cirrhose. Par contre, le mécanisme qui mène à son développement n'est pas encore connu. Néanmoins, toutes les autres

affections hépatiques telles que l'alcoolisme, vont augmenter les chances d'avoir une cirrhose et par conséquent une tumeur (Tong *et al.* 1995).

Contrairement au virus de l'hépatite A et à celui de l'hépatite B, il n'existe aucun vaccin contre le virus de l'hépatite C. Durant plusieurs années, le traitement consistait à l'administration d'interféron alpha 2b. Cette monothérapie avait une efficacité d'environ 20 %, tous génotypes confondus (Thomson B. J. et Finch 2005; Hartwell et Shepherd 2009). Ensuite, un nouveau traitement plus



**Figure 2 : Issue possible suite au traitement.**

Quatre issues sont observées lors du traitement de l'infection. Soit que l'individu ne répond pas au traitement (courbes rouge et verte), soit que l'individu répond au traitement mais rechute (courbe en mauve), ou bien l'individu répond au traitement et élimine le virus (courbe en bleu). (Tiré de Feld 2005)

efficace que la monothérapie est apparu. Le traitement consistait à l'administration combinée d'interféron alpha 2b avec la ribavirine, un analogue nucléosidique. Ce traitement avait une efficacité d'environ 40 % et le virus n'était plus détecté dans le sérum jusqu'à 24 semaines suivant l'arrêt du traitement (Feld et Hoofnagle 2005). À l'heure actuelle, une combinaison d'interféron alpha 2b couplé au polyéthylène glycol et de ribavirine est

utilisée comme traitement de l'infection au VHC. Le polyéthylène glycol retient l'interféron plus longtemps dans le sérum et l'efficacité du traitement est augmentée. Celui-ci atteint une efficacité d'environ 54 %, tous génotypes confondus. L'efficacité du traitement est corrélée par le génotype. Ainsi, les personnes infectées par le génotype 2 et 3 ont 80 % de chance d'éliminer le virus suite au traitement alors que les personnes infectées par le génotype 1 n'ont que 42 % de chance (Thomson B. J. et Finch 2005; Hartwell et Shepherd



2009). Suite au traitement, quatre issues sont observées (figure 2) (Feld et Hoofnagle 2005). (1) Il n'y a aucune diminution du titre viral et le patient ne répond jamais au traitement. (2) Le patient répond, une diminution est observée, mais le titre viral revient à la normale après quelques semaines de traitement. (3) Le patient répond bien au traitement, le niveau d'ARN n'est plus détecté, mais celui-ci rechute une fois le traitement terminé. (4) Le niveau d'ARN viral diminue au point de ne plus être détecté et demeure indétectable (Feld et Hoofnagle 2005) plusieurs semaines après l'arrêt du traitement. On dit alors que le patient est guéri. Finalement, en plus d'être dispendieux, tous ces traitements durent en moyenne 24 à 48 semaines et engendrent de nombreux effets secondaires, si bien que le tiers des gens abandonnent le traitement avant la fin.

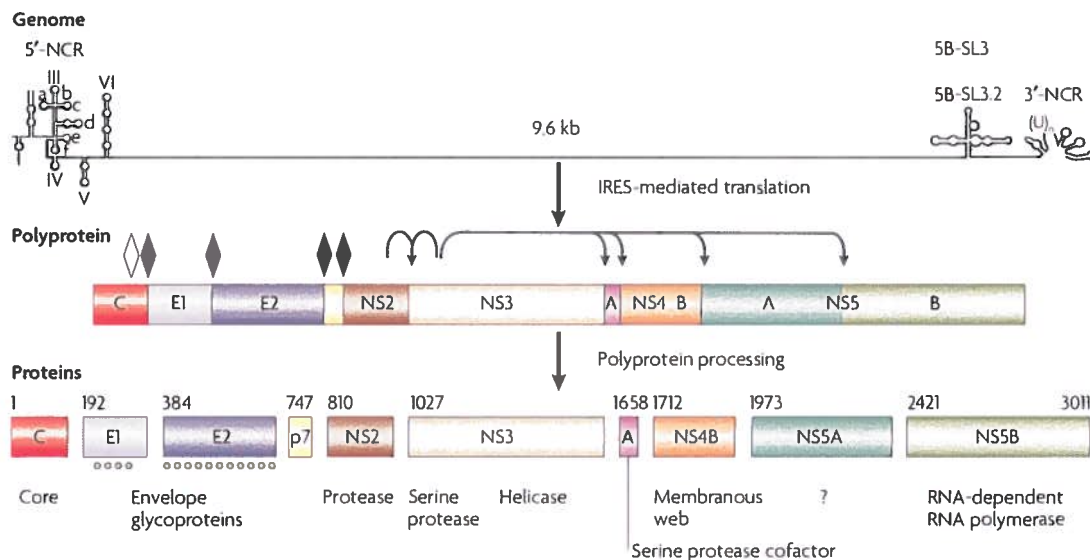
### 1.3 Souches

Le virus de l'hépatite C est subdivisé en six géotypes différents incluant de nombreux sous-types. Chaque géotype diffère par au moins 20 % au niveau de sa séquence génomique. Le géotype prédominant en Amérique du Nord est le géotype 1. Alors que le géotype 2 est surtout rencontré au Japon et en Chine, le géotype 3 en Angleterre, les géotypes 4 et 5 en Afrique et le géotype 6 au Moyen-Orient. Bien qu'il n'existe pas de corrélation entre l'évolution de la maladie et le géotype, il en existe une entre le géotype et l'efficacité du traitement. Autrement dit, les géotypes 2 et 3 répondent mieux au traitement que les géotypes 1,4, 5 et 6.

## 2. **Aspects moléculaires du VHC**

Le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé d'environ 40 à 70 nm de diamètre et dont la capsid de symétrie icosaédrique contient le génome d'ARN simple brin de polarité positive (Rehermann et Nascimbeni 2005; Moradpour et al. 2007). Le VHC circule dans le sang sous différentes formes qui sont représentées par des fractions de densité différente et qui démontrent une

variation de l'infectiosité (Diedrich 2006). En effet, les virions peuvent se retrouver associés avec des lipoprotéines de faible densité (LDL, Low Density Lipoproteins) ou des lipoprotéines de très faible densité (VLDL, Very Low Density Lipoproteins) ou bien circuler sous la forme libre. Les virions associés aux lipoprotéines représentent les fractions les plus légères et les plus infectieuses (Diedrich 2006).



**Figure 3 : Organisation génomique du VHC**

Le génome du virus de l'hépatite C est constitué d'un seul brin d'ARN de polarité positive codant pour un seul cadre de lecture ouvert générant 10 protéines virales, 3 protéines structurales en portion N-terminale (C, E1 et E2) et 7 protéines non structurales en portion C-terminale (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). De plus, le génome contient deux régions non traduites hautement conservées et importantes à la réplication et la traduction. (Tiré de Moradpour *et al.*, 2007)

Le génome du VHC fait environ 9600 nucléotides, détient un seul cadre de lecture ouvert et code pour dix protéines virales (Dubuisson 2007; Moradpour *et al.* 2007; Meshkat *et al.* 2009). Il est organisé comme ceci : 5'-NTR-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3'NTR. Les deux régions non traduites sont hautement structurées et toutes deux sont essentielles à la réplication et à la traduction (Moradpour *et al.* 2007). Ainsi, la région 5'NTR est extrêmement conservée parmi les différents isolats et comprend quatre domaines très

ordonnés et numérotés I à IV. Le domaine I n'est pas nécessaire à l'activité du IRES (internal ribosome entry site) mais il est important à la réplication (Moradpour *et al.* 2007). Les domaines II, III, et IV ainsi que les 24 à 40 premiers nucléotides de la région codant pour la protéine Core constituent le IRES (internal ribosome entry site) qui est indispensable à la traduction du génome (Otto et Puglisi 2004; Moradpour *et al.* 2007). Une fois le complexe ribosomal 80S formé, le génome est traduit en une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés qui subira des modifications co- et post-traductionnelles par l'intermédiaire des protéases cellulaires et virales, afin de générer les différentes protéines virales structurales Core, E1 et E2 et non structurales p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Moradpour *et al.* 2007).

## 2.1 Protéines structurales

Les premières protéines rencontrées, en région N-terminale de la polyprotéine, sont les protéines structurales Core, E1 et E2 qui sont clivées par des endopeptidases intracellulaires. Core est une protéine hautement basique de type hélice alpha et constitue la principale composante de la nucléocapside. Elle est d'abord générée sous la forme immature dans le cytoplasme et doit subir un clivage en portion C-terminale afin d'engendrer la forme mature de la protéine (McLauchlan *et al.* 2002). La portion N-terminale de la protéine est riche en résidu basique et contient le domaine D1 connu pour lier l'ARN et former un homo-oligomère. Sa distribution dans la cellule varie. Ainsi, on peut la retrouver à la membrane du réticulum endoplasmique, à la membrane du réseau de petites vésicules (membranous web) et à la membrane des vésicules lipidiques (Dubuisson 2007; Moradpour *et al.* 2007).

**Tableau 1 : Résumé des protéines virales du VHC et de leur fonction**

Protéine	Poids moléculaire	Fonctions
Protéines structurales		
Core	21 KDa	Protéine de la nucléocapside
E1	31-35 KDa	Glycoprotéine de l'enveloppe
E2	70 KDa	Glycoprotéine de l'enveloppe
Protéines non structurales		
P7	7 KDa	Canal ionique
NS2	21 KDa	Activité protéase NS2-3
NS3	69 KDa	Domaine N-terminale protéase et C-terminale hélicase et NTPase
NS4A	6 KDa	Cofacteur de NS3
NS4B	27 KDa	Induit la formation de structure membranaire
NS5A	56-58 KDa	Phosphoprotéine
NS5B	68 KDa	ARN polymérase ARN dépendante

(Modifié de Dubuisson 2007)

Les protéines E1 et E2 représentent les protéines de l'enveloppe. Elles forment, par des liens non covalents, un hétérodimère fortement glycosylé. Toutes deux détiennent un ectodomaine dans la région N-terminale et un domaine transmembranaire dans la région C-terminale faisant d'eux des protéines membranaires de type I (Diedrich 2006; Dubuisson 2007). Elles sont, tout comme la protéine Core, retenues au réticulum endoplasmique. Cette rétention est assurée par le domaine transmembranaire, lequel est aussi responsable de leur hétérodimérisation (Dubuisson 2007; Moradpour *et al.* 2007). La protéine E2 détient trois régions hypervariables distinctes; HVR1, HVR2 et HVR3. HVR1 est constituée des 27 premiers nucléotides de la région N-terminale de la protéine (Hofmann *et al.* 2003; Troesch *et al.* 2006; Dubuisson 2007; Sklan *et al.* 2009). La région HVR3 est comprise entre les régions HVR1 et HVR2 soit entre les nucléotides 431 à 466. La région HVR2 composée de neuf

nucléotides est située entre les nucléotides 474 à 482. La région HVR2 est la plus conservée des trois régions hyper variables parmi les différents génotypes. Toutes trois sont importantes à l'attachement du virus sur la cellule et influencent la réponse au traitement par l'interféron alpha (Troesch *et al.* 2006).

## 2.2 Protéines non structurales

La première protéine non structurale rencontrée est la protéine transmembranaire p7. La p7 est une petite protéine fortement hydrophobe de 63 acides aminés qui traverse la membrane deux fois. Autant sa région N-terminale que sa région C-terminale se retrouvent dans la lumière du réticulum endoplasmique (Carrere-Kremer *et al.* 2002). Elle est formée de deux régions transmembranaires amphipatiques de type hélice alpha et d'une boucle cytoplasmique riche en résidu basique. Elle contient une séquence HXXXW, tout comme la protéine M7 du virus de l'influenza A, ce qui la classe parmi les protéines de la famille des viroporines. Cette séquence est hautement conservée d'un génotype à l'autre (Meshkat *et al.* 2009). Après son insertion dans la membrane, elle forme un canal ionique par oligomérisation. La protéine p7 n'est pas indispensable à la réplication du génome, mais serait essentielle pour l'assemblage des nouveaux virions (Griffin *et al.* 2008; Meshkat *et al.* 2009).

Suivant la protéine non structurale p7, nous retrouvons les protéines non structurales NS2 à NS5b toutes impliquées dans la réplication du génome. Sous sa forme mature, la protéine NS2 se retrouve intégralement dans la membrane du réticulum endoplasmique. Sa fonction n'est toutefois pas élucidée (Santolini *et al.* 1995; Dubuisson 2007; Moradpour *et al.* 2007). Sous la forme immature, NS2 participe à l'activité protéase responsable du clivage à la jonction NS2/NS3. Les premiers 180 nucléotides de NS3 sont aussi impliqués dans cette activité. Ainsi, l'activité enzymatique de NS2-3 a été décrite comme une activité cystéine protéinase et elle se situe dans la région C-terminale de la protéine NS2 et la région N-terminale de la protéine NS3 (Santolini *et al.* 1995; Pallaoro *et al.* 2001).

NS2 forme un dimère et possède au moins un domaine transmembranaire dans sa région N-terminale ainsi que deux sites actifs. La formation d'un dimère est essentielle à l'activité cystéine protéase, ce qui suggère que la formation du complexe actif de réplication est modulé par la concentration de NS2 dans la cellule (Dubuisson 2007; Moradpour *et al.* 2007).

NS3 est une protéine multifonctionnelle puisqu'elle détient une activité enzymatique sérine protéase en N-terminale et une activité hélicase/NTPase en C-terminale (Tai *et al.* 1996; Wolk *et al.* 2000). La protéine NS4A fonctionne comme un cofacteur de la protéine NS3 et augmente son activité protéase. La portion centrale de la protéine NS4A interagit avec la protéine NS3 et forme un complexe par des liens non covalents alors que sa région N-terminale est responsable de l'association du complexe avec la membrane. Ainsi, lorsque la protéine NS3 est coexprimée avec la protéine NS4A elle est associée à la membrane du réticulum endoplasmique alors qu'exprimée seule, elle est diffuse dans le cytoplasme et le noyau (Wolk *et al.* 2000; Dubuisson 2007). En plus d'augmenter l'activité enzymatique de la protéine NS3, NS4A stabilise la protéase, la protégeant de la dégradation protéolytique. Le complexe est essentiel à la réplication du génome et assure le clivage de la polyprotéine en aval de NS3 (Lindenbach et Rice 2005). Ensuite, la portion C-terminale responsable de l'activité hélicase et NTPase contient un domaine DexH/D-box. Les hélicases de cette superfamille sont en mesure de dérouler ou dissocier, en présence d'ATP, les duplex ARN-ARN (Tai *et al.* 1996; Dubuisson 2007). Le monomère de NS3 lie facilement l'ARN, mais la formation d'un dimère est indispensable à l'activité hélicase. La fonction précise de l'activité hélicase dans le cycle de réplication du VHC n'est pas encore déterminée (Dubuisson 2007).

NS4B est une protéine non structurale hautement basique, contenant quatre domaines transmembranaires et est palmitolée en région C-terminale (Yu *et al.* 2006). Les protéines NS4B du VHC, des pestivirus et des flavivirus sont

similaires au niveau de leur taille, au niveau de leur composition en a.a. et au niveau de leurs propriétés hydrophobiques (Hugle *et al.* 2001). Les régions N et C terminales de la protéine se retrouvent dans le cytosol. La protéine NS4B a été détectée sur le réticulum endoplasmique. Elle interagit avec les protéines NS4A – NS3 et NS5A et est directement impliquée dans la modulation de l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (Hugle *et al.* 2001). En plus de ces interactions avec les autres protéines virales non structurales, son expression dans la cellule induit des modifications membranaires intracellulaires. Suite à l'ensemble de ces observations, il a été suggéré que la protéine NS4B joue un rôle dans la production de structure membranaire utilisée comme charpente pour la formation du complexe de réplication (Hugle *et al.* 2001; Dubuisson 2007).

La phosphoprotéine NS5A est retrouvée sous la forme phosphorylée et sous la forme hyperphosphorylée (Appel *et al.* 2006). La phosphorylation de la NS5A est conservée parmi les hépacivirus, les pestivirus et les flavivirus, indiquant que cette phosphorylation est importante à leur cycle viral. La portion N-terminale contient une hélice alpha amphipatique responsable de la localisation membranaire de la protéine ainsi qu'un motif de liaison au zinc (Brass *et al.* 2002; Tellinghuisen *et al.* 2004). Le motif de liaison au zinc est constitué de quatre résidus cystéine et est fortement conservé parmi les virus du genre hépacivirus et pestivirus. De plus, cette hélice alpha contient une région hydrophobe riche en tryptophanes qui est incluse dans l'interface de la membrane et une région polaire exposée dans le cytosol responsable des interactions protéine-protéine essentielles à la formation d'un complexe de réplication fonctionnel (Brass *et al.* 2002). Trois domaines ont été identifiés : le domaine I, qui est situé immédiatement après l'hélice alpha, a une structure dimérique et est impliqué dans les interactions entre les protéines virales, les protéines cellulaires, la membrane et l'ARN (Appel *et al.* 2006). Le domaine II joue plutôt un rôle dans l'inhibition de la voie PKR induite par l'interféron suite à

la formation d'un duplex ARN-ARN durant le cycle de réplication (Gale *et al.* 1998). Le domaine III est moins conservé et tolère des insertions ou des délétions partielles. Sa fonction n'est pas encore connue. NS5A est essentiel à la réplication du VHC et plusieurs mutations dans sa séquence nucléotidique sont à l'origine d'une meilleure réplication du virus en culture cellulaire (Moradpour *et al.* 2004; Dubuisson 2007).

La protéine NS5B, une ARN polymérase ARN dépendante, catalyse la réplication de l'ARN viral. C'est une protéine transmembranaire pour laquelle le domaine de liaison à la membrane est situé dans la région C-terminale. De ce fait, NS5B est généralement retrouvée à la membrane du réticulum endoplasmique (Lesburg *et al.* 1999). La synthèse de l'ARN viral *in vitro* et *in vivo* se fait *de novo*, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas d'amorce (Kao *et al.* 2000; Zhong W. *et al.* 2000). La polymérase adopte une structure conservée parmi les autres polymérases, soit la structure de la main droite avec une paume, des doigts et un pouce. De nombreuses interactions entre les doigts et le pouce en font une polymérase de type fermé, où le site catalytique compris dans la paume se retrouve complètement enfermé (Lesburg *et al.* 1999). De ce fait, les doigts et le pouce vont moduler l'interaction avec l'ARN et la structure fermée de la polymérase crée un tunnel dans lequel un seul brin d'ARN peut avancer et interagir avec le site catalytique. Un second tunnel, celui-ci chargé positivement, permet l'entrée des nucléotides triphosphates (Carrere-Kremer *et al.* ; Labonte *et al.* 2002; Dubuisson 2007; Moradpour *et al.* 2007). La polymérase ne détient pas la capacité de s'auto corriger durant la polymérisation du nouveau brin. Ainsi, de nombreuses quasi-espèces sont produites durant l'infection et retrouvées dans le sérum de patient infecté. Ces quasi-espèces peuvent notamment être résistantes aux traitements ce qui expliquerait les rechutes (Penin *et al.* 2004).

Une dernière protéine a récemment été identifiée : la protéine F, localisée dans la région Core de la polyprotéine. Cette protéine est exprimée lors d'un



déphasage de  $-2/+1$  du cadre de lecture. Des anticorps spécifiques à cette protéine, retrouvés dans le sang de patient infecté, indiquent que la protéine F est exprimée durant l'infection par le VHC (Bain *et al.* 2004). Elle fait 160 acides aminés de long et son expression n'est pas essentielle à la réplication du virus autant *in vitro* et *in vivo*. Sa fonction n'est toujours pas connue (McMullan *et al.* 2007; Moradpour *et al.* 2007).

### 3. Cycle et réplication virale

#### 3.1 Systèmes de réplication

Il n'y a que depuis 2005 que l'ensemble des étapes comprises dans le cycle de réplication virale du VHC peut être étudié en culture cellulaire. En effet, avant 2005 il n'existait pas de système permettant l'étude du cycle viral du VHC dans son intégralité. Ainsi, avant l'apparition de l'isolat Con1, en 1999, le cycle viral était étudié uniquement chez le chimpanzé à l'aide d'ADNc (Bartenschlager et Sparacio 2007; Tellinghuisen *et al.* 2007). L'isolat Con1 consiste en un ARN bicistronique, capable d'établir une réplication persistante dans la lignée cellulaire hépatique Huh-7, et a été conçu par l'équipe de Lohmann (figure 4A). Toutefois, ce réplicon sous-génomique de génotype 1b ne permet pas l'expression des protéines structurales du VHC. En effet, le premier cistron permet la traduction du gène de sélection, le gène de résistance à la néomycine, sous la direction du IRES du VHC et le second cistron permet l'expression des protéines virales non structurales du VHC, c'est-à-dire les protéines NS3 à NS5B. La traduction des protéines non structurales du VHC se fait sous la direction du IRES du virus ECMV (Encephalomyocarditisvirus) (Lohmann *et al.* 1999; Tellinghuisen *et al.* 2007). Ensuite, un ADNc pleine longueur, c'est-à-dire exprimant l'ensemble des protéines du VHC, a été obtenu. Celui-ci, nommé H77, de génotype 1a, est capable de se répliquer en culture cellulaire et chez le chimpanzé lorsqu'injecté de façon intrahépatique (Yanagi *et al.* 1997; Bartenschlager et Sparacio 2007; Tellinghuisen *et al.* 2007). Il s'agit d'une

séquence consensus établie par alignement de diverses séquences isolées d'un patient démontrant de hauts titres viraux sanguins, nommés H77 (Kolykhalov *et al.* 1997; Yanagi *et al.* 1997; Bartenschlager 2006). Malgré tout, aucun de ces systèmes ne permet la production de particules virales infectieuses suite à la réplication des transcrits d'ARN et aucun ne permet d'étudier l'entrée du virus puisqu'ils sont directement électroporés dans les cellules.

Un nouveau système, permettant d'étudier l'entrée du virus fait suite à celui des réplicons sous-génomiques. Il s'agit d'un pseudotype rétroviral communément appelé VHC pseudoparticules (VHCpp) (Bartosch *et al.* 2003). Le système permet la production de particules virales exprimant les protéines E1 et E2 du VHC à la surface de l'enveloppe du virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) ainsi que l'expression d'un gène rapporteur contenu dans la capsid (figure 4B). Le tout est produit en co-transfectant trois vecteurs plasmidiques dans la lignée cellulaire 293T. Un premier vecteur code pour les glycoprotéines virales du VHC E1 et E2 dans leur intégrité, le second pour les protéines Gag-Pol du VIH qui produiront la nucléocapsid et le troisième code pour un génome rétroviral exprimant un gène rapporteur, soit celui de la luciférase (Bartosch *et al.* 2003; Tellinghuisen *et al.* 2007). Ce système ne permettait l'étude que d'une partie du cycle viral, l'entrée, et a permis d'identifier quelques récepteurs cellulaires importants à la pénétration du virus.

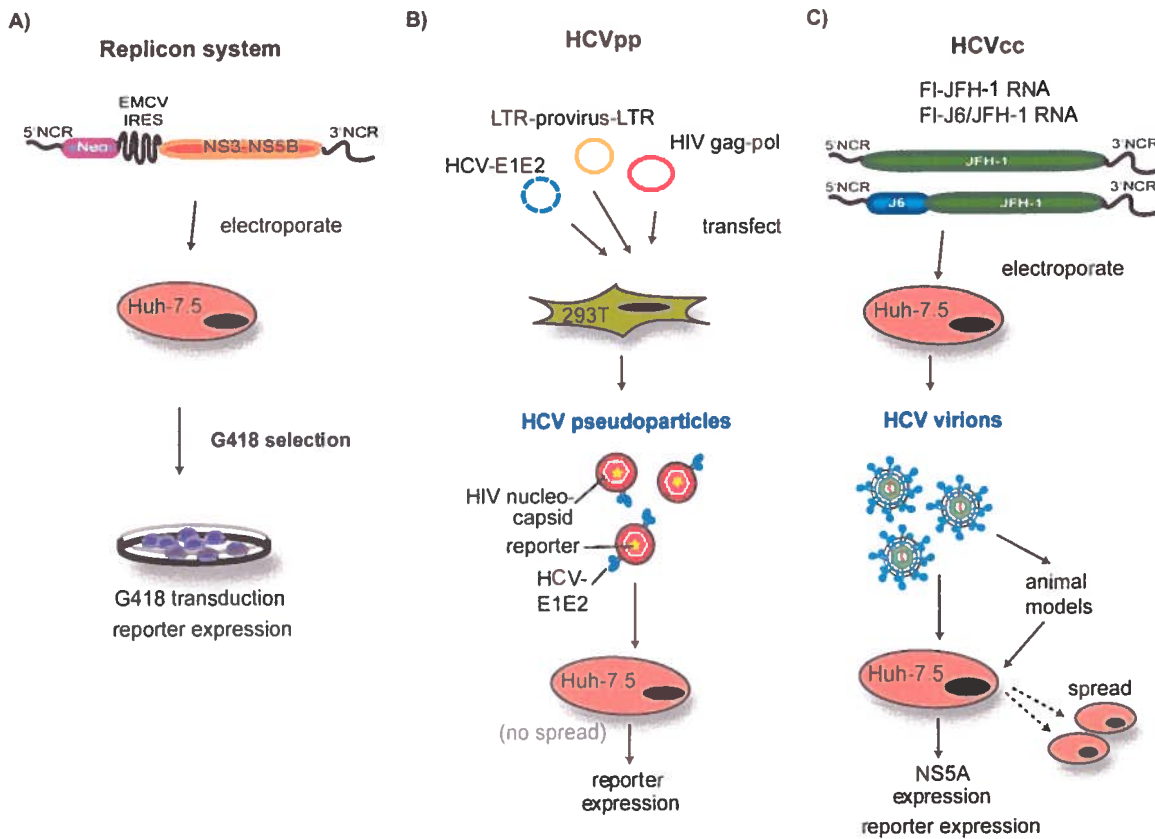
Ce n'est qu'en 2005 que le premier système de culture cellulaire permettant l'étude complète du cycle de réplication du VHC fait son apparition (figure 4C). Il s'agit d'un isolat du génotype 2a nommé JFH-1, isolé d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante, pour lequel la transfection du transcrit d'ARN JFH-1, dans la lignée cellulaire hépatique Huh-7, permet la production de particules virales infectieuses (Cai *et al.* 2005; Wakita *et al.* 2005; Zhong J. *et al.* 2005; Tellinghuisen *et al.* 2007). Le transcrit peut se répliquer dans différentes lignées cellulaires telles que les lignées hépatiques HepG2, IMY-N9 ainsi que les

lignées cellulaires Hela et 293, des lignées non hépatiques (Kato *et al.* 2003; Kato *et al.* 2005). Par contre, il n'y a que dans les lignées cellulaires hépatiques Huh-7 et Huh-7,5, une lignée dérivée de Huh-7, que la production de virions infectieux est possible (Lindenbach *et al.* 2005; Zhong J. *et al.* 2005; Zhong J. *et al.* 2006). Ainsi, le surnageant contenant les nouveaux virions peut servir à infecter de nouvelles cellules naïves. Ce système permet d'étudier l'ensemble des étapes du cycle viral, et ce, en culture cellulaire comme chez le modèle animal du chimpanzé et de la souris alb-uPA-SCID (Zhong J. *et al.* 2006). D'autres transcrits de génotypes différents ont été élaborés à partir de celui-ci, tel que le J6-JFH1 de génotype 1a, composé des gènes non structuraux du JFH-1 et des gènes structuraux d'un nouvel isolat, l'isolat 1a nommé J6. Des chimères de génotype 1a, 1b et 3a sont présentement disponibles (Lindenbach *et al.* 2005). Ce système nommé HCVcc (Hepatitis C virus cell culture) fut découvert par l'équipe de Date et l'équipe de Kato et a permis de grandes avancées dans l'étude du cycle viral du VHC (Kato *et al.* 2003; Date *et al.* 2004; Kato *et al.* 2005).

### 3.2 Cycle de réplication virale

Suite à l'infection par le VHC, celui-ci pénètre les cellules hépatiques humaines, où il établira sa réplication. Tout comme la majorité des virus à ARN simple brin de polarité positive, la réplication se fait entièrement dans le cytoplasme de la cellule. Le titre viral dans le sérum d'un patient varie entre  $10^3$  et  $10^7$  particules virales/ml durant le cycle de réplication. On estime que  $10^{11}$  à  $10^{12}$  virions sont produits par jour et la demie-vie de ces virions n'est que de deux à quatre heures (Neumann *et al.* 1998; Dahari *et al.* 2005; Davis *et al.* 2007). Malgré tout, un grand nombre de ces virions ne seront pas infectieux, dû au haut taux d'erreur de la polymérase. Finalement, depuis l'arrivée du système de culture cellulaire VHCcc, il est possible d'étudier chacune des étapes comprises dans le cycle de réplication du virus. A cet effet, celui-ci peut-être divisé en

quatre parties distinctes soit (1) l'entrée, (2) la décapsidation et la réplication, (3) l'assemblage et (4) la relâche (figure 5).



**Figure 4 : Systèmes de réplication du VHC.**

(A) Le système de réplicon permet d'étudier la réplication du VHC dans la cellule puisque les protéines non structurales du VHC sont exprimées sous le contrôle du IRES du EMCV dans le second cistron. Dans le premier cistron, un gène de sélection est exprimé sous la direction du IRES du VHC et permet de sélectionner les cellules ayant incorporé le transcrite suite à la transfection. (B) Le système des pseudoparticules virales HCVpp permet d'étudier l'entrée du virus dans la cellule à l'aide de virus exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe du VHC sur la capsid du VIH, laquelle renferme un gène rapporteur. Ceux-ci sont générés par cotransfection de trois vecteurs plasmidiques dans la lignée cellulaire 293T et sont en mesure d'infecter des cellules naïves de foie. Les deux systèmes démontrés en A et en B ne permettent pas l'étude complète du cycle de réplication virale du VHC et aucun virion infectieux n'est produit. (C) HCVcc pour VHC « cell culture », consiste en l'électroporation d'un transcrite d'ARN complet du génome du VHC soit JFH-1 ou bien d'une chimère constituée des protéines structurales (Core à NS2) d'un autre isolat. L'électroporation dans la lignée cellulaire Huh-7 ou une lignée dérivée Huh-7,5 permet la production de nouveaux virions infectieux. (Tiré de Tellinghuisen 2007)

### 3.2.1 Entrée

Suite à l'apparition du système VHCpp et VHCcc, plusieurs récepteurs et corécepteurs cellulaires ont été identifiés essentiels à l'entrée du virus. Les

récepteurs peuvent être divisés en deux catégories : les récepteurs responsables de l'attachement et les récepteurs responsables de l'entrée. Les récepteurs responsables de l'attachement du virus vont permettre une accumulation des virions à la surface de la cellule. Le virion attaché peut ensuite interagir avec d'autres récepteurs et médier l'entrée dans la cellule cible. Parmi les récepteurs d'attachement figurent les glycosaminoglycans L-SIGN et DC-SIGN (Bartenschlager et Sparacio 2007; Suzuki *et al.* 2007b), l'héparan sulfate (Barth *et al.* 2006) et le récepteur du LDL (LDLR) (Dubuisson *et al.* 2008). Contrairement au récepteur du CD81, du scavenger récepteur B1 (SR-B1), des asialoglycoprotéines (ASGPR), et plus récemment, des claudines 1, 6 et 9 (Dubuisson *et al.* 2008; Sklan *et al.* 2009) qui font partie des récepteurs spécifiques à l'entrée du virus dans la cellule (Dubuisson *et al.* 2008). Les lignées cellulaires n'exprimant que certains de ces récepteurs ne permettent pas l'entrée du virus, ce qui implique que d'autres récepteurs restent à identifier.

### 3.2.2 Décapsidation, traduction et réplication

L'entrée du virus se produit par endocytose à l'intérieur de vésicules de clathrine et la fusion de la capsid avec la membrane de la vésicule se ferait dans l'endosome tardif (Blanchard *et al.* 2006; Dubuisson *et al.* 2008). La fusion permet la libération du génome dans le cytoplasme. Cette fusion est dépendante du pH et la vésicule doit être acidifiée afin de libérer le génome (Blanchard *et al.* 2006; Bartenschlager et Sparacio 2007; Suzuki *et al.* 2007b). Une fois le génome libéré dans le cytoplasme, celui-ci sera immédiatement traduit et apprêté pour générer les protéines virales. Ainsi, la traduction du génome est assurée par les ribosomes cellulaires et est cap indépendante (Suzuki *et al.* 2007b). La sous-unité ribosomale 40S va se lier directement au IRES et recruter le facteur d'initiation eucaryote eIF3 ainsi que le complexe eIF2 : Met-tRNA<sub>i</sub> : GTP pour former un complexe dit 48S (Pisarev *et al.* 2005; Suzuki *et al.* 2007b). La liaison de la sous-unité ribosomale 60S, qui est le facteur limitant à la production du complexe 80S, est nécessaire à l'initiation de la traduction et est dépendante de

l'hydrolyse de GTP. L'activité du IRES peut-être régulée par différents facteurs cellulaires et viraux qui moduleront la traduction (Otto et Puglisi 2004; Pisarev *et al.* 2005; Suzuki *et al.* 2007b). Parmi ceux-ci, la protéine virale Core est connue pour interagir avec le complexe de réplication et inhiber la traduction. L'interaction serait possiblement effectuée sur le domaine III inclus dans le 5'UTR du génome viral, plus particulièrement sur un triplet de G situé dans la structure en tête d'épingle du domaine III inclus dans le IRES (Suzuki *et al.* 2007b). Une autre étude suggère plutôt qu'une interaction ARN-ARN entre le IRES et la séquence de Core serait la cause de cette modulation de la traduction (Wang T. H. *et al.* 2000).

Tout comme les autres virus à ARN simple brin, la réplication du VHC débute par la synthèse d'un brin complémentaire négatif à partir du génome. La réplication se fait en deux étapes, la formation du brin matrice et la production de nombreux brins d'ARN positif à partir du brin matrice. Les deux étapes sont assurées par la polymérase du virus NS5B (Suzuki *et al.* 2007b). Les nouveaux brins d'ARN positif vont permettre la production d'un plus grand nombre de protéines virales et seront encapsidés afin de générer de nouveaux virions (figure 5). Cette accumulation de protéines virales induit la formation de nouvelles structures membranaires (Novoa *et al.* 2005; Bartenschlager et Sparacio 2007). Ces structures membranaires serviraient de charpente à la formation de nouveaux complexes de réplication. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin de déterminer l'origine de ces structures telles que le réseau de petites vésicules (membranous web), les radeaux lipidiques et récemment les vésicules à double membrane issues de l'autophagie (Miyanari *et al.* 2003; Aizaki *et al.* 2004; Novoa *et al.* 2005).

En effet, la majorité des recherches effectuées avant 2005 tendaient en faveur du réseau de petites vésicules membranaires. Bien que cette hypothèse n'ait jamais été validée, elle demeure la plus utilisée lors de la description du

cycle viral du VHC. Cette hypothèse du réseau de petites vésicules membranaires a été proposée suite à quelques études démontrant une accumulation de vésicules dans les cellules infectées par le VHC (Miyanari *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2007a). La protéine responsable de cette accumulation de vésicules est maintenant connue : il s'agit de la protéine NS4B du VHC. Effectivement, l'expression seule de cette protéine dans la cellule est suffisante à la production de structure membranaire. Quelques figures de microscopie électronique ont pu démontrer cette accumulation, mais aucune de ces figures ne montre le lien qui unirait le virus à ces vésicules. Il est en effet très difficile d'observer le virus par la technique de marquage à l'aide d'anticorps couplé à des billes d'or en microscopie électronique (Thomson B. J. et Finch 2005; Bartenschlager 2006). Par contre, le fait que ce réseau de petites vésicules soit exprimé dans les cellules infectées et observé en périphérie du réticulum endoplasmique laisse croire que ces vésicules seraient composées de fragments du réticulum endoplasmique et que le virus s'en servirait comme charpente pour l'initiation d'un nouveau complexe de réplication. Toutefois, cette hypothèse reste à confirmer puisqu'aucune étude n'a démontré de lien étroit entre les réseaux de petites vésicules et le complexe de réplication.

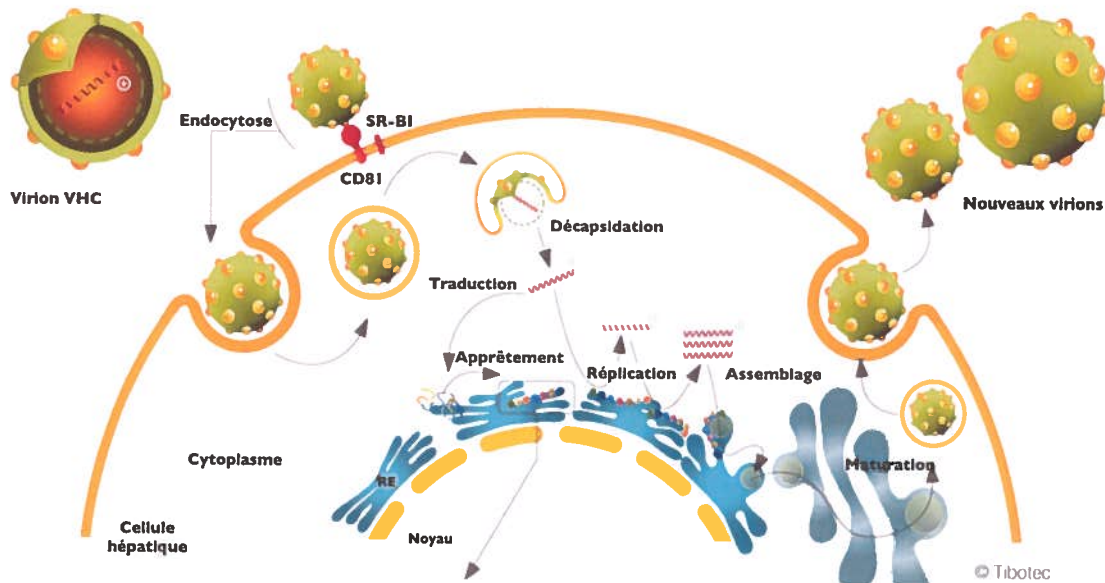
D'autres études tendent plutôt en faveur des radeaux lipidiques puisque certaines évidences démontrent une association entre le complexe de réplication et des fragments de membrane insolubles au détergent (Aizaki *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2007b; Sklan *et al.* 2009). Notons aussi que les radeaux lipidiques possèdent des régions riches en cholestérol et en sphingolipides et que des inhibiteurs de la synthèse *de novo* du sphingolipide inhibent la réplication virale (Aizaki *et al.* 2004). Ces études proposent l'hypothèse que le complexe de réplication serait associé aux radeaux lipidiques et que sa détérioration romprait le complexe de réplication, diminuant la réplication virale.

D'autre part, de plus en plus de virus à ARN simple brin de polarité positive ayant des similitudes avec le VHC forment leur complexe de réplication à la membrane de vésicules autophagiques. Parmi ceux-ci, figure le virus de la polio, le virus de l'hépatite murine, le coronavirus, le virus de syndrome respiratoire sévère aigu et le virus de la dengue pour n'en nommer que quelques-uns (Espert *et al.* 2007; Khakpoor *et al.* 2009). Plus de détail à ce sujet est présenté dans la section 5.1 du présent chapitre. Notons toutefois que la composition de ces vésicules à double membrane (VDM) lipidique produites durant l'autophagie n'est pas encore déterminée. Jusqu'à présent, trois hypothèses sont proposées : soit que la membrane dérive de composé issu du réticulum endoplasmique ou du réseau trans-golgien ou bien serait synthétisée de *novo* (Reggiori 2006). De plus, l'autophagie est facilement induite dans les cellules et peut être modulée par un grand nombre de voies métaboliques. Toutes ces informations laissent supposer que le virus de l'hépatite C pourrait établir son complexe de réplication sur les vésicules à double membrane de l'autophagie.

### 3.2.3 Assemblage et relâche

Une étude effectuée par Miyanari et son équipe en septembre 2007, suggère que l'assemblage des nouvelles particules virales serait établi à proximité des vésicules de lipide. En effet, il est connu que la protéine Core induit la production d'un grand nombre de vésicules de lipide suite à l'infection par le VHC. Ainsi, leur étude démontre un recrutement des protéines virales à proximité des vésicules de lipide par interaction avec la protéine Core et que ce recrutement est important pour la production de particules virales (Miyanari *et al.* 2007). Suite à l'assemblage, le virus subit une maturation durant laquelle il acquiert son enveloppe. Finalement, les virions seront relâchés de la cellule sans la lyser (figure 5). La relâche du virus se ferait via la voie de sécrétion des vésicules (Suzuki *et al.* 2007b; Sklan *et al.* 2009).





**Figure 5 : Cycle de réplication du VHC**

Le virus de l'hépatite C entre via l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe E1/E2 et différents récepteurs cellulaires. Une fois entré par endocytose, le génome est libéré dans le cytoplasme suite à l'acidification de la vacuole et le génome est utilisé afin de générer les protéines virales, et le brin matrice pour la réplication par le complexe de réplication. Finalement, les nouveaux brins d'ARN sont assemblés dans une nouvelle capsidation, qui sera évacuée de la cellule après maturation sans lyser la cellule. (Modifié de Tibotec)

#### 4. Autophagie

L'autophagie a été découverte en 1963 par Christian De Duve lors de ses recherches sur le lysosome. Il fut le premier à donner une description par microscopie électronique à balayage de l'autophagie (Klionsky 2007; Cecconi et Levine 2008). Suite à cette découverte, Yoshinori Ohsumi et Michael Thumm ont débuté indépendamment, dans les années 90, une analyse détaillée de l'autophagie chez la levure, menant à la découverte de la majorité des gènes autophagiques (ATG) (Tsukada et Ohsumi 1993; Thumm *et al.* 1994; Cecconi et Levine 2008). En 1998, l'équipe de Mizushima et celle de Liang, identifient les premiers gènes autophagiques chez le mammifère *BECN1*, *ATG5* et *ATG12* (Liang X. H. *et al.* 1998; Mizushima *et al.* 1998b; Klionsky 2007). Malgré tout, c'est seulement dans la dernière décennie que l'autophagie a fait l'étude de

plusieurs recherches démontrant son implication au sein de divers phénomènes (Cecconi et Levine 2008).

Le terme autophagie inclut plusieurs mécanismes tels que la microautophagie, la macroautophagie, la crinophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la xénophagie (Patingre *et al.* 2008). La microautophagie est le processus par lequel les constituants sont séquestrés directement par invagination de la membrane du lysosome. D'ailleurs, l'autophagie médiée par les chaperonnes prend aussi place sur la membrane du lysosome, mais tient compte du transfert direct des protéines cytoplasmiques à travers la membrane via l'interaction avec des protéines chaperonnes (Dice 2007). La crinophagie consiste en la fusion de vésicules de sécrétion avec le lysosome tandis que l'élimination des microorganismes et des virus par le phénomène d'autophagie est nommée la xénophagie. La macroautophagie, référée par la suite comme étant l'autophagie, met en jeu la formation de vésicules à double membrane lipidique (VDM), qui vont ultimement fusionner avec le lysosome, pour être dégradées avec leur contenu (figure 3) (Xie et Klionsky 2007). L'autophagie est un mécanisme de survie cellulaire et d'adaptation par le recyclage de ses protéines à longue durée de vie et de ses organites cytoplasmiques afin de générer de l'énergie.

#### 4.1 Rôles de l'autophagie

Après 2004, les recherches sur l'autophagie voient un essor substantiel menant à la découverte de plusieurs rôles importants. Évidemment, son principal rôle serait le maintien de l'homéostasie par le recyclage de ses constituants internes, mais l'autophagie aurait aussi un rôle dans le développement, dans la mort cellulaire programmée de type II, dans le cancer et les maladies neurodégénératives, dans le vieillissement et dans les défenses immunitaires.

Tout d'abord, la mort programmée de type II ou la mort autophagique est surtout observée durant le développement, notamment chez les insectes, durant la métamorphose où une élimination massive de cellules est nécessaire (Beaulaton et Lockshin 1977; Kourtis et Tavernarakis 2009). Par ailleurs, l'équipe de Xueping Qu a su démontrer l'implication de l'autophagie dans le développement chez les mammifères, avec leurs recherches sur les cellules souches embryonnaires de souris. Leurs conclusions indiquent que l'autophagie est essentielle à la formation de cavités embryonnaires et que cela est dû à l'élimination de cellules à l'aide de la mort programmée de type II (Qu *et al.* 2007). D'autre part, chez les souris déficientes pour la protéine autophagique BECN1, qui est impliquée précocement dans le mécanisme d'autophagie, les embryons sont incapables de se rendre à terme (Qu *et al.* 2003). Alors que chez les souris déficientes pour les protéines autophagiques ATG5 et ATG7, impliquées plus tard dans le mécanisme d'autophagie, mais tout de même essentielles, la mort des embryons est observée 24 heures après la naissance (Kuma *et al.* 2004; Komatsu *et al.* 2005; Cecconi et Levine 2008). Cela laisse croire que l'autophagie est importante au développement des embryons via la mort programmée de type II et à leur survie durant la période néonatale.

Ensuite, plusieurs maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer, le Parkinson, la maladie de Prion et la maladie de Huntington sont associées à une accumulation de protéines au cerveau et il a été démontré que l'autophagie joue un rôle important dans l'élimination des agrégats de protéines (Sarkar et Rubinsztein 2008; Eskelinen et Saftig 2009). Comme l'activité autophagique des cellules diminue avec l'âge, il n'est pas surprenant de voir ces maladies apparaître chez les personnes âgées. En effet, des études révèlent que des composés chimiques capables d'induire l'autophagie diminueraient la quantité d'agrégats de protéine et préviendraient l'apparition de maladies neurodégénératives (Ravikumar *et al.* 2003; Ravikumar *et al.* 2004; Sarkar et Rubinsztein 2008; Aguib *et al.* 2009).

Pour ce qui est des cancers, le rôle de l'autophagie n'est pas encore bien défini (Petiot *et al.* 2000; Takeuchi *et al.* 2005). En diminuant le taux de mutation et d'oncogènes dans les cellules par la dégradation des organites défectueux, l'autophagie nuit à l'apparition ou à la prolifération des cancers (Eskelinen et Saftig 2009). Ainsi, de plus en plus de recherches démontrent qu'une délétion allélique du gène codant pour la protéine autophagique BECN1, protéine importante pour l'initiation des VDM lors de l'autophagie, favorise l'apparition de cancer du sein, cancer de la prostate, cancer de l'ovaire et bien d'autres (Kondo *et al.* 2005). Par contre, il a aussi été proposé qu'une activation de l'autophagie dans les cellules tumorales situées au centre de la tumeur contribue à la survie de la tumeur, puisque ces cellules ont moins accès aux nutriments étant moins vascularisées que les cellules tumorales périphériques (Kondo *et al.* 2005).

Finalement, l'autophagie est également en mesure de restreindre l'infection virale et la réplication bactérienne ou parasitaire, en plus de délivrer des antigènes aux complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (Lee S. P. *et al.* 2004; Nakagawa *et al.* 2004; Liu *et al.* 2005; Schmid *et al.* 2006). En effet, des études démontrent que différents TLR (Toll-like receptor) sont en mesure d'induire l'autophagie (Shoji-Kawata et Levine 2009). Par exemple, le TLR7, qui reconnaît l'ARN simple brin, induit l'autophagie dans les macrophages de souris et cette induction est diminuée lorsque l'expression de TLR7 ou de MyD88 (myeloid differentiation factor 88), un médiateur du TLR7, est régulée à la baisse par ARN d'interférence (Delgado et Deretic 2009). D'autre part, d'autres études démontrent qu'une diminution de l'expression de la protéine autophagique ATG12, qui est indispensable à l'autophagie, conduit à une diminution de l'apprêtement intracellulaire de l'antigène EBNA1 (Epstein Barr virus nuclear antigen 1) ce qui mène à une diminution de la réponse cellulaire T CD4<sup>+</sup> spécifique à cet antigène (Shoji-Kawata et Levine 2009). Par le fait même, il n'est pas surprenant de voir de plus en plus d'études illustrant différents mécanismes de subversion de l'autophagie chez les bactéries et les virus. Certains de ces

mécanismes seront détaillés dans la section cinq (virus et autophagie) du présent document.

#### 4.2 Mécanisme d'action

Le phénomène de l'autophagie est ubiquitaire et se produit à un niveau basal chez les cellules en absence de stress. L'autophagie débute par l'élongation d'une **membrane d'isolation** aussi nommée **phagophore** (figure 6). L'origine de cette membrane d'isolation reste à déterminer. Plusieurs hypothèses ont été suggérées proposant que la membrane d'isolation proviendrait du réticulum endoplasmique, d'autres suggérant qu'elle proviendrait plutôt de la partie trans-golgienne et même certaines affirment qu'elle serait synthétisée *de novo* (Juhasz et Neufeld 2006; Reggiori 2006; Eskelinen et Saftig 2009). Aucune de ces hypothèses n'a réellement été confirmée et une des raisons impliquant la difficulté d'identifier l'origine du phagophore est due au fait que celui-ci se compose en grande majorité de lipides libres de protéines transmembranaires (Juhasz et Neufeld 2006). Suite à l'élongation de cette membrane d'isolation, une grande vésicule à double membrane lipidique est obtenue, contenant de nombreux constituants cytoplasmiques tels que des protéines, des mitochondries et des ribosomes. Cette VDM, appelée **autophagosome**, va fusionner avec le lysosome et générer l'**autophagolysosome**, où la membrane interne ainsi que le contenu de la vésicule seront dégradés et redistribués afin de générer de l'énergie ou de nouvelles protéines (Cao Y. et Klionsky 2007; Eskelinen et Saftig 2009). Le processus peut être divisé en quatre étapes distinctes : (1) l'activation, (2) l'expansion et la complétion de la vésicule, (3) l'ancrage au lysosome et (4) la fusion et la dégradation (Reggiori 2006). Comme l'autophagie est un sujet récent d'étude, celui-ci est bien décrit chez la levure où les recherches ont débuté tôt après la découverte du phénomène, mais bien des évidences restent à faire sur le mécanisme d'action chez le mammifère. De ce fait, environ 30 protéines autophagiques ont été identifiées essentielles au processus autophagique dans

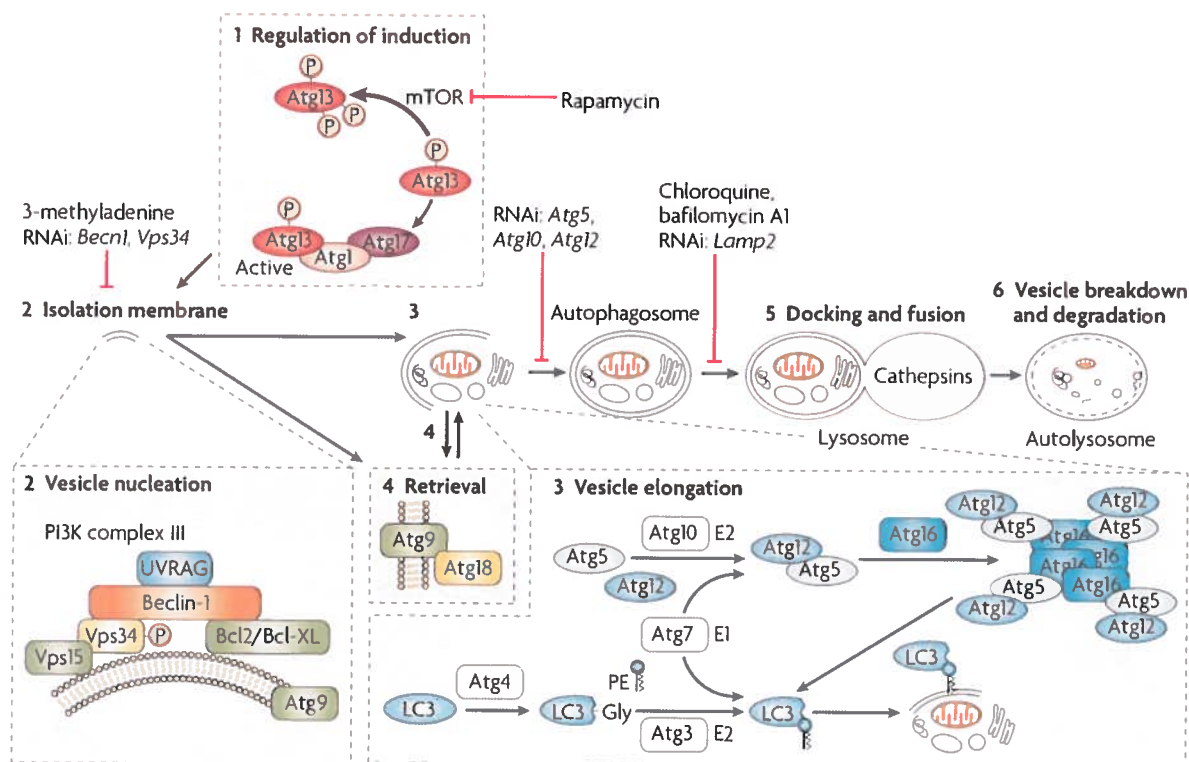
la levure, pour lesquelles de plus en plus d'homologues ont été identifiés chez le mammifère (Klionsky *et al.* 2003; Wang C. W. et Klionsky 2003; Yoshimori et Noda 2008).

#### 4.2.1 L'activation

L'activation de l'autophagie est médiée par la formation d'un complexe de protéines autophagiques comprenant la protéine becline 1 (BECN1), la protéine hVps34 (mammalian vacuolar protein sorting 34) et la protéine p150. Plusieurs études montrent qu'une fois le complexe formé, il y a induction de la formation des VDM dans la cellule, mais le mécanisme par lequel le complexe induit l'autophagie n'est pas encore défini. Par contre, une abolition de l'expression d'une de ces protéines inhibe ou réduit fortement l'autophagie (Yoshimori et Noda 2008; Eskelinen et Saftig 2009). La formation du complexe est activée par la protéine ULK1 suite à un stress cellulaire. ULK1 est l'homologue de ATG1 chez la levure, qui forme un complexe d'induction avec les protéines ATG13 et ATG17. Nous ne connaissons pas encore les homologues d'ATG13 et d'ATG17 ni le mécanisme d'activation de la protéine ULK1 chez l'humain.

La protéine la plus importante du complexe est sans doute la protéine BECN1, puisqu'elle interagit avec un grand nombre de protéines (figure 7). Elle a d'abord été découverte comme une protéine interagissant avec la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Liang X. H. *et al.* 1999; Petiot *et al.* 2000; Pattingre *et al.* 2005; Yoshimori et Noda 2008). Elle fait partie de la famille des protéines à superhélice et elle détient plusieurs domaines : un domaine d'interaction avec Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> (BH3 domain), un domaine CC (coiled-coil domain) et un domaine ECD (evolutionary conserved domain), avec lesquels d'autres protéines interagissent pour former un complexe (Backer 2008; Yoshimori et Noda 2008). Sa distribution dans la cellule varie en fonction du type cellulaire. On peut donc la retrouver au réseau trans-golgien dans la lignée cellulaire HeLa, mais sur les

mitochondries et le réticulum endoplasmique dans la lignée HT-29 (Kihara *et al.* 2001; Cao Y. et Klionsky 2007).



**Figure 6 : Mécanisme de formation des autophagosomes**

Suite à l'induction, il y aura formation des VDM via deux grands complexes, celui de la nucléation et le complexe d'élongation des VDM. Ces VDM vont ultimement fusionner avec le lysosome et la membrane interne ainsi que le contenu seront dégradés et redistribués. Les composés inhibiteurs sont indiqués en rouge. (Tiré de Maiuri *et al.* 2007)

Ainsi, la protéine BECN1 peut lier la protéine hVps34, une enzyme de la famille des phosphatidylinositol 3-kinase de classe trois. La protéine hVps34 a d'abord été étudiée pour son rôle dans le transport de vésicules endosomales et lysosomales et pour son rôle dans la voie de signalisation des nutriments via mTOR (Kihara *et al.* 2001; Backer 2008). L'unique produit de la protéine hVps34, le phosphatidylinositol 3 phosphates (PtdIns3P) semble jouer un rôle important dans la régulation de l'autophagie puisque son interaction avec la protéine BECN1 est cruciale à l'initiation de l'autophagie (Yoshimori et Noda 2008).

L'interaction entre les deux protéines se fait via le domaine CC et le domaine EC de la protéine BECN1 et le domaine C2 de hVps34 (Backer 2008; Yoshimori et Noda 2008). Il a été suggéré que le PtdIns3P pourrait servir à la formation des VDM.

**Tableau 2 : Protéines autophagiques**

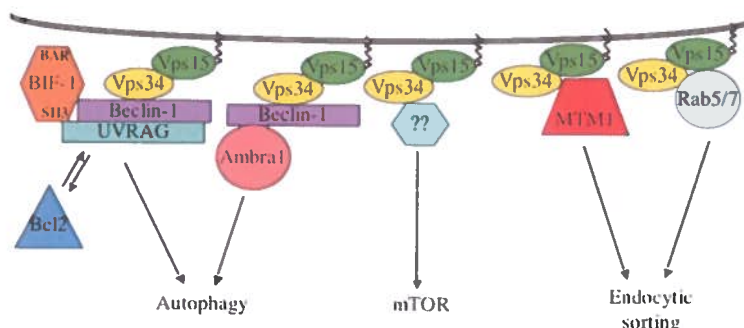
Protéines	Homologue levure	Fonctions
<i>Activation de l'autophagie</i>		
ULK1	Atg1	Sérine / Thréonine kinase importante pour l'activation de l'autophagie
ATG9	Atg9	Protéine transmembranaire qui voyage entre le réseau trans-golgien et l'endosome durant l'autophagie. Elle serait impliquée dans le transport
WIP149	Atg18	Localisée sur le réseau trans-golgien, l'endosome et les vésicules de clathrine et les vésicules autophagiques. Elle peut lier le PtdIns (3,4,5) P <sub>3</sub> et le PtdIns (4,5) P <sub>2</sub>
<i>Initiation de la vésicule</i>		
Beclin-1 (VPS30)	Atg6	Forme un complexe avec la protéine PI3K classe 3, P150, ULK1 et ATG9. Importante pour l'initiation des VDM. Elle est modulée par plusieurs protéines cellulaires.
PI3K classe 3	Vps34	Retrouvée dans le complexe d'initiation
P150	Vps15	Retrouvée dans le complexe d'initiation
<i>Élongation de la vésicule</i>		
LC3	Atg8	Retrouvée sur les VDM en élongation. Elle subit des modifications moléculaires et passe de la forme soluble (LC3 I) à la forme membranaire (LC3 II). Se retrouve dans le complexe ATG5-ATG12-ATG16. Responsable de l'élongation de la vésicule
ATG4	Atg4	Clivage de la partie C-terminale de la protéine LC3 et libère la glycine
ATG7	Atg7	Enzyme de type E1. Active les protéines LC3 et Atg12
ATG3	Atg3	Enzyme de type E2. Conjugaison du phosphatidyléthanolamine (PE) sur la glycine en position C-terminale de la protéine LC3
ATG12	Atg12	Impliquée dans le complexe d'élongation, elle se retrouve liée à la protéine ATG5
ATG10	Atg10	Enzyme de type E2. Conjugaison de la protéine ATG12 avec la protéine ATG5
ATG5	Atg5	Retrouvée uniquement sous la forme liée à ATG12
ATG16	Atg16	Lie le complexe ATG5-ATG12 et oligomérisé

(Modifié de Ploegh *et al.* 2008)

Ensuite, la protéine BECN1 peut aussi lier la protéine p150, aussi nommée hVps15 (figure 7). La protéine p150 semble aussi être une protéine de



la famille des kinases et aurait comme rôle d'activer la protéine hVps34 (Backer 2008; Yan *et al.* 2009). Cependant, il n'existe pas d'évidence claire à ce sujet et d'autres études devront être faites pour déterminer clairement le rôle de cette protéine. Pour l'instant, les études portant sur la protéine Vps15p (homologue chez la levure) semblent dire que celle-ci pourrait être importante pour la production de PtdIns3P par la protéine Vps34 (Backer 2008). Une abolition de la protéine p150 par ARN d'interférence conduirait à une diminution du niveau de protéine hVps34 ce qui laisse suggérer que la protéine p150 serait nécessaire à la stabilisation de la protéine hVps34 (Backer 2008; Yan *et al.* 2009). Le rôle précis de cette protéine reste tout de même inconnu.



**Figure 7 : Complexe d'initiation de l'autophagie**

La protéine centrale dans l'initiation de la formation des VDM est la protéine BECN1. Plusieurs autres protéines capables d'interagir avec la protéine BECN1, via différents domaines, seront en mesure de moduler son action. (Tiré de Backer 2008)

Bien qu'il y ait un consensus autour du fait que le complexe BECN1, hVps34 et p150 initie la formation des VDM, de plus en plus de nouvelles protéines capables d'interagir avec la protéine BECN1 et le complexe sont découvertes (figure 7). Comme il a été mentionné plus haut, BECN1 interagit avec la protéine Bcl-2 et son interaction régule négativement l'autophagie (Yoshimori et Noda 2008). Lorsque les cellules se retrouvent en situation de stress, comme en manque de nutriment, l'interaction entre Bcl-2 et BECN1 est réduite et l'autophagie est induite (Cao Y. et Klionsky 2007). Une autre protéine,

la protéine UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene protein), est connue pour interagir avec BECN1 via le domaine CC et favorise l'autophagie (Liang C. *et al.* 2006). Contrairement à l'interaction Bcl-2/BECN1, l'interaction entre UVRAG et BECN1 n'est pas affectée par le manque de nutriment. Par contre, l'abolition de son expression dans la cellule se définit par une baisse de l'activité autophagique (Yoshimori et Noda 2008). Ensuite, une protéine de la famille des endophilines, la protéine Bif-1 aussi connue sous le nom d'endophiline B1, lie UVRAG via son domaine SH3 (Takahashi *et al.* 2007). Comme cette protéine est connue pour courber différentes membranes d'organites, il a été suggéré que le complexe UVRAG/Bif-1 et le complexe BECN1/hVps34 et p150 soient à l'origine de la courbure de la membrane d'isolation (Yoshimori et Noda 2008). VPM1, une protéine transmembranaire peut lier la protéine BECN1 et toutes deux colocalisent sur les autophagosomes (Ropolo *et al.* 2007; Yoshimori et Noda 2008). Finalement, Ambra1, par sa liaison avec BECN1 active l'autophagie et son abolition inhibe l'autophagie, et ce même en situation de stress chimique ou physique. Alors que sa surexpression va induire l'autophagie et réduire la prolifération cellulaire (Fimia *et al.* 2007; Yoshimori et Noda 2008). Le lien entre l'ensemble de ces protéines et le complexe d'activation de l'autophagie reste à préciser.

#### 4.2.2 Expansion et complétion de la vésicule

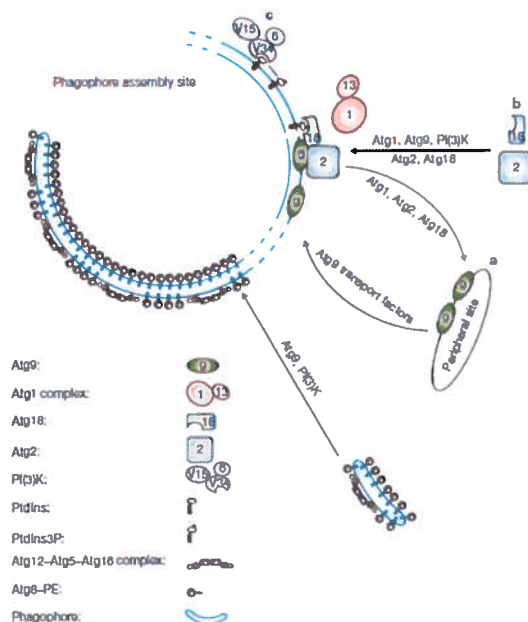
Une fois l'autophagie activée, il y aura élongation de la membrane d'isolation afin de générer un autophagosome (figure 6 et 8). Cette expansion est aussi assurée par un complexe formé des protéines autophagiques, ATG5, ATG12, ATG16 et LC3 (Mizushima *et al.* 1998a; Mizushima *et al.* 2003; Hanada *et al.* 2007). Un premier complexe comprenant ATG5, ATG12 et ATG16 est formé et se retrouve à la surface externe de l'autophagosome en devenir. Une fois le complexe associé à la membrane d'isolation via la protéine ATG5, la protéine d'autophagie LC3 subit une suite de modifications moléculaires qui lui

permettront d'assurer l'élongation et la complétion de la membrane d'isolation afin de générer l'autophagosome (Tanida *et al.* 2004b).

Tout d'abord, la protéine autophagique ATG5 se retrouve dans le cytoplasme, essentiellement sous la forme liée à ATG12 (Mizushima *et al.* 2001). La liaison des deux protéines suit le modèle de l'ubiquitinylation et deux enzymes sont nécessaires, l'enzyme d'activation ATG7 (E1 like enzyme) et l'enzyme de conjugaison ATG10 (E2 like enzyme) (Ohsumi et Mizushima 2004). Ainsi, la protéine ATG12 est d'abord activée par clivage et formation d'un lien thioester en portion C-terminale, à l'aide de la protéine ATG7. Elle est ensuite transférée à la protéine ATG10 qui procèdera à la conjugaison avec la protéine ATG5. La liaison se fait entre une glycine en position C-terminale de la protéine ATG12 et une lysine interne, en position 130, de la protéine ATG5 (Xie et Klionsky 2007). Les deux protéines sont conjuguées immédiatement après leur synthèse et cette liaison est irréversible (Mizushima *et al.* 2003; Xie et Klionsky 2007). Ce conjugué forme ensuite un complexe d'environ 800 kDa, par oligomérisation de quatre protéines ATG16, lesquelles interagissent avec la protéine ATG5 au site opposé d'interaction avec la protéine ATG12 (figure 3) (Mizushima *et al.* 2003; Xie et Klionsky 2007). La formation de ce complexe est essentielle à l'élongation de la membrane d'isolation. En effet, différentes études démontrent que l'élongation est abolie lorsqu'une de ces protéines est absente (Tanida *et al.* 2004b, 2004a).

Suite à la formation du complexe et à son association avec la membrane d'isolation, la protéine autophagique LC3 va aussi subir des modifications selon le modèle de l'ubiquitinylation, afin de générer la forme LC3 II qui se retrouve aux surfaces internes et externes de la membrane d'isolation (figure 6) (Mann et Hammarback 1994; Kabeya *et al.* 2000). Ainsi, la protéine LC3 soluble, nommée LC3-I, est retrouvée dans le cytoplasme et l'autophagie doit être activée pour générer la forme LC3-II qui sera alors redistribuée, après modification, à la

membrane des VDM. Une première enzyme d'activation, la protéine ATG7, aussi impliquée dans la formation du complexe ATG5-ATG12 et ATG16, va procéder à un premier clivage en portion C-terminale de la protéine LC3 et libérer une glycine. Cette glycine sera par la suite associée avec un



**Figure 8 : Site d'assemblage du phagosome**

Représentation de l'élargissement des VDM à partir du modèle de la levure. Voir tableau 2 pour les homologues chez l'humain et le détail des fonctions de chacune des protéines. Nous pouvons remarquer les deux complexes, soit celui de l'activation (v15/v34/6) et celui de l'élargissement (Atg12-Atg5-Atg16) ainsi que le rôle de Atg9 dans le transport. (Tiré de Xie et Klionsky 2007)

phosphatidyléthanolamine (PE) sous l'action de l'enzyme de conjugaison ATG3 (E2-like enzyme). La protéine LC3 associée au PE, génère la forme LC3 II et est responsable de l'élargissement. L'incapacité de générer cette forme de la protéine abolit l'élargissement. Ainsi, nous ne verrions que de petites structures en forme de croissant auxquelles serait lié le complexe ATG5-ATG12 et ATG16 (Mizushima *et al.* 2001). En plus d'être le constituant majeur des autophagosomes, LC3 est facilement induite suite à un stress, contrairement au complexe ATG5-ATG12-ATG16, et sa distribution passe de diffuse dans le cytoplasme à ponctuelle sur les membranes des VDM, ce qui en fait

une des composantes les plus utilisées pour étudier l'autophagie.

Une autre protéine importante dans la formation des VDM est la protéine ATG9, la seule protéine transmembranaire connue à ce jour (figure 8) (Webber *et al.* 2007; Xie et Klionsky 2007). Autant la région N-terminale que C-terminale de la protéine se retrouvent dans le cytoplasme. La protéine se compose de six domaines transmembranaires et sa localisation dans la cellule varie en fonction

de l'état de la cellule. On la retrouve associée au réseau trans-golgien (TGN) et aux endosomes tardifs, mais elle est capable de circuler entre ces deux organites et le phagophore (Young *et al.* 2006; Xie et Klionsky 2007). D'autre part, elle serait en mesure d'interagir autant avec le complexe d'activation qu'avec le complexe d'élongation de l'autophagie (Young *et al.* 2006; He *et al.* 2009). Comme celle-ci peut circuler dans les deux sens, entre le TGN, l'endosome tardif et le phagophore, son expression est importante à la formation des VDM. D'autant plus qu'elle est connue pour interagir avec le *PdtIns3P*, produit de la hVps34 (Webber *et al.* 2007). On lui attribue donc un rôle de transport des différents complexes et lipides nécessaires à l'élongation de la membrane d'isolation (figure 8) (Xie et Klionsky 2007). Son abolition empêche par le fait même le transfert du complexe d'élongation à la membrane d'isolation (Reggiori 2006; Young *et al.* 2006). D'autres protéines autophagiques sont indispensables à son activité, telles que ULK1 et WIPI49. ULK1 (homologue d'Atg1) est connue pour interagir avec le complexe d'activation et la perte de ULK1 par ARN d'interférence séquestre ATG9 au TGN (Webber *et al.* 2007; Xie et Klionsky 2007) tandis que l'homologue de la protéine ATG18, WIPI49, est étudié pour sa capacité à lier le *PdtIns3P* et le *PdtIns(3,5)P<sub>2</sub>* et est localisé sur le TGN, l'endosome et les vésicules de clathrine (Webber *et al.* 2007).

#### 4.2.3 Ancrage, fusion avec le lysosome et dégradation

Une fois l'autophagosome formé, seule la protéine LC3 II est retrouvée aux surfaces interne et externe. Tous les autres complexes sont dissociés et la vésicule est dirigée vers le lysosome via les microtubules (figure 3). Dès que la vésicule rejoint le lysosome, il y a fusion de la membrane externe de l'autophagosome avec celle du lysosome. Cette fusion requiert les protéines GTPase de la famille Rab, les protéines SNAREs, la protéine Lamp-2 (Fortunato *et al.* 2009) ainsi que les protéines motrices du cytosquelette telles que les dynéines (Yamamoto *et al.* 2009). Ainsi, un autophagolysosome est obtenu (figure 3). L'autophagosome se retrouve donc à l'intérieur du lysosome et les

hydrolases lysosomiales vont dégrader la membrane interne et ensuite le contenu. Les composantes dégradées seront redistribuées parmi les différents cycles cellulaires afin de générer de l'énergie, de nouvelles protéines ou de nouveaux organites.

#### 4.3 Modulation de l'autophagie

L'autophagie est régulée par la protéine kinase mTOR (mammalian target of rapamycine) (figure 9) qui fait partie de la famille des phosphatidylinositol kinase et agit comme une sérine/thréonine kinase (Raught *et al.* 2001; Pattingre *et al.* 2008; Eskelinen et Saftig 2009; Thomson A. W. *et al.* 2009). En plus de réguler l'autophagie, mTOR régule aussi l'initiation et l'élongation de la traduction, la biosynthèse des ribosomes, la transcription de plusieurs enzymes impliqués dans différentes voies métaboliques et l'importation d'acides aminés (Raught *et al.* 2001). Ainsi, plusieurs effecteurs situés en amont peuvent réguler mTOR, qui à son tour pourra réguler différents effecteurs placés en aval en fonction des besoins de la cellule (Thomson A. W. *et al.* 2009). Deux complexes comprenant mTOR existent, mTOR complexe 1 (mTORC1) et mTORC2 (figure 9). Ces deux complexes régulent différentes voies et sont modulés via différents stimuli. Il existe des relations distinctes entre les effecteurs en amont et en aval, ainsi qu'entre les deux complexes eux-mêmes. De plus, mTORC1 est sensible à la rapamycine alors que mTORC2 ne l'est pas. Nous allons nous concentrer sur le mécanisme d'action du complexe mTORC1 puisqu'il est en mesure de réguler l'activité autophagique (Pattingre *et al.* 2008; Thomson A. W. *et al.* 2009).

Ainsi, lorsque mTORC1 est activé, l'autophagie est inhibée et vice-versa (figure 9). Parmi les effecteurs qui inhibent l'activité de mTORC1, le complexe TSC1 et TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 et 2) lorsqu'activé par différents stimuli tels que le manque de nutriment, le manque d'énergie, différents stress cellulaires et une accumulation de dommages dans l'ADN, inhibera l'activité de mTORC1. L'inhibition de mTORC1 aura pour effet d'activer l'autophagie,

d'inhiber la prolifération cellulaire et d'inhiber la traduction d'ARNm. Le complexe TSC1/TSC2 inhibe l'activation de mTORC1 en agissant sur l'activation de la protéine stimulatrice de mTORC1, la protéine GTPase Rheb. Au contraire, la présence de facteurs de croissance, de certaines cytokines, de costimulateurs et de récepteurs à l'antigène, activera mTORC1 et inhibera l'autophagie. Dans ce cas-ci, le stimulus induit l'activation d'une kinase de classe un, la phosphatidylinositol 3 kinase (PI-3K), qui à son tour active les protéines PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein Kinase 1) et AKT qui finalement, inhibent l'activité inhibitrice du complexe TSC1/TSC2 par phosphorylation de celui-ci. Il y aura donc prolifération cellulaire et traduction d'ARNm. L'activation de la voie RAS-MAPK (mitogen-activated protein kinase) va aussi inhiber le complexe TSC1/TSC2.

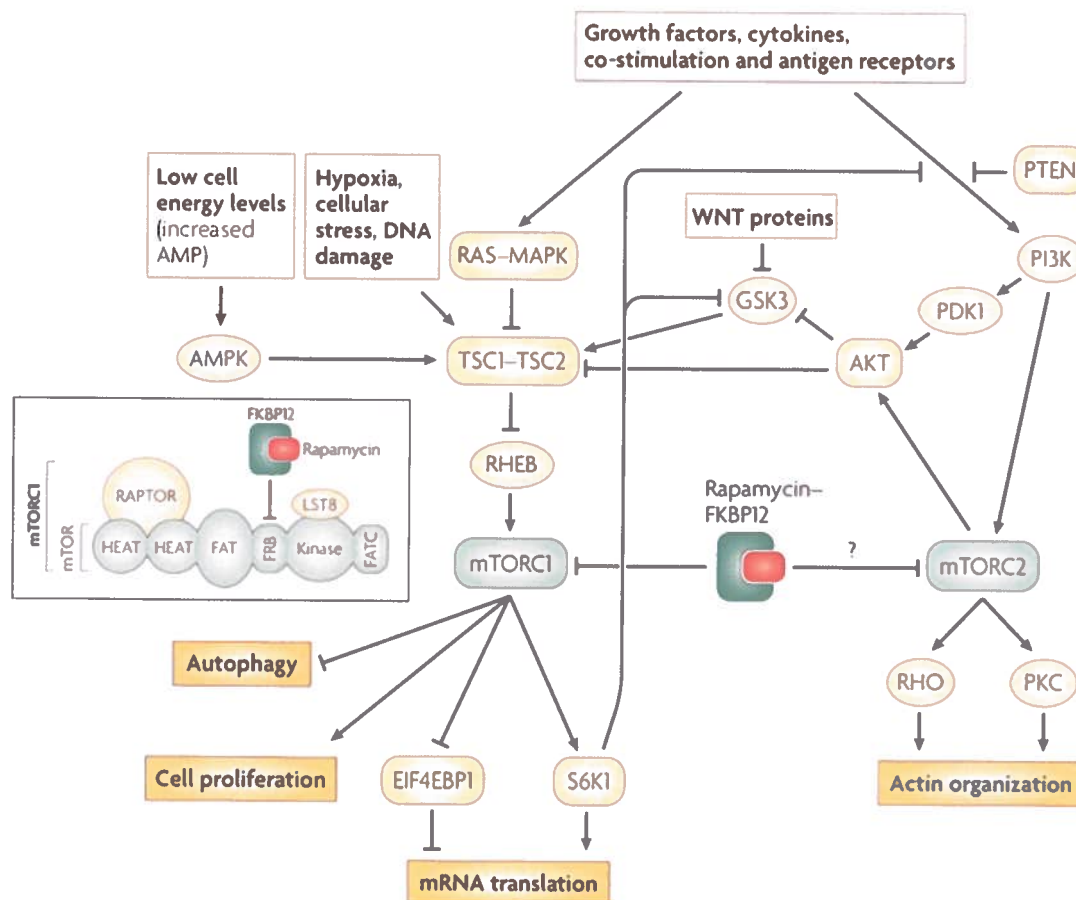
L'inhibition du complexe mTORC1 induit l'activité autophagique dans la cellule, mais le mécanisme précis par lequel cette activation est produite reste à préciser. Chez la levure, il est connu que l'inhibition de mTOR diminue la phosphorylation de la protéine ATG13 lui permettant de s'associer avec la protéine ATG1 et ATG17 pour induire la formation du complexe BECN1 (figure 6). D'autre part, lorsque mTOR est inactivée par l'ajout d'un composé chimique, telle la rapamycine, l'autophagie est fortement activée dans les cellules et le contraire est aussi observé. mTOR joue donc un rôle primordial dans l'activation de l'autophagie (Pattingre *et al.* 2008; Thomson A. W. *et al.* 2009).

Il existe plusieurs composés chimiques utilisés à ce jour pour moduler l'activité autophagique. Parmi ceux-ci, la rapamycine, le tamoxifen, le temozolomide, la  $\gamma$ -irradiation, le trioxyde d'arsenic et bien d'autres induiront l'autophagie alors que le 3-méthyladénine, la bafilomycine A, la monensine et l'ARN d'interférence contre les protéines ATG5, BECN1, ATG10 et ATG12 inhiberont l'autophagie. Tous ces composés sont entre autres utilisés dans la thérapie contre les cancers et ils ont tous des cibles différentes dans la cellule

(Kondo *et al.* 2005). De ce fait, l'activation et l'inhibition de l'autophagie sont loin d'être simples et de plus en plus de nouvelles voies sont découvertes et semblent avoir un effet sur son activité. Les deux composés les plus utilisés dans l'étude de l'autophagie sont la rapamycine et le 3-Méthyladénine (figure 6 et 9).

La rapamycine est un composé de type macrolide lipophile qui lie la FK506 binding protein 12 (FKBP12). Une fois lié à la FKBP12, le complexe lie le complexe mTORC1 et empêche son activation, ce qui augmente l'activité autophagique dans la cellule (figure 6 et 9). Tandis que le 3-méthyladénine (3-MA) est un inhibiteur de phosphatidylinositol de classe trois et agit plutôt sur la formation du complexe d'initiation des VDM. Il agit comme un inhibiteur compétitif de l'ATP. Lorsque celui-ci est utilisé, la formation du complexe est inhibée et par le fait même, aucune vésicule autophagique n'est observable, et ce, même si les cellules sont placées en manque de nutriment (figure 6) (Rubinsztein *et al.* 2007).





**Figure 9 : Régulation de l'autophagie via mTOR**

mTOR est une kinase d'environ 289KDa, qui comme les autres membres de la famille des phosphoinositides Kinase associés aux Kinases (PIKK), contient un domaine sérine/Thréonine Kinase en portion C-terminale. Elle contient aussi un domaine FAT (FRAP-AMT-TTRAP) et un FAT (FATC) domaine toujours en région C-terminale, ayant comme rôle de stabiliser le complexe. mTOR est associée avec la protéine Raptor et LST8 qui leur sert de régulateur. Finalement, elle pourra effectuer plusieurs autres interactions avec d'autres protéines, qui détermineront son rôle physiologique. Elle est inactivée en présence de dommages dans l'ADN, en absence de nutriment, en présence de stress cellulaire et lorsqu'il y a un faible niveau d'énergie dans la cellule menant à l'activation de l'autophagie. Elle est activée par la présence de facteurs de croissance, de protéines de co-stimulation, de cytokines et de récepteurs à l'antigène. Son activité est déterminée par l'action du complexe TSC1/TSC2. Si celui-ci est activé, il inhibe le complexe mTORC1 et vice-versa. (Tiré de Thomson *et al.* 2009)

## 5. Virus et autophagie

De plus en plus d'interactions entre les virus et le phénomène d'autophagie sont découvert. Le tableau trois présente un résumé des interactions observées jusqu'à ce jour. Pour la majorité des virus étudiés, ces interactions vont mener soit à une augmentation du titre viral soit à une diminution du titre viral. De plus, afin de contrer la xénophagie, quelques virus ont élaboré des mécanismes capables d'inhiber l'autophagie dans la cellule et ainsi assurer leur survie. Nous verrons plus en détail l'effet sur la réplication virale de certains de ces mécanismes. Étant donné que les études commencent à ce sujet, il reste encore bien des évidences à établir.

### 5.1 Virus qui en tirent avantage

#### *Poliovirus et Rhinovirus*

Ces deux virus appartiennent à la famille des Picornavirus. Leur génome est composé d'un ARN simple brin de polarité positive et ce sont des virus de type lytique (Daley *et al.* 2005). Le virus de la polio est responsable de la poliomyélite alors que le rhume commun chez l'humain est souvent causé par un Rhinovirus. Dans les cellules infectées par l'un ou l'autre de ces virus, une augmentation significative du nombre de VDM issues de l'autophagie est observée (figure 10 A) (Suhy *et al.* 2000). Cette observation se fait tôt après l'infection et est abolie si l'autophagie est inhibée. Ainsi, les études ont pu déterminer que les protéines 2BC et 3A du poliovirus sont suffisantes à l'induction des VDM dans les cellules (Suhy *et al.* 2000; Taylor et Kirkegaard 2007). De ce fait, il a été suggéré que ces deux virus utilisent les VDM comme charpente pour la réplication de leur génome. En effet, d'autres études effectuées à l'aide d'ARN d'interférence dirigé contre les protéines autophagiques LC3 et ATG12 ont démontré que ces VDM étaient essentielles à la réplication de ces virus puisque leur abolition diminue autant le titre viral intracellulaire qu'extracellulaire (Schmid *et al.* 2006; Espert *et al.* 2007).

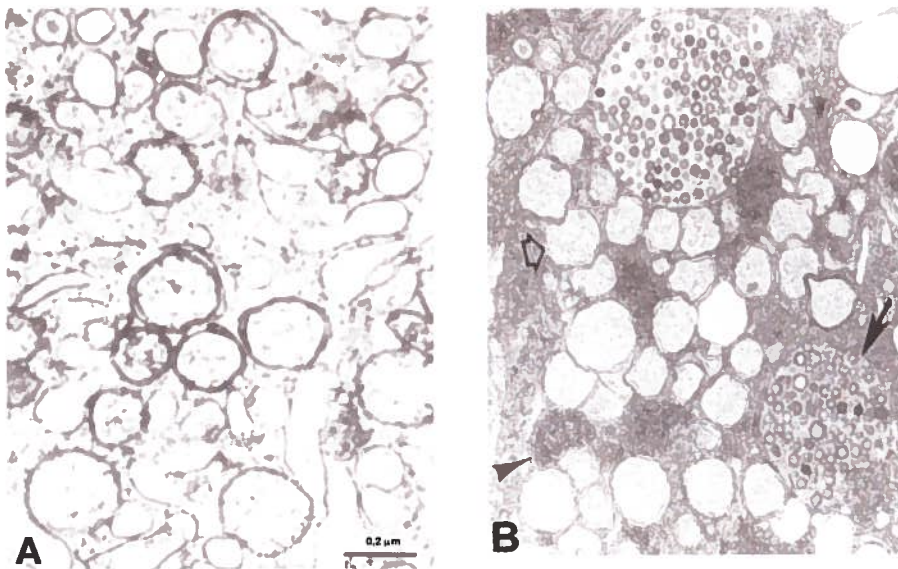
**Tableau 3 : Tableau résumé des relations observées entre les virus et l'autophagie**

Famille	Génome	Virus	Protéine virale impliquée	Présence d'autophagosome	Effet biologique associé à l'autophagie	Effet sur la réplication virale
Tobamovirus		TMV	?	+	Activation de l'autophagie comme mécanisme de survie cellulaire et pour empêcher la propagation du virus.	Diminution
Picornavirus		Poliovirus	2BC	+	Induit la formation d'autophagosomes (VDM).	Augmentation
		Rhinovirus	3A			
Rétrovirus	ARNsb	HIV-1	Env	+	Induit la mort programmée de type II dans les cellules T CD4 <sup>+</sup> non infectées	?
Togavirus		Sindbis virus	?	?		Diminution
Coronavirus		MHV	?	+		Augmentation
		SRAS	?			
Flavivirus		BVDV	NS3	?	Insertion d'une partie de LC3 dans la polyprotéine	Expression d'une nouvelle protéine virale
		DENV-2	?	+	Induit la formation d'autophagosomes (VDM).	Augmentation
		DENV-3	?	+		Augmentation
Herpes	ADNdb	HSV-1	ICP34.5	-	Inhibition de l'autophagie par liaison avec la protéine BECN1	L'inhibition de l'autophagie augmente le titre viral
		KSH	vBcl-2			
		γM68	M11			
	Cytomégalovirus	?				
Réovirus		Rotavirus	NSP4	+	?	?
Parvovirus	ADNsb	B19	?	+	Activation de l'autophagie comme mécanisme de survie cellulaire	Augmentation

 (Modifié de Espert *et al.* 2007)

### MHV et SRAS

Le virus de l'hépatite murine (MHV) et le virus du syndrome respiratoire sévère aigu (SRAS) sont deux autres virus à ARN simple brin pour lesquels l'autophagie agit de façon positive sur leur réplication. Ils font partie de la famille des Coronavirus et ont plusieurs similitudes avec le virus de l'hépatite C (Prentice *et al.* 2004). Ce sont des virus enveloppés et leur réplication se fait entièrement dans le cytoplasme. Une colocalisation entre la protéine autophagique LC3 et certaines protéines virales impliquées dans le complexe de réplication du MHV a été observée (Prentice *et al.* 2004). L'utilisation des VDM



**Figure 10 : Observation de VDM en microscopie électronique.**

(A) Induction de l'autophagie suite à l'infection par le virus de la polio dans la lignée cellulaire cos-1 (D'après Suhy *et al.* 2000) (B) Induction de l'autophagie par le virus du syndrome respiratoire sévère aigu (SRAS) dans la lignée cellulaire Vero E6. La flèche blanche pointe des VDM et la flèche noire pointe une vésicule contenant des nucléocapsides du SARS (D'après Goldsmith *et al.* 2004)

comme lieu de réplication du génome viral est l'hypothèse la plus probable, d'autant plus qu'une abolition de la production de la protéine autophagique ATG5, chez la souris, diminue d'au moins 1000 fois le titre viral extracellulaire. Une restauration de l'autophagie par l'ajout de protéine ATG5 exogène est en mesure de rétablir du titre viral dans les souris ATG5<sup>-/-</sup> à un niveau semblable

aux souris ATG5<sup>+/+</sup> (Prentice *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006; Espert *et al.* 2007). Récemment, des images de microscopie électronique effectuées tôt après l'infection par le SRAS ont démontré la présence de nombreuses VDM (figure 10 B) (Goldsmith *et al.* 2004; Snijder *et al.* 2006; Espert *et al.* 2007).

### *BVDV et DENV*

Le virus de la diarrhée virale bovine et celui de la fièvre de la dengue font partie de la même famille que le VHC, soit la famille des Flaviviridae. Le virus de la fièvre de la dengue cause généralement une infection fébrile bénigne, cependant, dans certains cas, celle-ci peut dégénérer en fièvre hémorragique et causer la mort. Il existe quatre virus distincts de la fièvre de la dengue nommés DENV-1 à DENV-4 (Khakpoor *et al.* 2009). Deux parmi ceux-ci ont fait l'objet d'études afin de déterminer l'influence de l'autophagie sur leur réplication soit le DENV-2 et le DENV-3. L'inhibition de l'autophagie diminue le titre viral autant pour le DENV-2 que le DENV-3 (Khakpoor *et al.* 2009). Dans les deux cas, on observe une colocalisation des protéines virales avec celles de l'autophagosome (LC3). Les conclusions de ces études proposent que le virus utilise la membrane des autophagosomes comme site de réplication du virus. Par contre, le DENV-2 utilise les VDM non associées au lysosome alors que le DENV-3 utilise autant les autophagosomes que les autophagolysosomes pour sa réplication (Lee Y. R. *et al.* 2008; Khakpoor *et al.* 2009; Panyasrivanit *et al.* 2009). Ceci fut démontré par l'équipe de Khakpoor dont les résultats démontrent que l'ajout de L-asparagine (L-Asn), un inhibiteur de la fusion entre le lysosome et l'autophagosome, diminue le titre viral intracellulaire et extracellulaire de DENV-3. Cependant, chez le DENV-2, l'utilisation de L-Asn augmente considérablement le titre viral intracellulaire et extracellulaire (Khakpoor *et al.* 2009).

Le BVDV, contrairement aux virus de la polio, au rhinovirus, au MHV et au SRAS, n'utilise pas les VDM comme charpente pour la réplication de son génome. Dans ce cas-ci, une insertion d'une séquence de la protéine LC3 dans

la polyprotéine virale conduit à l'expression d'une nouvelle protéine virale, la protéine NS3. Cette protéine est générée par protéolyse à l'aide de la protéine cellulaire autophagique ATG4. L'expression de NS3 génère la forme cytopathogène du virus (Fricke *et al.* 2004).

### **B19**

Le virus B19 de la famille des parvovirus détient un génome d'ADN simple brin et cause l'anémie aplasique (Nakashima *et al.* 2006). Durant son cycle de réplication, le virus induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et en phase G2/M. De plus, il induit l'apoptose par l'expression de la protéine virale NS1 (Moffatt *et al.* 1998). Des études récentes ont montré que l'autophagie était induite dans les cellules infectées et arrêtés en phase G2. Cette activation de l'autophagie serait nécessaire à la complétion du cycle viral en maintenant les cellules en vie. Ainsi, le virus B19 activerait l'autophagie en phase G2 du cycle cellulaire lors de l'infection dans le but de permettre la multiplication virale avant la mort par apoptose de la cellule (Nakashima *et al.* 2006).

## 5.2 Virus qui inhibent le phénomène

Bien que l'autophagie soit avantageuse pour certains virus, il n'en demeure pas moins qu'elle joue un rôle important dans l'immunité, ce qui a mené à une adaptation des virus afin de contrer le phénomène de xénophagie et ainsi poursuivre leur cycle viral. Parmi ceux-ci, figurent plusieurs virus de la famille des herpesviridae, le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV), le gammaherpesvirus 68 de la souris ( $\gamma$ HV68) et le cytomégalovirus humain (CMV) (Schmid *et al.* 2006; Orvedahl *et al.* 2007; Sinha *et al.* 2008). Tous sont en mesure d'échapper à la xénophagie en empêchant soit la formation des VDM soit l'activation du phénomène.

Premièrement, HSV-1, un virus herpès de la sous-famille des Alphaherpesviridae, exprime la protéine ICP34.5 (infected cell protein 34.5), un facteur de virulence neurologique, qui inhibe l'autophagie en liant la protéine BECN1 et en agissant comme un antagoniste du PKR (Schmid *et al.* 2006; Orvedahl *et al.* 2007). En effet, l'étude démontre qu'un mutant exprimant la protéine ICP34.5, où le domaine de liaison à la protéine BECN1 est absent, est incapable de produire une encéphalite létale chez la souris de type sauvage. Par contre, la virulence neurologique est restaurée chez les souris PKR<sup>-/-</sup> (Schmid *et al.* 2006; Orvedahl *et al.* 2007; Shoji-Kawata et Levine 2009).

Deuxièmement, les virus herpès de la sous-famille des Gammaherpesviridae, tels que l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV) et le gammaherpesvirus 68 de la souris, codent pour une protéine homologue de Bcl2. KSHV exprime la protéine vBcl2 et  $\gamma$ HV68 exprime la protéine M11. On ne connaît pas encore l'importance sur leur réplication d'une abolition de l'autophagie, cependant il est important de noter que ceux-ci sont tous deux des virus oncogènes et que BECN1 fut d'abord identifié comme un gène suppresseur de tumeur (Sinha *et al.* 2008).

Finalement, pour le cytomégalovirus (CMV), membre de la sous-famille des Bétaherpesviridae, plusieurs études démontrent qu'il est en mesure de réguler à la baisse l'activité autophagique de la cellule en activant mTOR, mais le mécanisme précis reste inconnu (Schmid *et al.* 2006; Chaumorcel *et al.* 2008; Shoji-Kawata et Levine 2009).

### 5.3 VHC et autophagie

Deux études publiées dans la dernière année ont pu établir un lien entre le VHC et l'autophagie. La première étude faite par l'équipe de Malika Ait-Goughoulte, publiée en mars 2008, démontre que l'autophagie est induite suite à l'infection par le VHC. Les résultats de cette étude ont été obtenus avec le

génotype 1a du VHC (le clone H77), dans les lignées cellulaires Huh-7,5 et IHH (immortalized human hepatocytes) (Ait-Goughoulte *et al.* 2008). Suite à l'infection, ils ont démontré par microscopie électronique la présence de VDM dans les cellules. Cependant, aucune colocalisation n'a été observée entre les protéines autophagiques ATG5, LC3 et les protéines virales Core, NS4 et NS3. Selon Ait-Goughoulte et son équipe, l'induction de l'autophagie suite à l'infection par le clone H77 ne sert pas à la réplication du virus. Plusieurs hypothèses ont été émises, notamment que l'infection par le VHC compromet l'immunité innée et la voie de l'interféron, qui est impliqué dans l'activation de l'autophagie. Le stress du réticulum endoplasmique lié à l'infection par le VHC pourrait aussi induire l'activation de l'autophagie (Ait-Goughoulte *et al.* 2008). Leurs recherches ne permettent pas de répondre à ces hypothèses mais elles ne démontrent qu'une augmentation de l'activité autophagique suite à l'infection.

En octobre 2008, l'équipe de Dona Sir publie à son tour un article démontrant l'activation de l'autophagie suite à l'infection par le VHC. Tous leurs résultats sont obtenus avec le génotype 2a, le clone JFH-1, dans la lignée cellulaire Huh-7,5 par électroporation d'ARN (Sir *et al.* 2008a; Sir *et al.* 2008b). Les conclusions de leurs recherches proposent que la réplication du VHC induit la formation de VDM et empêche la liaison entre les VDM induites et le lysosome. Toujours selon l'équipe de Sir, l'induction des VDM après électroporation de l'ARN viral serait médiée par la voie des protéines mal repliées (UPR unfolded protein response). En effet, ils démontrent dans leurs résultats que l'infection par le VHC induit un stress du réticulum endoplasmique qui se traduit par une activation des trois voies associées à la dégradation des protéines mal repliées et que l'activation de ces voies mène à l'activation de l'autophagie. Ensuite, leurs résultats confirment l'importance de l'activation de la voie UPR pour la réplication du VHC. En utilisant la technique d'ARN d'interférence dirigée contre les protéines PERK, IRE1 et ATF6 qui sont les trois voies possibles d'activation de la voie UPR, Sir et son équipe démontrent que la



réplication intracellulaire du VHC est diminuée. Les conclusions de cette recherche sont que le VHC induit l'autophagie via la voie des protéines mal repliés, mais que cette activation n'est pas complète puisqu'il n'y a pas d'augmentation au niveau de la dégradation de protéines dans la cellule, ce qui est confirmé par l'incapacité des VDM à lier le lysosome (Sir *et al.* 2008a; Sir *et al.* 2008b).

# **PROBLÉMATIQUE**

Le lieu de réplication du VHC n'est toujours pas connu. Plusieurs hypothèses demeurent encore à l'étude. Par exemple, on suppose que le complexe de réplication serait assemblé sur le réseau de petites vésicules membranaires (membranous web), sur les radeaux lipidiques (lipid raft) ou encore sur des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique. Depuis 2005, il est possible d'étudier le cycle complet de réplication du VHC en culture cellulaire. La possibilité de produire du virus en culture cellulaire a facilité les recherches *in vitro*. Par contre, le site précis d'assemblage du complexe de réplication reste encore indéterminé. Cependant, les dernières années ont vu naître un essor considérable d'études sur l'autophagie, un phénomène de recyclage intracellulaire important dans l'homéostasie cellulaire. Bon nombre de ces études ont démontré un lien entre la réplication de certains virus à ARN et le phénomène d'autophagie. En effet, il a été démontré pour plusieurs de ces virus tels que le virus de la polio, le virus de la dengue, le virus de l'artérite équine, le SRAS et le virus de l'hépatite murine (MHV), que le site de réplication du génome se situe sur les vésicules à double membrane lipidique produites durant le phénomène d'autophagie.

Étant donné que le VHC est fortement apparenté à certains de ces virus et que le site de réplication du génome n'est toujours pas identifié, nous avons émis comme hypothèse que **le VHC utilise les autophagosomes formés durant l'autophagie pour sa réplication**. Afin de tester notre hypothèse, nous avons d'abord regardé le niveau d'autophagie suite à l'infection par le VHC. Ensuite, nous avons regardé l'effet d'une abolition ou d'une induction de l'autophagie sur la réplication du VHC. Finalement, nous avons regardé s'il existait une interaction entre les protéines du virus et celles de l'autophagie.

# MÉTHODOLOGIE

## 1. Cellules et virus

### 1.1 Lignées cellulaires

Les cellules Huh-7, une lignée de cellules hépatiques provenant d'un hépatocarcinome humain, ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) enrichi à dix pourcents de sérum de veau (FBS), à 50 unités/ml de pénicilline G, à 50 µg/ml de streptomycine (Pen/Strep), à 1X de sodium pyruvate et à 1X d'acides aminés non essentiels (MEM NEAA 100X, Invitrogen # Cat : 11140). Les cellules ont été maintenues en culture dans un environnement de 37°C, à cinq pourcents de CO<sub>2</sub>. À confluence d'environ 95 %, elles ont été passées dans un ratio de 1 : 6 à l'aide de trypsine/EDTA et du milieu de culture.

### 1.2 Production de virus

Les virus ont été produits par électroporation de transcrits d'ARN JFH-1 dans les cellules Huh-7 (Guevin *et al.* 2009). Pour ce faire, les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine/EDTA et culottées par centrifugation à 400 g pendant cinq minutes. Elles ont été lavées deux fois dans un milieu sans sérum (OptiMem-1, Invitrogen) avant d'être suspendues à une concentration finale de  $1 \times 10^7$  cellules/ml. Dans une cuvette de 0,4 mm, dix microgrammes d'ARN ont été ajoutés à 400 µl de cellules et une seule impulsion de 0,27 kV, 100 OHMS, 960 µF a été donnée via le « Gene Pulser system » (BioRad Laboratoires, Hercules, CA). Finalement, les cellules ont été gardées en culture durant 60 jours et le surnageant a été récolté après expansion des cellules dans un flacon de culture cellulaire de 175 cm<sup>2</sup> (F175) et conservé à -80°C sous l'appellation JFH1<sup>67</sup>.

## 2. Inducteurs et inhibiteurs de l'autophagie

### 2.1 Inducteurs

#### 2.1.1 Milieu pauvre en nutriment

Le milieu pauvre en nutriment a été préparé frais et consistait en une solution de base Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, Invitrogen, # Cat : 14155) de  $\text{CaCl}_2$  1,26 mM et  $\text{MgCl}_2$  0,493 mM. Avant chaque induction avec le milieu pauvre, les cellules ont été lavées au DPBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Sulfate, Invitrogen) pour retirer toute trace de nutriments. Ensuite, les cellules ont été recouvertes du milieu pauvre et incubées à 37°C et cinq pourcents de  $\text{CO}_2$  pendant trois heures.

#### 2.1.2 Rapamycine

Deux solutions-mères de rapamycine (LC Laboratories, # cat : R-5000) ont été préparées et conservées à -20°C, l'une de 50 mM et l'autre de 50  $\mu\text{M}$ . La solution de 50 mM a été obtenue par dissolution de cinq milligrammes de rapamycine dans 109,4  $\mu\text{l}$  de DMSO. La solution de 50  $\mu\text{M}$  a été obtenue par dilution d'un microlitre de la solution à 50 mM dans un millilitre d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée. La rapamycine a été ajoutée directement dans le milieu de culture à une concentration finale de 50 nM pour les inductions de trois jours et 50  $\mu\text{M}$  pour les inductions de trois heures.

### 2.2 Inhibiteurs

#### 2.2.1 3-Méthyladénine

Comme inhibiteur de l'autophagie, nous avons utilisé le 3-méthyladénine (3-MA). La solution-mère de 3-MA d'une concentration de 200 mM et conservée à -20°C a été obtenue par dissolution de 29,83 mg de 3-MA dans un millilitre d'eau distillée et chauffée à 100°C pendant environ cinq minutes ou jusqu'à dissolution complète. La solution-mère a dû être chauffée avant chaque

utilisation puisque le 3-MA précipite à température pièce. L'inhibition a été obtenue par ajout de 3-MA directement dans le milieu de culture à une concentration finale de dix millimolaire pendant trois heures ou cinq millimolaire pendant trois jours.

### 2.2.2 Inhibiteur du lysosome (E64D)

Un inhibiteur d'hydrolases lysosomiales, le E64D, a été utilisé. Il a permis l'accumulation des vésicules autophagiques dans la cellule en empêchant leur fusion et donc leur dégradation par le lysosome. Cet inhibiteur a permis la visualisation de la protéine autophagique LC3 II par immunobuvardage et a facilité l'observation des vésicules à double membrane en microscopie électronique. Il a été utilisé à dix microgrammes par millilitre pendant quatre heures avant le conditionnement des cellules avec les composés chimiques.

## 3. Immunobuvardage de type western

### 3.1 Préparation des échantillons

Les cellules ayant atteint la confluence dans un plateau de culture de six puits ou dans un flacon de culture cellulaire de 75 cm<sup>2</sup> (F75) ont été récoltées après un lavage au DPBS 1X par l'ajout de tampon RIPA (50 mM Tris-HCL à pH 7,4, 1 % NP40, 1 % SDS, 150 mM NaCl et 1 mM EDTA) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase à raison d'une tablette par dix millilitres (Complete Mini, EDTA -free, Roche). Les échantillons de cellules ainsi récoltés ont été centrifugés à 12 000 g pendant 20 minutes à quatre degrés Celsius afin de précipiter l'ADN et les membranes. Le surnageant a été dosé à l'aide d'une trousse de détection utilisant l'albumine comme protéine étalon (BSA) (BCA Protein Assay Kit, Pierce).

### 3.2 Anticorps

Tous les anticorps primaires et secondaires ont été incubés dans une solution de PBS 1X (8 g NaCl, 0,61 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl et 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1L H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) à cinq pourcents de lait et 0,2 % de Tween-20. Afin de marquer pour la protéine virale NS5A, un anticorps polyclonal de lapin anti-NS5A a été utilisé à une dilution de 1 : 2000 et un anticorps secondaire de chèvre reconnaissant les chaînes lourdes et légères des IgG du lapin et couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (Jackson immunoResearch # cat : 111-035-003) a été utilisé à une dilution de 1 : 10000. Pour les protéines autophagiques, les anticorps de lapin anti-ATG5 (dilué 1/1000), anti-ATG7 (dilué à 1 : 2000, ProSci incorporated # cat : 3617), anti-ATG12 (dilué 1 : 200, Cell Signaling # cat : 2010), et anti-LC3 (dilué 1 : 1000, MBL # Cat : PD014) ont été utilisés, ainsi que l'anticorps provenant de la chèvre, anti-BECN1 (1 : 1000, Santa Cruz # cat : sc-10086). Les anticorps secondaires couplés à la HRP, reconnaissant les chaînes lourdes et légères des IgG de lapin et de chèvre, ont été utilisés à une dilution de 1 : 10000 et 1 : 100000 pour l'anti-IgG de lapin et 1 : 100000 pour l'anti-IgG de chèvre (Jackson immunoResearch # cat : 705-035-003). Afin de normaliser les échantillons entre eux, l'actine a été utilisée comme marqueur de protéine cellulaire (Sigma # cat : A5441). L'actine a été marquée à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-actine, utilisée à une dilution de 1 : 5000. Un anticorps secondaire couplé à la HRP, reconnaissant les chaînes lourdes et légères des IgG de souris a été utilisé à une dilution de 1 : 20000 (Thermo Scientific # cat : 31430).

### 3.3 Immunobuvardage

Après que les volumes de lysats eurent été déterminés, les échantillons ont été préparés par ajout de tampon de chargement dans une proportion de deux volumes d'échantillons pour un volume de tampon de chargement. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant quatre minutes et centrifugés une minute à 13000 rpm. Pour la protéine autophagique LC3, les échantillons ont été



chargés dans un gel d'acrylamide dénaturant à 16 %. Pour les autres protéines (NS5A, ATG5, ATG7, ATG12, BECN1), les échantillons ont été chargés dans un gel d'acrylamide dénaturant à 12 %. Dans tous les cas, les protéines ont été séparées par électrophorèse dans un tampon de migration (3 g de Tris, 14,4 g de glycine et 1 g de SDS dans 1L H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) pendant 60 minutes à 174 volts. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) par transfert semi-sec à l'aide d'un « Trans-Blot SD semi-dry transfer cell » (Biorad # cat : 170-3940) en présence du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Methanol et 0,1 % SDS) pendant 45 minutes à 25 volts.

**Tableau 4 : Résumé des anticorps d'immunobuvardage de type western**

Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution	Révélation
Anti-ATG5	1 : 1000	Anti-lappin (Jackson <i>et al.</i> )	1 : 10 000	Pico ~ 3 minutes
Anti-ATG7	1 : 2000		1 : 100 000	Dura ~ 10 secondes
Anti-ATG12	1 : 200		1 : 10 000	Pico ~ 20 minutes
Anti-LC3	1 : 1000		1 : 10 000	Pico ~ 1 minute
Anti-NS5A	1 : 2000		1 : 10 000	Pico ~ 1 minute
Anti-BECN1	1 : 1000	Anti-chèvre (Jackson <i>et al.</i> )	1 : 100 000	Dura ~ 1 minute
Anti-Actine	1 : 3000	Anti-souris (Pierce)	1 : 10 000	Pico ~ 5 secondes

Pico : « SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate » Dura : « SuperSignal West Dura »

Ensuite, les membranes ont été plongées dans une solution de PBS 1X à cinq pourcents de lait et 0,2 % de Tween-20 pendant une heure à température pièce ou bien toute la nuit à quatre degrés Celsius, afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques à l'anticorps primaire. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire sous agitation constante durant toute la nuit à quatre degrés Celsius. Après avoir fait quatre à six lavages de six minutes au PBS 1X avec 0,2 % de Tween-20, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire pendant une heure à température pièce, sous agitation constante. Une autre série de lavages de six minutes a été effectuée avant la révélation au « SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate » (Thermo Scientific #

cat : 34080) ou au « SuperSignal West Dura » (Thermo Scientific # cat : 37071) sur des films Kodak XAR.

## 4. Immunofluorescence

### 4.1 Microscopie à balayage confocal

La distribution de la protéine LC3 de la forme diffuse à ponctuée dans le cytoplasme a été observée à l'aide d'un plasmide exprimant la protéine LC3 couplée à la protéine fluorescente verte (GFP). Le plasmide a été obtenu du Dr. Tamotsu Yoshimori du « Research Institute For Microbial Diseases » de l'Université d'Osaka. Des cellules de la lignée cellulaire Huh-7 ont été infectées avec le VHC JFH-1 puis transfectées avec le plasmide codant pour la protéine GFP-LC3.

Un plateau de culture de six puits a étéensemencé avec des cellules Huh-7 à dix pourcents de confluence et placé à 37°C et cinq pourcents de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été infectées avec deux millilitres de surnageant JFH-1<sup>67</sup>. Trois jours plus tard, le plasmide GFP-LC3 a été transfecté dans les cellules, à 85 % de confluence, à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen) à raison de quatre microgrammes d'ADN plasmidique par puits. L'incubation a duré 24 heures à 37°C et cinq pourcents de CO<sub>2</sub>. Ensuite, les cellules ont été décollées à l'aide de la trypsine/EDTA et transférées dans un plateau de culture de 24 puits sur des lamelles #1 à une concentration d'environ 40000 cellules / puits. Elles y ont été incubées pendant 24 heures. À ce stade, trois séries d'échantillons différents ont été préparées parallèlement : (1) induction de l'autophagie à la rapamycine 50 µM ou (2) avec le milieu pauvre en nutriment pendant trois heures et (3) inhibition de l'autophagie avec le 3-MA dix millimolaire pendant trois heures. Enfin, les cellules ont été fixées avec la paraformaldéhyde quatre pourcents pendant dix minutes à température pièce.

Finalement, les cellules ont été marquées pour la protéine virale NS5A à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-NS5A à une dilution de 1 : 200 dans une solution de blocage constituée de trois pourcents de protéine d'albumine (BSA), de 0,3 % de triton X-100 et de dix pourcents de SBF pendant une heure à température pièce. Après quatre lavages de cinq minutes au PBS 1X, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 568 et reconnaissant les IgG de lapin pendant une heure à température pièce. Ce fluorochrome absorbe à 579 nm et émet dans le rouge à 603 nm. Ensuite, quatre lavages au PBS 1X ont été faits avant de marquer le noyau au 4', 6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI) pendant cinq minutes. Finalement, les lamelles ont été montées sur lame avec du « ProLong Gold antifade reagent » (Invitrogen). Vingt-quatre heures après le montage, les lames ont été observées par microscopie à balayage confocal (Bio Rad Radiance 2000 mounted onto a Nikon Eclipse E-800 upright microscope, objective 60X oil immersion NA 1.4) pour la prise de photos et par microscopie à fluorescence (inverted Microscope Nikon TE-2000, equipped with a Sutter DG 4 Illumination system and a Roper Coolsnap HQ, CCD camera control by Metamorph software.) pour le décompte. Un total de 100 cellules positives pour les protéines GFP-LC3 et NS5A ont été comptées par condition.

#### 4.2 Foyer infectieux

Le nombre de foyers infectieux obtenus après conditionnement des cellules a été déterminé dans un plateau de culture de 96 puits. Celui-ci a tout d'abord étéensemencé à 3000 cellules/puits et incubé à 37°C et cinq pourcents de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Ensuite, les composés chimiques ont été ajoutés au milieu, trois heures avant l'infection avec 25 µl de surnageant JFH1<sup>67</sup>. La plaque a été incubée pendant trois jours avant que les cellules soient fixées au paraformaldéhyde quatre pourcents pendant dix minutes à température pièce. Finalement, les cellules ont été marquées pour la protéine NS5A et observées au microscope à fluorescence (inverted Microscope Nikon TE-2000, equipped with a

Sutter DG 4 Illumination system and a Roper Coolsnap HQ, CCD camera control by Metamorph software.) tel que décrit dans la section immunofluorescence.

Le même procédé a été utilisé pour compter les foyers infectieux du surnageant de cellules déjà infectées et traitées à la rapamycine et au 3-MA pendant une période de trois jours. Dans ce cas, 50  $\mu$ l de surnageant ont été ajoutés au milieu et la plaque a été incubée pendant trois jours.

## 5. Dosage des ARN viraux (Taqman)

### 5.1 Extraction de l'ARN intracellulaire

L'ARN total intracellulaire et le surnageant des expériences d'induction et d'inhibition ont été récoltés. Ainsi, les cellules ont été récoltées par ajout d'un millilitre de trizol (Invitrogen), qui a permis la dissociation complète des complexes de nucléoprotéine directement dans le puits. Les échantillons ont été transférés dans un tube de 1,5 ml et conservés sur glace. Ensuite, l'ARN total intracellulaire a été extrait par phénol-chloroforme. Premièrement, les échantillons ont été incubés avec 0,2 ml de chloroforme à température pièce pendant trois minutes puis centrifugés à quatre degrés Celsius pendant 15 minutes à 12 000 g. Les surnageants, qui contiennent l'ARN, ont été récoltés dans un tube de 1,5 ml. Deuxièmement, 0,5 ml d'alcool isopropylique a été ajouté et les tubes ont été incubés pendant dix minutes à température pièce avant d'être centrifugés à quatre degrés Celsius pendant dix minutes à 12 000 g. Finalement, les surnageants ont été retirés et les culots d'ARN ont été lavés à l'éthanol 70 % puis dissous dans 50  $\mu$ l d'eau DEPC.

### 5.2 Extraction ARN extracellulaire

L'ARN extracellulaire a été extrait des surnageants de culture cellulaire à l'aide du kit QiAamp viral RNA (Qiagen). Les surnageants cellulaires ont été centrifugés pendant cinq minutes à 400 g afin de culotter les cellules mortes et

140  $\mu\text{l}$  de surnageant ont été utilisés pour l'extraction d'ARN suivant le protocole de Qiagen. L'ARN extrait a été conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  et 11  $\mu\text{l}$  ont été directement utilisés pour la transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne.

### 5.3 Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

Une transcription inverse de l'ARN isolé (sections 5.1 et 5.2) a mené à la génération d'ADN complémentaire (ADNc). Celui-ci a été utilisé pour la réaction de polymérisation en chaîne de type Taqman afin de produire plusieurs copies d'ADNc du génome du virus à l'aide d'amorces spécifiques aux régions conservées du virus de l'hépatite C. Dans le cas de l'ARN intracellulaire, un contrôle interne, la sous-unité ribosomale 18S, a été utilisé afin d'uniformiser les quantités initiales d'ARN. 250 ng d'ARN cellulaire total ont été utilisés pour la réaction de transcription inverse. L'ARN a été incubé trois minutes à  $70^{\circ}\text{C}$  puis placé deux minutes sur glace avant d'y ajouter quatre microlitres de tampon de transcription inverse (RT-Buffer 5X, invitrogen), deux microlitres de DTT (0,1M), un microlitre d'amorce aléatoire p(dN6) (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), un microlitre de dNTP (20 mM), 20 U d'RNAsin et 100 U de transcriptase inverse MMLV. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant dix minutes à  $25^{\circ}\text{C}$  puis une heure à  $37^{\circ}\text{C}$  pour finalement être inactivés 15 minutes à  $70^{\circ}\text{C}$ . Puis, les échantillons ont été dilués dans 180  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC. L'amplification s'est faite avec 2,5  $\mu\text{l}$  d'ADNc dans un volume final de 25  $\mu\text{l}$  de solution de réaction constituée de 8,6  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\mu\text{l}$  de sonde FAM-UTR (12,5 pmole/ $\mu\text{l}$ ) 5'CCGGAATTGCCGGGAAGACTG3', 0,25  $\mu\text{l}$  de chacune des amorces JFH-1 (90 pmole/ $\mu\text{l}$ , All 5'UTR-H 5'TCTGCGGAACCGGTGAGT3' et 2a 5'UTR-R 5'GAGTGGGTTTATCCAAGAAAG3'), 0,125  $\mu\text{l}$  de sonde VIC-18S, 0,125  $\mu\text{l}$  de chacune des amorces 18S (40  $\mu\text{M}$ , Applied Biosystem) et 12,5  $\mu\text{l}$  de solution de tampon Taqman (Taqman universal Master Mix 2X, Applied Biosystem). Finalement, l'amplification a été produite suivant une succession de cycles thermiques dans un Rotor-Gene RG-3000 (Corbet Research). Le cycle consiste

en un premier temps d'attente de deux minutes à 50°C, suivi d'un deuxième temps d'attente de dix minutes à 95°C. Une fois les deux temps d'attente terminés, une série de 40 cycles est effectuée. Un cycle est composé de deux temps d'incubation différents soit : 95°C pendant 15 secondes suivi de 60 secondes à 60°C. Le temps total de la réaction de polymérisation en chaîne est de 114 minutes.

Le protocole pour le Taqman sur l'ARN extracellulaire est le même, à la différence que la sonde Vic 18S et les amorces pour le gène de la 18S n'ont pas été utilisées.

# RÉSULTATS

## 1. Caractérisation de l'activité autophagique des cellules.

Avant de déterminer si l'activité autophagique des cellules était importante pour la réplication du VHC, nous avons dans un premier temps déterminé l'activité autophagique basale de notre lignée cellulaire Huh-7 ainsi que celles de nos contrôles d'induction et d'inhibition. Pour ce faire, les cellules ont été transfectées avec le plasmide GFP-LC3. 48 heures plus tard, elles ont été conditionnées avec la rapamycine (50  $\mu$ M), le milieu déplété en nutriment ou le 3-MA (10 mM) pendant trois heures. Tel que décrit dans la section 4.2.2 de la revue de littérature, la protéine LC3, lorsque l'autophagie était activée, subissait différentes modifications menant à sa relocalisation dans la cellule. Ainsi, LC3 acquérait en région C-terminale un PE et devenait membranaire, passant de la forme diffuse (LC3-I) dans le cytoplasme à la forme ponctuée (LC3-II) sur les VDM. C'est pourquoi l'une des principales façons d'observer l'activation de l'autophagie était de visualiser, par immunofluorescence, la distribution de la protéine LC3.

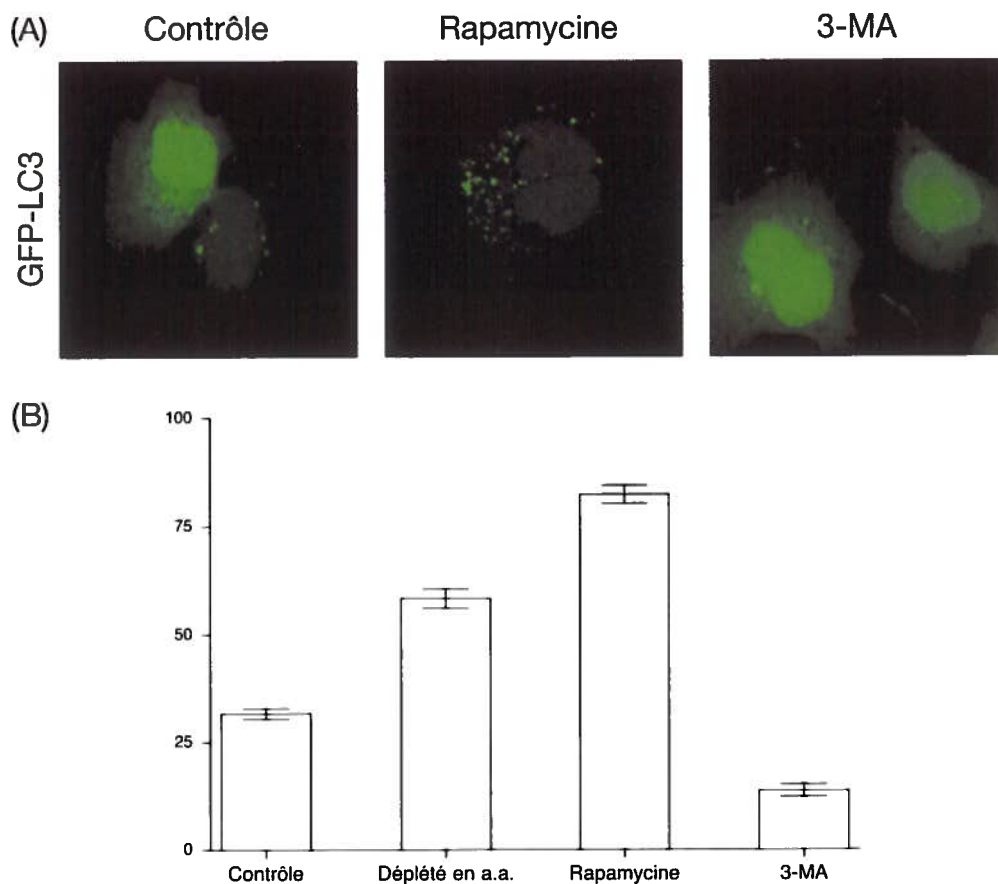
La figure 11 illustre bien la relocalisation de la protéine LC3. Cette dernière a passé de la forme diffuse à la forme ponctuée suite à l'activation de l'autophagie. Nos cellules contrôles ont montré quelques cellules en autophagie pour lesquelles la protéine LC3 était retrouvée sous la forme ponctuée (LC3-II), et quelques cellules en absence d'autophagie pour lesquelles la protéine LC3 est diffuse dans le cytoplasme (LC3-I) (figure 11A panneau de gauche). Notre contrôle positif était représenté par les cellules traitées à la rapamycine (50  $\mu$ M) pendant trois heures. Ce contrôle est déjà largement utilisé dans les études sur l'autophagie (Lee Y. R. *et al.* 2008; Wong *et al.* 2008; Thomson A. W. *et al.* 2009). Nos résultats nous permettaient d'affirmer que le traitement à la rapamycine fonctionne bien dans notre lignée cellulaire puisque la protéine LC3 de nos cellules traitées se retrouvait essentiellement sous la forme ponctuée. La ponctuation était plus abondante dans les cellules induites que dans les cellules



contrôles. Ceci pourrait être dû au fait que la rapamycine agit directement sur mTOR, ce qui activait fortement l'autophagie dans les cellules, puisque mTOR était continuellement inactif au lieu de ponctuellement inactif. En effet, les cellules contrôles montraient plutôt une activité basale de l'autophagie nécessaire à l'homéostasie de la cellule, régulée par ses différents stimuli externes et internes. Une ponctuation était aussi observée lorsque nous placions les cellules en situation de famine. Par contre, cette ponctuation était moins prononcée, le nombre de cellules ponctuées était moins élevé et une mort cellulaire abondante était observée à long terme contrairement à la situation avec la rapamycine. C'est pourquoi dans les expériences ultérieures nous n'utiliserons que la rapamycine comme contrôle d'activation de l'autophagie. Finalement, pour notre contrôle d'inhibition de l'autophagie, nous avons utilisé un second composé chimique, le 3-MA. Ce dernier, aussi largement utilisé pour étudier l'autophagie, agissait sur la formation du complexe d'activation de l'autophagie empêchant la formation de VDM (Chang *et al.* 2007; Lee Y. R. *et al.* 2008; Wong *et al.* 2008). Ainsi, l'ajout de 3-MA à une concentration finale de dix millimolaire pendant trois heures était suffisant pour inhiber l'activité autophagique de base de notre lignée cellulaire puisque la protéine LC3 se retrouvait essentiellement sous sa forme diffuse dans le cytoplasme.

Suite à ces observations, nous avons compté le nombre de cellules GFP-LC3 ponctuées sur un total de 100 cellules GFP positives. Le graphique illustré en figure 11B représentait la moyenne de trois expériences indépendantes et indiquait le pourcentage des cellules en autophagie pour chacune de nos conditions. Cette expérience nous a permis d'établir l'activité autophagique de base de notre lignée cellulaire, mais aussi celle de nos contrôles d'induction et d'inhibition. De ce fait, 31,7 % des cellules non traitées étaient en autophagie alors que ce nombre s'élevait à 58,3 % pour les cellules placées en famine et à 82,3 % pour les cellules traitées à la rapamycine. Ensuite, nous avons observé une baisse significative de l'autophagie dans nos cellules traitées avec le 3-MA

puisque seulement 13,6 % des cellules sont encore en autophagie. En résumé, cette expérience nous a permis d'établir l'activité autophagique basale de notre lignée cellulaire et les conditions idéales d'induction et d'inhibition à l'aide de nos composés chimiques, afin d'avoir de bons contrôles positifs et négatifs pour étudier l'effet de l'autophagie sur la réplication du VHC.

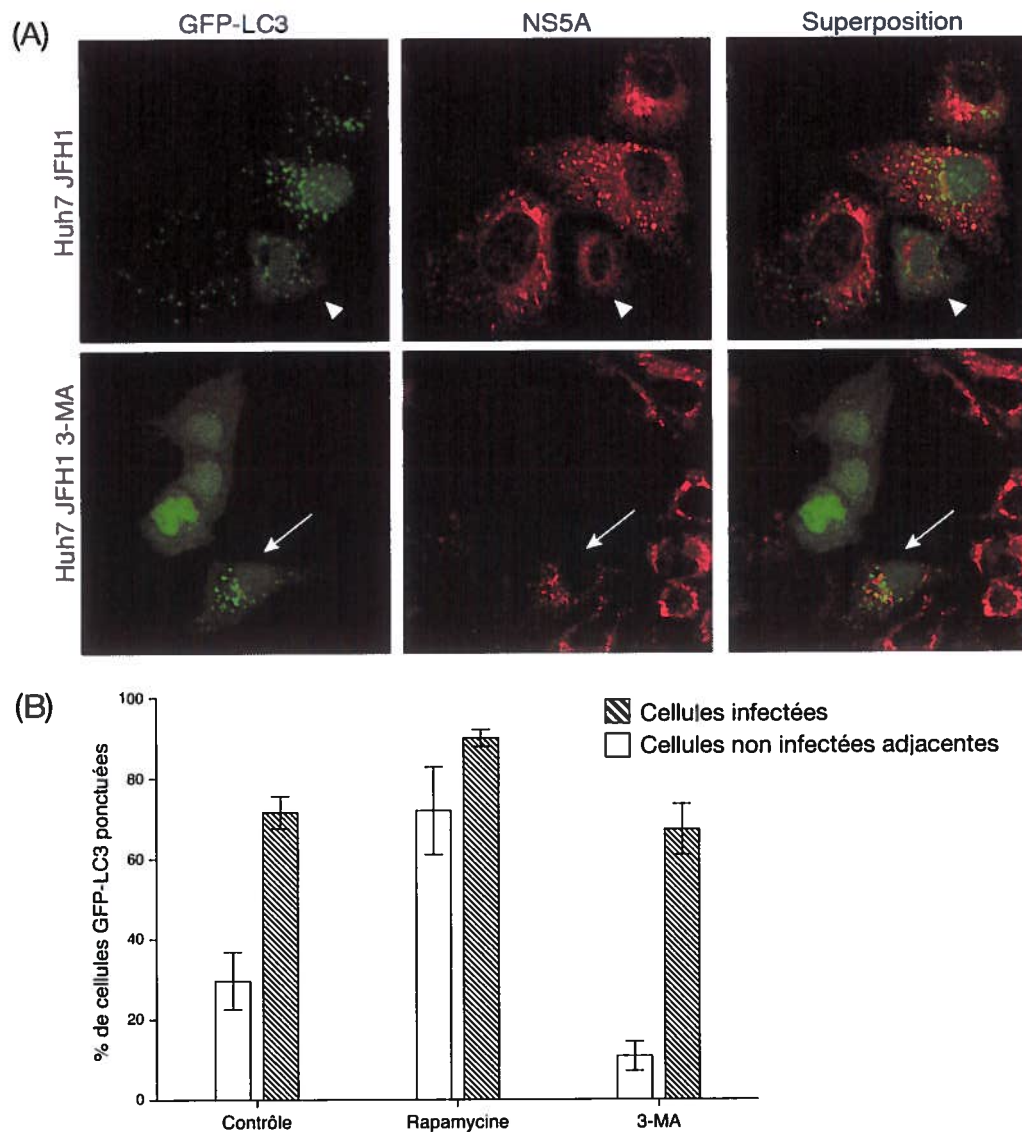


**Figure 11 : Activité basale de l'autophagie dans la lignée Huh-7.**

(A) Transfection du plasmide pEGFP-LC3 dans les cellules Huh-7 et induction de l'autophagie pendant 3h avec 50  $\mu$ M de rapamycine ou 500  $\mu$ l de milieu sans nutriment et inhibition de l'autophagie pendant 3h avec 10 mM de 3-MA. Les photos ont été prises avec le microscope à fluorescence à 40X (microscope inversé Nikon TE-2000) (B) Décompte des cellules en autophagie (GFP-LC3 sous forme ponctué) sur un total de 100 cellules GFP positif. Le graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

## 2. Induction de l'autophagie dans la lignée cellulaire Huh-7 infectée

Une fois l'activité autophagique caractérisée pour chacun de nos contrôles, nous avons déterminé si l'infection par le VHC avait une influence sur l'activité autophagique de nos cellules. Ainsi, les cellules ont été infectées avec du surnageant JFH1<sup>67</sup> durant trois jours. Ensuite, elles ont été transfectées avec le plasmide GFP-LC3 et 48 heures après, elles ont été traitées à la rapamycine (50  $\mu$ M) ou au 3-MA (10 mM) pendant trois heures. Les lamelles ont été marquées contre la protéine virale NS5A. De cette façon, nous pouvions déterminer s'il y avait ponctuation de la protéine LC3 dans les cellules infectées. La figure 12A a démontré par immunofluorescence que lorsque les cellules sont infectées par le VHC, la protéine LC3 se retrouve sous la forme ponctuée, signifiant que l'autophagie est activée. Nous avons aussi observé que les cellules où l'infection était moins avancée étaient par le fait même moins ponctuées. Ainsi, plus il y a présence de la protéine NS5A dans la cellule, démontrant une forte réplication du virus, plus l'autophagie est activée. Ce phénomène est représenté par une tête de flèche blanche dans le panneau du haut de la figure 12A (Huh-7 JFH1). De plus, dans la figure précédente nous avons observé que les cellules traitées avec l'inhibiteur 3-MA démontraient une localisation diffuse de la protéine LC3. C'est pourquoi il est intéressant de noter qu'en situation d'infection le 3-MA inhibait l'autophagie uniquement dans les cellules non infectées par le VHC. Ce résultat laissait croire que l'inhibiteur n'est pas en mesure de contrer l'induction de l'autophagie dans les cellules infectées, tel qu'a été observé dans le panneau du bas de la figure 12A (illustré par la flèche blanche dans les cellules Huh-7 JFH1 3-MA).



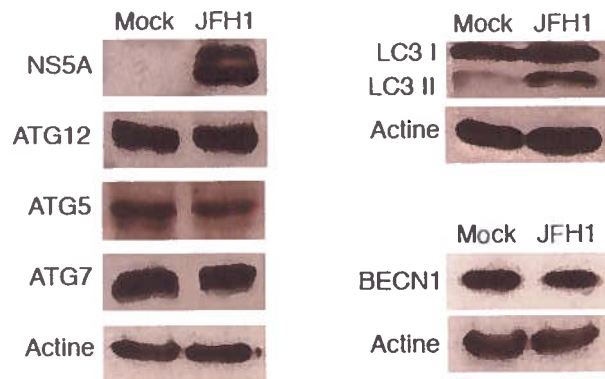
**Figure 12 : Activation de l'autophagie dans les cellules infectées par le VHC.**

(A) Cellules Huh-7 transfectées au jour 3 post infection avec le plasmide pEGFP-LC3 et marquées avec un anticorps contre la protéine virale NS5A. 48 heures après, induction (50  $\mu$ M rapamycine) et inhibition (10 mM 3-MA) de l'autophagie pendant 3 heures. Les photos ont été prises avec un microscope confocal (Bio Rad Radiance 2000 posé sur un Nikon Eclipse E-800, objective 60X, immersion à l'huile, NA 1.4) à 5 jours post-infection. (B) Décompte des cellules ponctuées sur 100 cellules GFP et NS5A positives.

Le graphique illustré dans la figure 12B représentait le pourcentage de cellules en autophagie. Le nombre de cellules GFP-LC3 ponctué sur 100 cellules GFP et NS5A positives a été compté. À titre de contrôle, le nombre de cellules GFP-LC3 ponctué sur 100 cellules GFP positives, mais NS5A négatives a aussi

été compté afin de nous assurer que la présence de cellules infectées n'avait pas d'effet sur les cellules non infectées voisines. D'autre part, étant donné que divers stress peuvent induire l'autophagie, il était préférable de toujours analyser les contrôles dans les mêmes conditions que les échantillons. Ainsi, nous avons pu remarquer une forte augmentation de l'activité autophagique des cellules infectées (71,7 %) par rapport aux cellules non infectées (29,7 %). Cette augmentation était proportionnelle à celle observée en présence de l'inducteur. En effet, l'ajout de rapamycine n'a pas eu d'effet significatif sur le pourcentage de cellules en autophagie. Ceci était probablement dû au fait que l'infection induisait déjà fortement l'autophagie dans les cellules. D'autre part, il était intéressant de voir que l'inhibiteur n'était pas en mesure de contrer l'induction suite à l'infection par le VHC. Effectivement, l'ajout de 3-MA diminuait l'activité autophagique des cellules, cependant cette diminution ne restaurait pas l'activité autophagique basale observée en temps normal avec l'inhibiteur qui est d'environ 13 % (figure 11B). Ainsi, 67,3 % des cellules demeuraient en autophagie en présence de l'inhibiteur (figure 12B). Ce pourcentage de cellules en autophagie était comparable à celui observé dans les cellules infectées sans traitement (71,7 %). Comme les cellules non infectées montraient un phénotype diffus de la protéine LC3 et que le pourcentage de ces cellules représentait le niveau basal observé en présence de l'inhibiteur (10,8 %) (figure 12B), nous pouvions conclure que l'inhibition à court terme de l'autophagie avec le 3-MA n'était pas efficace en situation d'infection par le VHC et donc que les cellules infectées demeuraient en autophagie.

Suite à ces observations, nous avons vérifié par immunobuvardage de type western si l'infection avait un effet sur d'autres protéines autophagiques impliquées dans la formation des VDM. Nous avons donc récolté des lysats de cellules infectées > 90 % et les avons marquées contre les protéines autophagiques ATG5, ATG7, ATG12, BECN1 et LC3 ainsi que contre la protéine virale NS5A. Les protéines ATG5, ATG12 et ATG7 étaient essentielles à la



**Figure 13 : Expression de la forme LC3-II suite à l'infection par le VHC.**

Observation de l'expression des protéines autophagiques par immunobuvardage de type Western entre la lignée Huh-7 infectée et la lignée Huh-7 non infectée.

formation des VDM et à la production de la forme membranaire de LC3 (LC3-II). La protéine BECN1 est indispensable à l'activation de l'autophagie et la protéine LC3 était la protéine d'élongation des VDM. Aucun effet n'a été observé suite à l'infection sur la quantité de protéines observées dans nos cellules infectées par rapport à nos cellules non infectées pour les protéines ATG5, ATG7, ATG12 et BECN1 (figure 13). Nos résultats concordaient avec la littérature puisqu'il est connu que les protéines ATG5, ATG7 et ATG12 ne sont pas induites suite à l'activation de l'autophagie. Pour ce qui est de la protéine BECN1, la littérature est controversée. Certaines études démontraient une induction de BECN1 suite à l'activation de l'autophagie alors que d'autres non. En effet, la majorité des papiers publiés démontraient que l'activation de l'autophagie était due à la dissociation du complexe BECN1-Bcl-2 et BECN1-Bcl-x<sub>L</sub> (Sinha et Levine 2008; Wei *et al.* 2008). Ainsi, l'activation de l'autophagie était dépendante des partenaires cellulaires de la protéine BECN1 plutôt que de son activation ou bien de son induction (Levine *et al.* 2008; Sinha et Levine 2008). De ce fait, il serait peut probable de remarquer une augmentation de la quantité de BECN1 suite à l'activation de l'autophagie. Cette expérience a permis de confirmer notre résultat observé en figure 12, soit que l'autophagie est activée suite à l'infection par le VHC, puisque nous retrouvons la bande LC3-II en plus grande concentration dans notre échantillon infecté par le VHC (figure 13).

formation des VDM et à la production de la forme membranaire de LC3 (LC3-II). La protéine BECN1 est indispensable à l'activation de l'autophagie et la protéine LC3 était la protéine d'élongation des VDM. Aucun effet n'a été observé suite à l'infection sur la quantité de protéines observées dans nos cellules infectées par rapport à nos cellules non

Ces deux expériences confirmaient les résultats observés par l'équipe de Ait-Goughoulte et celle de Sir, lesquelles affirmaient que l'autophagie est activée suite à l'infection par le VHC. Par contre, nous n'avons pas utilisé la même technique puisque l'équipe de Ait-Goughoulte a utilisé une autre souche virale de génotype 1a (clone H77) ainsi qu'une lignée cellulaire spécifique (IHH, immortalized human hepatocytes). De plus, l'équipe de Sir a procédé uniquement par électroporation de transcript d'ARN viral JFH1. Somme toute, nous étions d'accord que l'infection par le VHC induit l'autophagie. Par contre, nos résultats vont plus loin, en indiquant le pourcentage de cellules activées par l'infection, ce que les deux autres équipes n'ont pas démontré. De plus, notons que l'équipe de Ait-Goughoulte confirmait l'activation de l'autophagie par une accumulation de protéine BECN1 dans le temps suivant l'infection et par la présence d'un complexe réunissant les protéines ATG5, AGT12, ATG16 à 200 KDa. De tels résultats n'ont jamais été observés durant nos expérimentations.

### **3. Diminution de l'infection suite à l'inhibition de l'autophagie.**

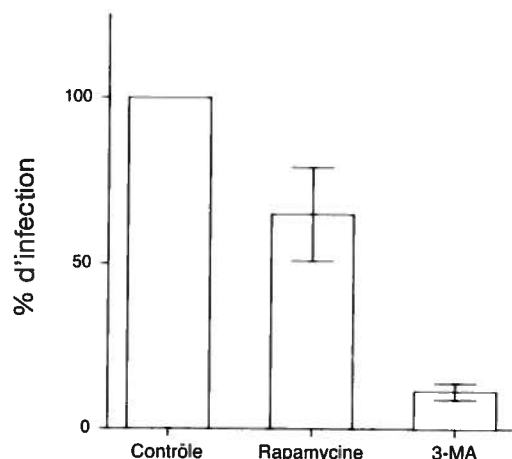
Maintenant que nous avons démontré que l'infection par le VHC induisait l'autophagie dans les cellules infectées, nous avons étudié l'effet de l'autophagie sur la réplication virale du VHC. Pour ce faire, des cellules Huh-7 non infectées ont d'abord été traitées avec de la rapamycine (50 nM) ou du 3-MA (5 mM) durant trois heures. Les cellules ont ensuite été infectées avec du surnageant JFH1<sup>67</sup> et incubées pendant trois jours, toujours en présence des composés chimiques inhibiteurs ou inducteurs. Les cellules ont été marquées contre la protéine NS5A du VHC et les foyers infectieux ont été comptés au microscope à fluorescence. Les résultats sont présentés dans la figure 14 sous la forme d'un graphique représentant le pourcentage d'infection. Nos cellules contrôles, représentant une infection standard, ont été établies arbitrairement à 100 % d'infection. Nous observions une faible diminution du pourcentage d'infection avec la rapamycine. Ce résultat peut être expliqué par la cytotoxicité lors des expériences à long terme observées à cette concentration de rapamycine. Par

ailleurs, il était intéressant d'observer une forte diminution du pourcentage d'infection en présence de l'inhibiteur 3-MA. En effet, suite au traitement entrepris trois heures avant l'infection et se prolongeant durant les trois jours d'infection, nous n'obtenions que 11,4 % d'infection, ce qui représentait une baisse de 88 % de l'infection. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'induction de l'autophagie est un phénomène nécessaire pour la réplication du VHC. Ce qui était intéressant puisque ces résultats ont déjà été observés dans le passé avec d'autres virus à ARNs de polarité positive tels que le poliovirus et le virus de la dengue (Taylor et Kirkegaard 2007; Lee Y. R. *et al.* 2008; Huang *et al.* 2009; Khakpoor *et al.* 2009). Notons aussi que ces deux virus utilisaient les autophagosomes produits durant l'autophagie pour assembler leur complexe de réplication, ce qui laissait croire que le VHC pourrait aussi utiliser les autophagosomes pour sa réplication.

Afin de déterminer plus précisément à quels niveaux l'inhibition de l'autophagie interférait avec la réplication du VHC, nous avons traité des cellules déjà infectées à > 90 % avec le 3-MA à des concentrations finales de cinq millimolaire et de dix millimolaire durant trois jours (figure 15A). Comme l'induction de l'autophagie avec la rapamycine n'a eu aucun effet significatif sur la réplication virale, nous avons poursuivi les expériences en étudiant uniquement l'effet, sur la réplication virale, d'une inhibition de l'autophagie à l'aide du 3-MA. Ainsi, le surnageant a été récolté pour analyser la quantité de particules virales infectieuses par le dénombrement des foyers infectieux (figure 15D). De plus, les ARN intracellulaires et extracellulaires ont été récoltés afin d'être analysés par qRT-PCR de type Taqman. Tout d'abord, les figures 15 A et B représentaient la quantité d'ARN viral intracellulaire (A) et extracellulaire (B) produit durant le traitement de trois jours au 3-MA. Nous pouvons remarquer dans les deux cas une diminution significative de la production d'ARN viral suite au traitement avec le 3-MA. En effet, une diminution d'au moins 66 % de la production d'ARN virale intracellulaire est observée lorsque les cellules sont



traitées avec le 3-MA à une concentration de cinq millimolaire durant trois jours et une diminution d'au moins 85 % lorsqu'elles sont traitées avec le 3-MA à une concentration de dix millimolaire. La diminution observée pour l'ARN extracellulaire était semblable à celle de l'ARN intracellulaire, ce qui nous permettait de conclure que l'autophagie est importante à la réplication du virus. De plus, notre expérience nous permettait aussi d'affirmer que l'autophagie n'a



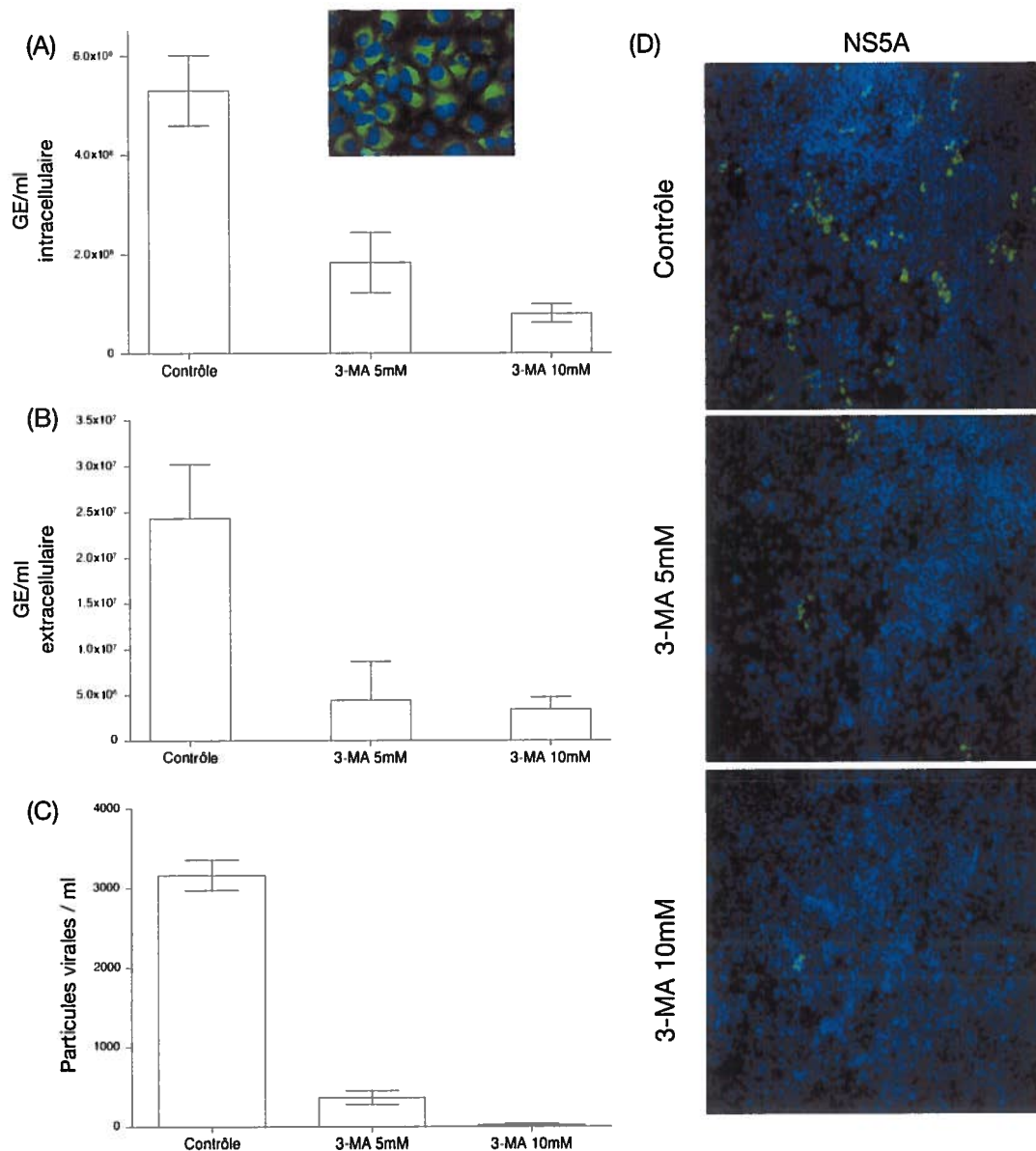
**Figure 14 : Diminution de la réplication virale après abolition de l'autophagie.**

Les cellules Huh-7 ont été traitées avec 50 nM de rapamycine ou 5 mM de 3-MA pendant 3h. Ensuite, elles ont été infectées avec 2 ml de surnageant JFH1 durant 3 jours. Les cellules ont été marquées à l'aide d'un anticorps contre la protéine virale NS5A et le nombre de foyers infectieux a été compté pour chacune des conditions. La moyenne de 3 expériences indépendantes est reportée dans le graphique.

pas d'effet sur l'entrée du virus puisque si tel était le cas, il n'y aurait aucun changement au niveau de la quantité d'ARN intracellulaire produit dans les cellules déjà infectées. Par ailleurs, cette conclusion est renforcée par le fait que le traitement de trois jours avant infection et le traitement de trois jours sur les cellules déjà infectées démontrent tous deux une forte diminution du nombre de particules virales sécrétées. Ainsi, dans les deux cas, les cellules traitées au 3-MA, à une concentration de cinq millimolaire, démontraient une diminution du pourcentage d'infection d'au moins 86 % (figures 14 et 15C).

Finalement, l'ensemble des résultats obtenus aux figures 14 et 15 nous permettait de conclure que l'autophagie était importante pour la réplication du virus et que son effet aurait lieu après l'entrée du virus dans la cellule, mais avant l'encapsidation de celui-ci. Donc, l'autophagie pourrait être utile à la traduction ou à la réplication durant l'infection. Ainsi, l'autophagie pourrait servir de charpente à l'assemblage du complexe de réplication ou bien être utile pour

la relocalisation du virus ou tout simplement pour protéger le virus durant sa réplication.

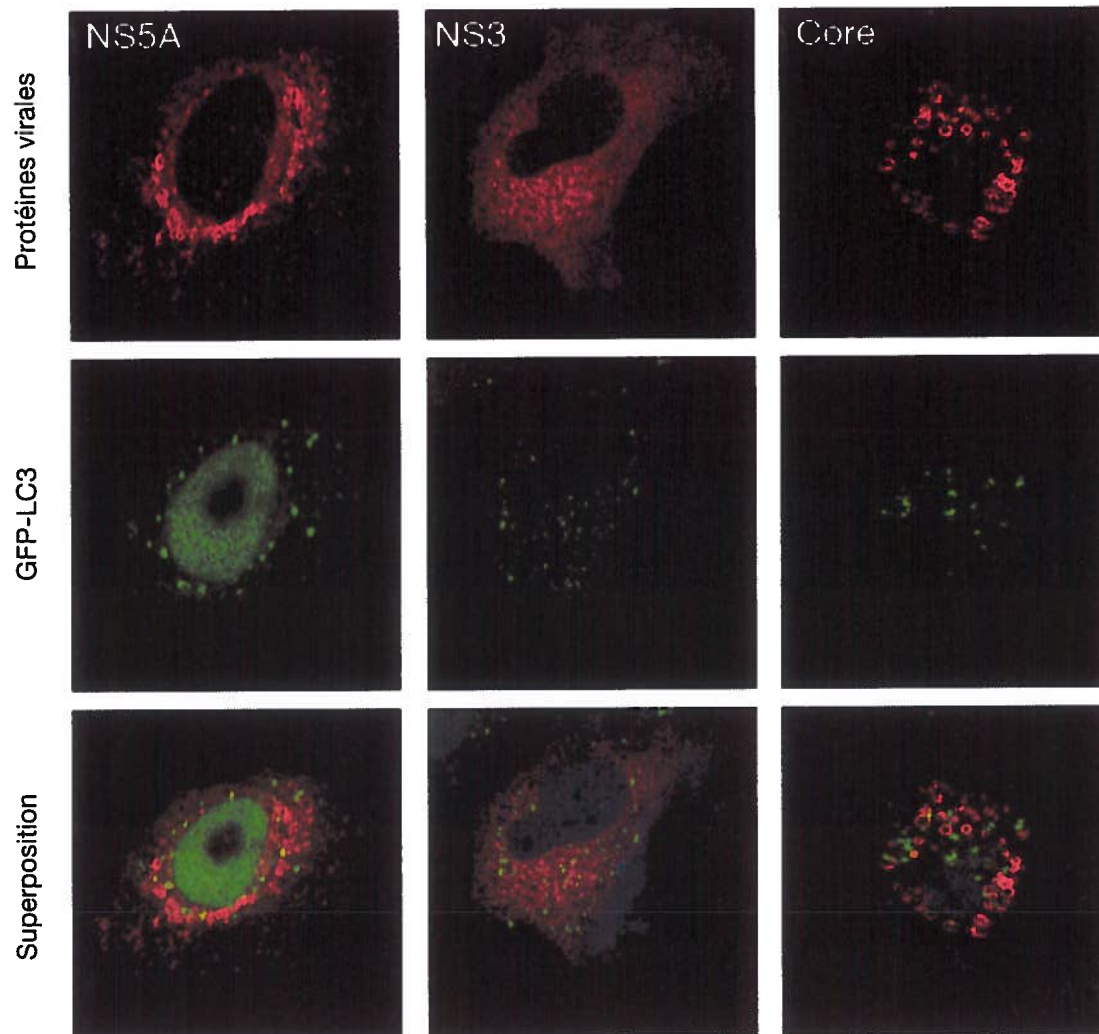


**Figure 15 : Diminution de l'infection suite à une abolition de l'autophagie dans la lignée cellulaire Huh-7 déjà infectée.**

Les cellules infectées à > 90 % (A) ont été traitées avec le 3-MA à une concentration finale de 5 mM et 10 mM durant 3 jours. (A) L'ARN viral intracellulaire et extracellulaire (B) est récolté et quantifié par qRT-PCR de type Taqman. (C) Le surnageant a été utilisé pour infecter des cellules naïves durant trois jours puis les foyers infectieux ont été comptés par immunofluorescence contre la protéine virale NS5A. (D) Les Photos ont été prises par microscopie à fluorescence (microscope inversé Nikon TE-2000) et représentaient le nombre de foyers infectieux observés pour chacune des conditions comptées en (C).

#### 4. Absence de colocalisation entre les protéines virales et autophagiques.

Comme l'effet positif de l'autophagie sur la réplication du virus semblait avoir lieu après l'entrée, mais avant l'encapsidation, nous voulions observer s'il y avait colocalisation de certaines des protéines virales avec la protéine autophagique LC3. Pour ce faire, des cellules déjà infectées par le virus JFH1<sup>67</sup> ont été transfectées avec le plasmide GFP-LC3. 48 heures après la transfection, elles ont été marquées pour les protéines virales NS5A, NS3 et Core. Nous avons choisi trois protéines virales, soit deux impliquées dans le complexe de réplication du génome, NS5A et NS3, et une dans l'encapsidation, Core. Bien que les résultats précédents laissent croire que le virus pourrait utiliser les VDM comme site de réplication virale, aucune des trois protéines virales ne colocalise avec la protéine autophagique LC3. Trois hypothèses pouvaient expliquer ces résultats. Premièrement, l'expression de la protéine LC3-II pourrait être transitoire sur ces vésicules. Deuxièmement, il est possible que la protéine LC3 n'interagissait pas avec le virus. Troisièmement, la relocalisation de la protéine LC3 peut être causée par une autre protéine virale que NS5A, NS3 ou Core. Afin de s'assurer qu'il n'existait aucune colocalisation entre le virus et le phénomène d'autophagie, un plus large éventail de protéines virales et autophagiques devrait être étudié. Notons toutefois que nos résultats confirmaient ceux obtenus par l'équipe de Ait-Goughoulte qui a aussi observé une absence de colocalisation entre les protéines virales NS3, Core et la protéine autophagique LC3. De plus, nos résultats concordaient aussi avec les récentes études qui démontraient que les protéines virales se retrouvaient associées avec les vésicules de lipide. C'est pourquoi nous remarquons, pour les protéines NS5A et Core, une distribution sous forme d'anneau dans le cytoplasme, telle que mentionnée dans la littérature (Miyinari *et al.* 2007; Piodi *et al.* 2008; Roingeard *et al.* 2008).



**Figure 16 : Absence de colocalisation avec les protéines virales.**

Les cellules Huh-7 infectées à > 90 % ont été transfectées avec le plasmide pEGFP-LC3. 48h plus tard, les cellules ont été marquées avec des anticorps contre les protéines virales NS5A, NS3 et core. Les photos ont été prises à l'aide du microscope confocal (Bio Rad Radiance 2000 posé sur un Nikon Eclipse E-800, objective 60X, immersion à l'huile NA 1.4).

## **DISCUSSION**

Le but de cette étude était de déterminer l'importance d'une activité autophagique sur la réplication du virus de l'hépatite C. Étant donné que de plus en plus d'études démontrent une interaction entre l'autophagie et l'infection par les virus (Espert *et al.* 2007), nous voulions déterminer si le VHC faisait partie des virus interagissant avec le phénomène d'autophagie. À ce jour, deux voies d'interactions ont été suggérées. Tout d'abord, l'autophagie nuit à la réplication virale en limitant la réplication du virus, comme c'est le cas pour le virus de la mosaïque du tabac (Liu *et al.* 2005) et le virus Sindbis (Levine *et al.* 1996). Cela a mené certains virus à développer des mécanismes pouvant inhiber l'autophagie afin de permettre leur réplication. Parmi ceux-ci sont retrouvés certains virus membres de la famille des herpesvirus (Schmid *et al.* 2006). Ensuite, certains virus, par exemple le virus de la polio (Taylor et Kirkegaard 2007), le rhinovirus (Jackson *et al.* 2005), le SARS-coV, le virus de l'hépatite murine (Prentice *et al.* 2004) et le virus de l'artérite équine, vont plutôt utiliser des composantes de l'autophagie, telles que les autophagosomes, comme site d'assemblage du complexe de réplication virale. Comme le virus de l'hépatite C est semblable aux virus à ARN pour lesquels une interaction favorable a été démontrée, nous supposons que l'autophagie serait importante pour la réplication du virus. Pour ce faire, la lignée cellulaire Huh-7, une lignée d'hépatocyte humain, et le virus JFH1 (génotype 2a), ont été utilisés. De cette façon, il nous était possible d'étudier l'impact de l'autophagie en situation d'infection standard.

Notre premier objectif était de déterminer l'activité autophagique de base de notre lignée cellulaire ainsi que les conditions idéales d'induction et d'inhibition de l'autophagie. Cette première expérience est importante puisque l'autophagie est facilement induite lorsque les cellules sont en stress. Ainsi, d'une expérience à une autre ou d'une lignée cellulaire à une autre, l'activité autophagique de base peut varier. Cette expérience nous a permis de déterminer le niveau de base de l'autophagie dans notre lignée cellulaire Huh-7

en condition normale de culture. Elle nous a aussi permis de démontrer que nos conditions d'induction et d'inhibition du phénomène d'autophagie étaient représentatives de celles observées dans la littérature avec la rapamycine et le 3-MA (Rubinsztein *et al.* 2007). Ainsi, notre lignée cellulaire détient une activité autophagique de base d'environ 30 % de cellules en autophagie et peut facilement être induite suite à l'ajout de rapamycine à environ 80 % de cellules en autophagie ou inhibée suite à l'ajout de 3-MA à seulement 13 % de cellules en autophagie. Cette première expérience n'a jamais fait l'objet d'étude auparavant. Il était donc important, avant de commencer nos expériences avec le virus, de caractériser l'autophagie de notre lignée cellulaire et de s'assurer de l'efficacité de nos contrôles d'induction et d'inhibition de l'autophagie.

## **1. Activation de l'autophagie suite à l'infection par le VHC**

Nous avons démontré que l'autophagie était induite dans les cellules infectées par le VHC. Par immunofluorescence, nous avons clairement démontré une relocalisation abondante de la protéine diffuse LC3 aux membranes des VDM (figure 12A). De plus, nous avons observé une augmentation d'environ 41 % du nombre de cellules en autophagie lors de l'infection. Cette augmentation de l'activité autophagique suite à l'infection par le VHC a aussi été observée par l'équipe de Ait-Goughoulte et celle de Sir. L'équipe de Ait-Goughoulte a démontré l'activation de l'autophagie par microscopie électronique, immunofluorescence et immunobuvardage de type western dans la lignée IHH avec un virus de génotype 1a soit le clone H77. Cette lignée est produite par introduction du gène de la protéine virale Core afin de produire une lignée continue capable de réplication virale après infection par le virus de l'hépatite C, H77 (Ait-Goughoulte *et al.* 2008). Notons que cette lignée cellulaire n'a jamais fait l'objet d'étude par d'autres équipes que celle du Dr. Ray. Par ailleurs, l'équipe de Sir a aussi démontré une activation de l'autophagie après transfection du génome JFH1 dans la lignée cellulaire Huh-7.5, une lignée dérivée de la lignée cellulaire Huh-7, par immunofluorescence et immunobuvardage de type Western.

Dans leur cas, le phénomène n'a pas été étudié lors d'infection normale par le virus de l'hépatite C puisqu'ils ont procédé uniquement par électroporation de transcrit d'ARN viral (Sir *et al.* 2008a). Somme toute, notre expérience a permis de démontrer que l'autophagie était bien induite par le VHC lors d'une infection normale dans la lignée cellulaire Huh-7.

Ce qui est d'autant plus intéressant, c'est que l'autophagie demeure activée dans les cellules infectées par le VHC, et ce, même après le traitement de trois heures avec l'inhibiteur 3-MA. En effet, l'autophagie est inhibée à environ 90 % dans les cellules non infectées et à environ 33 % dans les cellules infectées. Cela signifie que 67 % des cellules infectées demeurent en autophagie même en présence de l'inhibiteur. Notons aussi que la rapamycine n'augmente que de 18 % la quantité de cellules infectées en autophagie. Cette faible induction peut être expliquée par le fait que l'infection induit déjà fortement l'autophagie dans les cellules et qu'il est donc inutile d'induire le phénomène chimiquement. De tels résultats n'ont jamais été démontrés avec le VHC. Nous avons aussi démontré par immunobuvardage de type Western que l'infection par le virus n'induit pas la production de protéines autophagiques autres que la protéine LC3-II (figure 13). En effet, la quantité de protéines ATG5, ATG7, ATG12 et BECN1 demeure inchangée suite à l'infection, mais nous observons l'apparition de la forme membranaire de la protéine LC3, soit la forme LC3-II. Cette forme de la protéine LC3 n'est produite que lorsque l'autophagie est induite dans la cellule (Kabeya *et al.* 2000), ce qui confirme le résultat observé par immunofluorescence, démontrant une activation de l'autophagie suite à l'infection. Il n'est pas encore bien défini dans la littérature si une augmentation de la production de protéine BECN1 est nécessaire pour l'activation de l'autophagie. Il se pourrait simplement que celle-ci soit séquestrée par association avec les protéines Bcl-2 ou Bcl-X, empêchant l'activation de l'autophagie et que, lorsque l'interaction BECN1-Bcl-2 ou BECN1-Bcl-X est abolie, l'autophagie soit induite (Liang X. H. *et al.* 1998; Cao Y. et Klionsky 2007).



De ce fait, si la protéine BECN1 n'est pas induite, mais plutôt inactivée, il est normal qu'aucun changement ne soit observé par immunobuvardage de type western après l'infection (Wong *et al.* 2008). Notons toutefois que l'équipe de Ait-Goughoulte a pour sa part noté une augmentation dans le temps de la production de protéine BECN1 suite à la transfection d'ARN du virus H77. Aucune autre équipe n'a démontré de tels résultats dans le passé avec le VHC. De plus, elle est la seule équipe à identifier un complexe de 200 KDa regroupant les protéines ATG5, ATG12 et ATG16 avec lequel elle confirme l'activation de l'autophagie. Pour notre part, les niveaux de protéines ATG5, ATG12, ATG7 et BECN1 demeurent inchangés après infection par le virus (figure 13). Nos résultats ont été observés en situation d'infection stable où plus de 90 % des cellules étaient infectées. Nous n'avons pas vérifié en début d'infection, tel que Ait-Goughoulte *et al.* l'ont fait. Par ailleurs, en début d'infection comme en situation d'infection stable, nous aurions remarqué une différence au niveau de l'expression de la protéine BECN1 si l'infection par le VHC induisait son expression ; ce qui n'est pas le cas.

## **2. Importance de l'autophagie sur la réplication du VHC**

Comme il était évident que l'autophagie était activée par l'infection avec le VHC, nous avons ensuite démontré l'importance d'une activité autophagique pour la réplication du virus. Ainsi, lorsque l'autophagie est supprimée, la réplication virale est diminuée d'environ 88 %. Cela est démontré par le traitement des cellules avec l'inhibiteur 3-MA à une concentration finale de cinq milimolaires, trois heures avant l'infection avec le virus JFH1 et maintenue durant les trois jours d'infection (figure 14). Ainsi, une abolition de l'autophagie pour une durée de trois heures n'est pas suffisante pour inhiber l'activation de l'autophagie par le virus dans les cellules déjà infectées depuis cinq jours. Cependant, un traitement débutant trois heures avant l'infection et se prolongeant pour les trois jours d'infection permet d'inhiber fortement la réplication virale du VHC. Ce résultat

démontre clairement que l'autophagie est requise pour la réplication du VHC (figure 14). Bien qu'il soit évident que l'autophagie joue un rôle positif sur la réplication de notre virus, nous ne sommes toutefois pas en mesure d'expliquer à quel niveau du cycle viral l'autophagie est requise. Suite à ces deux expériences, nous pouvons par contre conclure que le VHC ne fait pas partie des virus qui inhibent l'autophagie afin de favoriser la réplication virale ni des virus pour lesquels l'autophagie nuit à la réplication virale. Ainsi, on peut s'attendre à ce que le virus de l'hépatite C fasse partie des virus qui tirent avantage de l'autophagie pour sa réplication virale.

Suite au prétraitement des cellules avec l'inhibiteur 3-MA, nous avons démontré que le VHC avait besoin de l'autophagie pour sa réplication. Afin de préciser où l'autophagie produit son effet positif durant la réplication du virus, nous avons répété l'expérience sur des cellules déjà infectées. Nos résultats ont démontré une diminution significative de la production d'ARN intracellulaire, de l'ARN extracellulaire et de la production de virions suite à l'abolition de l'autophagie pendant trois jours. Ces résultats nous permettent de conclure que l'effet positif de l'autophagie a lieu après l'entrée du virus, mais avant l'encapsidation. Ait-Goughoulte et son équipe n'ont pas observé de réduction de la réplication virale par PCR en temps réel suite à l'ajout de l'inhibiteur 3-MA, mais leurs résultats ne sont pas présentés (Ait-Goughoulte *et al.* 2008).

### **3. Absence de colocalisation**

Comme l'autophagie semble jouer un rôle important durant la réplication du VHC, nous nous sommes penchés sur l'hypothèse que le virus utiliserait les autophagosomes comme charpente pour l'assemblage de nouveaux sites de réplication virale. Cette hypothèse pourrait expliquer que le virus ait besoin de l'autophagie pour effectuer une réplication virale adéquate et par le fait même, expliquer que l'autophagie soit induite suite à l'infection. Plus le génome est traduit, plus il y aura de complexes de réplication formés. D'autre part, nous

savons que le virus induit la formation de petites vésicules suite à l'expression de ces protéines virales (Hugle *et al.* 2001), mais la provenance de ces vésicules demeure inconnue. Nous avons donc vérifié par immunofluorescence s'il y avait colocalisation entre les protéines virales NS5A, NS3 et Core du VHC et la protéine autophagique LC3. Nos résultats ne démontraient aucune colocalisation entre les différentes protéines virales et la protéine autophagique LC3, tout comme l'équipe de Ait-Goughoulte. Par contre, trois hypothèses peuvent expliquer un tel résultat. Premièrement, il se peut que la protéine LC3 ne s'exprime que de façon transitoire sur les VDM produites suite à l'infection. Deuxièmement, il est possible que l'interaction entre l'autophagie et le virus ne soit pas effectuée par l'entremise de la protéine LC3. Troisièmement, il est possible que l'interaction soit assurée par une autre protéine virale. C'est pourquoi il est important de poursuivre les expériences en utilisant un plus large éventail de protéines virales et autophagiques afin de déterminer s'il y a effectivement interaction entre l'autophagie et le virus durant l'infection. Il se pourrait aussi que l'autophagie activée par le virus ne donne que de petites VDM non complètes et incapable d'élongation sur lesquelles le virus pourrait prendre part. De telles VDM pourraient être difficiles à observer. Afin de déterminer plus précisément s'il existe une interaction entre les différentes protéines virales et les protéines autophagiques, une approche biochimique par gradient, sera effectuée par le Dr. Konan en collaboration avec le Dr. Labonté. Cette approche biochimique étant moins limitée par les réactifs qu'une approche par immunofluorescence, nous espérons donc être en mesure de démontrer que les protéines autophagiques et les protéines virales se retrouvent dans les mêmes constituants cellulaires suite à l'infection.

#### **4. Hépatite C, autophagie et stress du réticulum endoplasmique**

Récemment, l'équipe de Sir a démontré que l'autophagie était activée suite à l'infection par le VHC et que cela était dû à un stress du réticulum

endoplasmique. Plus précisément, leurs études démontrent que l'autophagie peut être activée via les trois différents effecteurs (IRE1, PERK et ATF6) de la voie des protéines mal repliées (UPR unfolded protein response) tel que mentionné dans la littérature (Ogata *et al.* 2006; Yorimitsu *et al.* 2006; Yorimitsu et Klionsky 2007). Ainsi, l'abolition de l'un des effecteurs de la voie des protéines mal repliées diminue fortement la réplication virale du VHC et abolit l'autophagie. Leurs études démontrent aussi que bien que l'autophagie soit induite suite à l'infection, la dégradation des protéines via le phénomène d'autophagie n'a pas lieu. Ceci suggère que l'association entre l'autophagosome et le lysosome pour former les autophagolysosomes, dans lesquels les constituants seront dégradés et recyclés, ne se produit pas. En effet, par immunofluorescence, ils observent que lorsque les cellules sont infectées, il y a une forte diminution de la colocalisation entre les autophagosomes et les lysosomes contrairement aux cellules contrôles.

Nous n'avons pas testé cette voie d'induction de l'autophagie lors de notre étude. Celle-ci serait la suite logique du projet, soit de démontrer par quel moyen le virus induit l'autophagie et dans quel but. Comme l'équipe de Sir a procédé par électroporation d'ARN infectieux plutôt que par infection, cela peut avoir un effet sur l'activation de la voie UPR. En effet, suite à une électroporation, nous introduisons une forte quantité d'ARN dans les cellules ce qui peut activer la voie UPR en causant un stress au réticulum endoplasmique. Il serait donc intéressant de voir si nous obtenons le même résultat en situation d'infection, où la proportion d'ARN infectieux est moins abondante.

Par ailleurs, plusieurs autres voies peuvent être étudiées étant donné que l'autophagie peut être modulée par un grand nombre de voies métaboliques différentes (Moretti *et al.* 2007a; Moretti *et al.* 2007b; Delgado *et al.* 2008; Shi et Kehrl 2008; Xu *et al.* 2008). Notons parmi celles-ci la voie des TLR et la voie JAK/STAT (Delgado *et al.* 2008; Delgado et Deretic 2009). Il est aussi connu que

le VHC peut inhiber différentes voies afin de promouvoir sa persistance dans la cellule et ainsi établir une infection chronique. Par exemple, la protéase NS3/4A du VHC peut inhiber l'activation de RIG-1 et du TLR3, tous deux impliqués dans la production d'interférons alpha et bêta (Vilasco *et al.* 2006). La protéine NS5A inhibe la voie JAK/STAT ainsi que l'activation de la voie PKR (Cao J. *et al.* 2006). Il ne serait donc pas surprenant que le virus soit aussi en mesure de contrer l'interaction entre l'autophagosome et le lysosome, tel que suggéré par l'équipe de Sir *et al.* C'est pourquoi il est important de poursuivre les recherches sur le domaine étant donné que plusieurs voies restent encore inconnues et que le sujet est loin d'être entièrement couvert.

## **CONCLUSION**

Durant ces dernières années, les recherches sur le phénomène d'autophagie, un phénomène de recyclage intracellulaire important dans l'homéostasie cellulaire, ont connu un essor considérable. Bon nombre de ces études concernent différents virus et deux stratégies ont été identifiées. La première stratégie est que l'autophagie nuit à la réplication virale. Ainsi, pour contrer l'inhibition, des virus comme le HSV et le KSHV ont développé des mécanismes pour inhiber l'autophagie. La deuxième stratégie identifiée est d'utiliser l'autophagie dans le but de favoriser sa réplication virale. En effet, cette dernière stratégie a fait l'objet de nombreuses études chez les virus à ARN monocaténaire de polarité positive. Il a été démontré pour plusieurs de ces virus tels que le virus de la polio, le virus de la dengue, le virus de l'artérite équine, le SRAS et le virus de l'hépatite murine (MHV), que le site de réplication du génome se situe sur les vésicules à double membrane lipidique produites durant le phénomène d'autophagie. Ces vésicules, nommées autophagosomes, serviraient de charpente pour l'assemblage du complexe de réplication et donc à la réplication du génome de ces virus. Ainsi, une abolition de l'autophagie diminue fortement la réplication de ces virus.

Comme le site d'assemblage du complexe de réplication du VHC n'est toujours pas identifié et que plusieurs des virus à ARNs étudiés lors des recherches sur l'autophagie sont apparentés au VHC, notre étude avait pour but de **déterminer l'importance de l'autophagie pour la réplication du VHC**. Pour ce faire, nous avons utilisé le génome infectieux JFH1 et la lignée cellulaire Huh-7, lignée cellulaire permissive au virus. Ainsi, en utilisant du surnageant infectieux, il était possible d'étudier le lien entre l'autophagie et la réplication du VHC en situation d'infection normale. Ce type d'infection permet l'étude de chacune des étapes du cycle de réplication, allant de l'entrée du virus à la relâche de nouvelles particules virales. Ainsi, nos recherches ont permis de démontrer que l'infection par le VHC induit fortement l'autophagie et qu'une

abolition de l'autophagie avant ou durant l'infection par le VHC diminue significativement la réplication virale. De plus, nos résultats nous ont permis de conclure que l'effet positif de l'autophagie sur la réplication du VHC se produit après l'entrée mais avant l'encapsidation du virus. Suite à de tels résultats, le VHC semblait faire partie des virus qui utilisent l'autophagie comme stratégie de réplication. Étonnement, aucune colocalisation entre les protéines virales NS5A, NS3, Core et la protéine autophagique LC3 n'a été observée. Ainsi, nous pouvons conclure que l'autophagie est fortement induite suite à l'infection et que cette induction est indispensable à la réplication du virus.

Deux autres études ont récemment démontré que l'infection par le VHC induit l'autophagie dans les cellules hépatiques (Ait-Goughoulte *et al.* 2008; Sir *et al.* 2008a; Sir *et al.* 2008b). Par contre, les deux équipes exposent des conclusions contradictoires quant à l'utilité de l'autophagie pour la réplication du VHC. Sir *et al.* démontrent que l'autophagie est activée par l'électroporation d'ARN infectieux et concluent que l'autophagie est importante à la réplication du virus. Ait-Goughoulte *et al.* utilisent une lignée cellulaire différente, soit des cellules IHH (immortalized human hépatocytes), et un virus de génotype 1a (clone H77) pour démontrer que l'autophagie est activée suite à l'infection mais suggèrent que l'autophagie n'est pas reliée à la réplication du virus. Ces deux études ont paru en mars 2008 pour Ait-Goughoulte et son équipe et en octobre 2008 pour Sir et son équipe. Les résultats de notre recherche appuient les conclusions de Sir *et al.* Notons, par contre, que nos expériences ont toutes été réalisées par infection et non par électroporation d'ARN viral.

Ainsi, une abolition de l'autophagie est néfaste pour la réplication du virus, ce qui laisse supposer une interaction entre le virus et l'autophagie afin de prendre avantage du phénomène. Il est donc primordial de poursuivre les recherches dans ce domaine afin de déterminer efficacement le lien entre la réplication du VHC et l'autophagie. Notons aussi que le 3-MA a déjà fait l'étude



d'un grand nombre de recherche concernant l'autophagie et que celui-ci est déjà utilisé dans le traitement des cancers du sein, du côlon et des cancers cérébraux. Il pourrait donc faire l'objet d'étude comme thérapie contre les infections hépatiques dues au VHC. Pour ce faire, les études doivent démontrer le lien entre l'abolition de l'autophagie et la diminution de l'infection. C'est pourquoi la suite logique du projet sera de préciser le lien unissant le virus à l'autophagie.

# APPENDICE

## Short Communication

### **The activation of autophagy upon Hepatitis C virus infection is required for its replication.**

Claudia Bélanger and Patrick Labonté

INRS-Institut Armand-Frappier, INRS, 531 Blvd des Prairies, Laval, Quebec, Canada,  
H7V 1B7

Correspondence : Patrick Labonté  
Phone : 450 687 5010 ext 4331  
Fax: 450 686 5314  
[patrick.labonte@iaf.inrs.ca](mailto:patrick.labonte@iaf.inrs.ca)

Running title : Autophagy is activated upon HCV infection

Words in            Summary (150)  
                         Main text (2083)

Figure number: 3

### Summary

Induction of autophagy is a phenomenon that has been observed upon infection by several positive-strand RNA viruses. Recently, it has been shown that electroporation of the Hepatitis C virus RNA (HCV) within human hepatoma cells is sufficient to induce autophagy (Sir *et al.*, 2008). Here, we show for the first time that autophagy is strongly activated upon infection by the well-known HCV JFH1. Furthermore, inhibition of autophagy prior to or during infection is detrimental for viral replication. Interestingly, no colocalization was observed between the lipidated form of LC3 (LC3-II) and the HCV Core, NS3 or NS5A protein. Apart from the up-regulation of LC3-II, infection by JFH1 did not increase the protein level of key autophagic proteins such as ATG5, ATG7, ATG12 and BECN-1. Our results clearly indicate that HCV JFH1 replication benefits from autophagy activation and as a result, HCV subverts the antimicrobial activity of autophagy to promote its replication.

### Main Text

In mammalian cells, autophagy is an essential survival mechanism that allows the recycling of cytoplasmic components within lysosomes (Mizushima, 2007). Although best known for its importance during starvation, autophagy has been associated with diverse physiological and pathophysiological functions such as anti-aging, cell death, tumour suppression and antigen presentation. Moreover, the involvement of autophagy during viral infection has been demonstrated for a variety of viruses (Orvedahl & Levine, 2008; Wileman, 2006). While in some instances, autophagy limits viral replication (English *et al.*, 2009; Shoji-Kawata & Levine, 2009), in most circumstances autophagy seems to be required for viral replication (Khakpoor *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009). For example, accumulation of autophagy-derived double membrane vesicles (DMV) has been observed in cells infected by a number of positive-stranded RNA viruses such as poliovirus, rhinovirus and SARS-CoV, and these DMV have been shown to colocalize with the replication complex (Jackson *et al.*, 2005; Wileman, 2006). Until now, no DMV accumulation has been observed in HCV-infected cells *in vitro*. However, the identification of the HCV replication site as well as of the site of virion formation has been very difficult due to the low level of viral production per cell *in vitro*. Therefore, we postulated that autophagy could be activated upon HCV infection and thus modulate its replication.

Previously, Sir and colleagues demonstrated the activation of the autophagic response in cells transfected with a large amount of HCV RNA (Sir *et al.*, 2008). Their investigation showed that autophagy was triggered by the 1 unfolded protein response (UPR). To

substantiate that observation, we characterized the autophagic response trigger in Huh7 cells under normal conditions of infection using HCVcc (strain JFH1).

The hepatoma cell Huh7, which is widely used to study HCV replication, has been shown to have evolved as a heterogeneous population. To characterize the basal level of autophagic activity in the Huh7 population used in this study, we first investigated the cellular distribution of LC3. The LC3 protein, which is normally dispersed throughout the cells, becomes specifically redistributed to the inner and outer autophagosomal membrane upon conjugation with phosphatidylethanolamine (Maiuri *et al.*, 2007). Since the lipidation of LC3 occurs only under the autophagic response, the appearance of punctuated LC3 within cells is considered the best autophagic marker. Figure 1A shows that in normal conditions, about 31% of Huh7 cells possess punctuated LC3 protein. This result confirms that although most cells show some basal level of autophagic activity, only a fraction of the Huh7 cell population actively produces autophagosomes. As expected, autophagy was easily modulated in Huh7 cells using known autophagy inducers (starvation or rapamycin) or inhibitors such as 3-MA (Fig. 1a). To determine whether the autophagy status changes in HCV-infected cells, we compared the level of punctuated LC3 protein in HCV-infected cells with the adjacent uninfected cells using a confocal microscope. The results presented in Figure 1B clearly indicate that autophagy is greatly enhanced in infected cells. Indeed, the level of punctuated cells in HCV-infected Huh7 cells was comparable to that of rapamycin-treated cells. Furthermore, redistribution of LC3 was observed in cells that were being progressively infected (Fig.1B, arrowhead) indicating that the infection of the cells was triggering autophagy. Interestingly, treatment of infected cells with autophagy inhibitors (3-MA) was not sufficient to restore basal autophagy levels since 67% of the infected cells still had punctuated LC3 compared to 11% of the adjacent uninfected cells (Fig. 1c). This is clearly illustrated in Figure 1b (arrow) in which all uninfected cells have diffuse GFP-LC3 whereas the protein is punctuated in the adjacent infected cells. Figure 1 shows that autophagic activity was significantly enhanced in HCV-infected cells and that it persisted even under a 3-hr treatment with 3-MA. Under such conditions, 3-MA provoked the return to low autophagic activity in Huh7 cells but activity was maintained in HCV-infected cells, strengthening the notion that autophagy is strongly up-regulated by HCV.

We then attempted to determine whether the autophagic activity observed in the HCV-infected cells was beneficial for viral replication. For that purpose, we characterized viral infection and propagation under conditions that enhance or inhibit autophagy. The results depicted in Figure 2 indicated that autophagy is required for proper viral replication.

Indeed, treatment of Huh7 with 3-MA prior to infection affected viral replication (Fig. 2a) whereas pre-treatment with rapamycin did not increase replication. In fact, treatment with rapamycin was slightly toxic to our Huh7 cells, which may explain the decrease of HCV in treated cells. Therefore, the results suggest that the establishment of HCV replication benefits from autophagic activity but that infection is not facilitated in cells already undergoing autophagy. To determine whether autophagy is required for viral entry, post entry events or for viral egress, we used Huh7 cells infected at more than >95% (as evaluated by NS5A expression using a confocal microscope) and treated them with 3-MA. As expected, HCV requires autophagy at the post 1 entry step and prior to viral egress since infected cells treated with 3-MA had a marked decrease in intracellular viral RNA (Fig. 2b). Indeed, if autophagy was necessary solely for HCV entry then the intracellular viral RNA should have been unchanged by 3-MA treatment. Furthermore, the decrease in HCV secretion observed in Huh7 cells treated with 3-MA, as observed by qRT-PCR from the cell supernatant, is proportional to the decrease in intracellular HCV RNA (Fig. 2c). Therefore, blocking autophagy activity has no effect on the egress of JFH1 but rather acts at a post entry stage and prior to encapsidation. We also measured the quantity of infectious particles secreted in the presence of 3-MA and again, we observed a decrease proportional to the total HCV RNA found in the supernatant (Fig. 2d–e). Figure 2 clearly demonstrates that the onset of autophagy activity favours HCV replication and that it probably affects the virus at a post entry event and prior to encapsidation.

The relocalization of LC3 upon HCV infection may suggest an increase in the amount of autophagosomes and autophagolysosomes present in infected Huh7 cells. Accordingly, we used electron microscopy to evaluate the quantity of DMV present in JFH1-infected cells. As a control, 3-MA or rapamycin-treated cells were used. Although uninfected cells and cells treated with 3-MA did not show any accumulation of autophagic vacuoles, rapamycin treatment revealed the presence of autophagosomes (data not shown). As previously shown, infection of Huh7 cells by JFH1 clearly increases the amount of lipid droplets within the cells, however only a slight increase in the number of autophagosomes and autophagolysosomes was observed. In addition, we did not see any evidence for DMV accumulation in HCV-infected cells. Therefore, we suspect that the relocalization of LC3 triggered by JFH1 does not lead to the formation of large autophagosomes but instead that it may be diverted by the virus into small vesicles that cannot yet be detected. Indeed, we were unable to detect a single HCV-like virion within hundreds of infected cells, suggesting that the *in situ* localization of the HCV replication site is difficult. To determine whether the lipidated LC3-containing vesicles do harbour HCV proteins, we

used a confocal microscope and analyzed the putative colocalization of three HCV proteins (Core, NS3 and NS5A) with LC3. The intracellular localizations of these three HCV proteins were as described in a previous report (Miyazari *et al.*, 2007) with the core and NS5A protein forming discs that have been shown to surround lipid droplets. Surprisingly, the localization of these three HCV proteins did not coincide with lipidated LC3 (Fig. 3a). Therefore, it is possible that i) the LC3-containing vesicles do not interact with HCV, ii) another HCV protein beside C, NS5A and NS3 is involved in LC3 re-localization or iii) the LC3 protein is only transiently present on those vesicles.

As the final experiment, we performed immunoblotting to compare the amount of autophagic proteins in infected and uninfected cells. As previously suggested, the levels of ATG5, ATG7 and ATG12 normally remain unchanged during autophagy (Klionsky *et al.*, 2008). Moreover, it is still not clear whether the LC3 level varies upon activation of autophagy. Nevertheless, the lipidation of LC3-I to form LC3-II is a clear indicator of autophagic activity. The results presented in Figure 3b show that of all the autophagic proteins tested, the only significant change was the marked increase in the lipidated form of LC3 in infected cells, which was supported by immunofluorescence staining. To our surprise, we did not observe an increase in BECN1 in infected cells as previously described in IHH cells infected by HCV H77 (genotype 1a) or in Huh7.5 cells infected by JFH1 (Ait-Goughoulte *et al.*, 2008). It is well established that BECN1 is a positive regulator of autophagy (Delgado *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2009). Indeed, dissociation of BECN1 from Bcl-2 as part of a complex including hVPS34 results in the activation of autophagy. However, induction of autophagy by BECN-1 does not result necessarily in its up-regulation. Since the Bcl-2–BECN 1 interaction is regulated by several proteins including kinases, tumour suppressors and MyD88, better characterization of BECN1 within the cells is required to determine its involvement in HCV-induced autophagy (Shi & Kehrl, 2008). Furthermore, autophagy activation through the UPR has been demonstrated following JFH1 RNA transfection (Sir *et al.*, 2008). Thus, the analysis of the UPR following HCV infection required more attention.

Autophagy is an ancient highly conserved homeostatic process. Its antimicrobial activity has been linked to its ability to modulate innate and adaptive immunity (Levine & Deretic, 2007), and to its activation through the pattern recognition receptors (PRR) and the Toll-like receptor TLR (Delgado *et al.*, 2008). Therefore, the pathogen-associated molecular patterns (PAMP) that are produced by most viruses could potentially activate autophagy. Autophagy activation upon infection by viruses and especially RNA viruses through PRR may be a general host defence mechanism. The way in which viruses have

evolved to circumvent its antimicrobial activity to promote their own replication demonstrates the astounding ability of viruses to adapt to their inhospitable environment. We suggest that HCV can modulate autophagy 1 for its own benefit using an as yet unidentified virus–host interaction.

### Acknowledgement

We are grateful to Dr. Takaji Wakita (Japan) for the HCV JFH1 replication system, to Dr. Dr. Tamotsu Yoshimori (Japan) for the GFP-LC3 construct and to Dr. Olivier Nicolas (Canada) for the rabbit anti-NS5A antibody. P.L. received salary support from the "Fonds en Santé du Québec" (FRSQ). The work was supported by a grant from NSERC of Canada.

### Figure Legends

**Fig. 1.** GFP-LC3 is found in a punctuated structure in Huh7 cells infected with HCV JFH1. (a) Immunostaining showing the cellular distribution of GFP-LC3 in untreated Huh7 (mock) or in Huh7 cells treated with rapamycin or 3-MA. Proportion of cells with a punctuated distribution of LC3 (LC3-II) in normal uninfected Huh7 cells (right panel). Average of three independent experiments with at least 100 GFP-LC3-expressing cells per experiment. (b) Upon infection, GFP-LC3 becomes punctuated (arrowhead) and treatment with the autophagy inhibitor 3-MA is not sufficient to block GFP-LC3 punctuation in infected cells (arrow). (c) Distribution of punctuated GFP-LC3 in infected and adjacent uninfected cells.

**Fig. 2.** Autophagy is required for efficient HCV replication. (a) Treatment of Huh7 cells prior to infection with activator (rapamycin) or inhibitor (3-MA) of autophagy. (b) Treatment of infected cells (>95% HCV+) with 3-MA affected the intracellular level of HCV RNA, which resulted in a reduction in secreted particles (c) and infectious particles (d, e).

**Fig. 3.** (a) Immunofluorescence staining of infected Huh7 cells showed no colocalization of HCV core, NS3 or NS5A proteins and GFP-LC3. (b) Immunoblot showing the protein level of ATG5, ATG7, ATG12, LC3 and BECN1 in uninfected and infected cells.

### References

- Ait-Goughoulte, M., Kanda, T., Meyer, K., Ryerse, J. S., Ray, R. B. & Ray, R. (2008). Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* **82**, 2241–2249.
- Delgado, M., Singh, S., De Haro, S., Master, S., Ponpuak, M., Dinkins, C., Ornatowski, W., Vergne, I. & Deretic, V. (2009). Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev* **227**, 189–202.



- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G. & Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* **27**, 1110–1121.
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippe, R. & Desjardins, M. (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* **10**, 480–487.
- Jackson, W. T., Giddings, T. H., Jr., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R. & Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* **3**, e156.
- Khakpoor, A., Panyasrivanit, M., Wikan, N. & Smith, D. R. (2009). A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *J Gen Virol* **90**, 1093–1103.
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A. & other authors (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151–175.
- Levine, B. & Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 767–777.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 741–752.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**, 1089–1097.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**, 2861–2873.
- Orvedahl, A. & Levine, B. (2008). Viral evasion of autophagy. *Autophagy* **4**, 280–285.
- Shi, C. S. & Kehrl, J. H. (2008). MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem* **283**, 33175–33182.
- Shoji-Kawata, S. & Levine, B. (2009). Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochim Biophys Acta*. [Epub ahead of print]
- Sir, D., Chen, W. L., Choi, J., Wakita, T., Yen, T. S. & Ou, J. H. (2008). Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* **48**, 1054–1061.
- Wileman, T. (2006). Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* **312**, 875–878.
- Yoon, S. Y., Ha, Y. E., Choi, J. E., Ahn, J., Lee, H. & Kim, I. D. H. (2009). Autophagy in coxsackievirus-infected neurons. *Autophagy* **5**, 388–389.
- Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N. & Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* **11**, 468–476.
- Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M. & Gao, G. F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* **5**, 321–328.

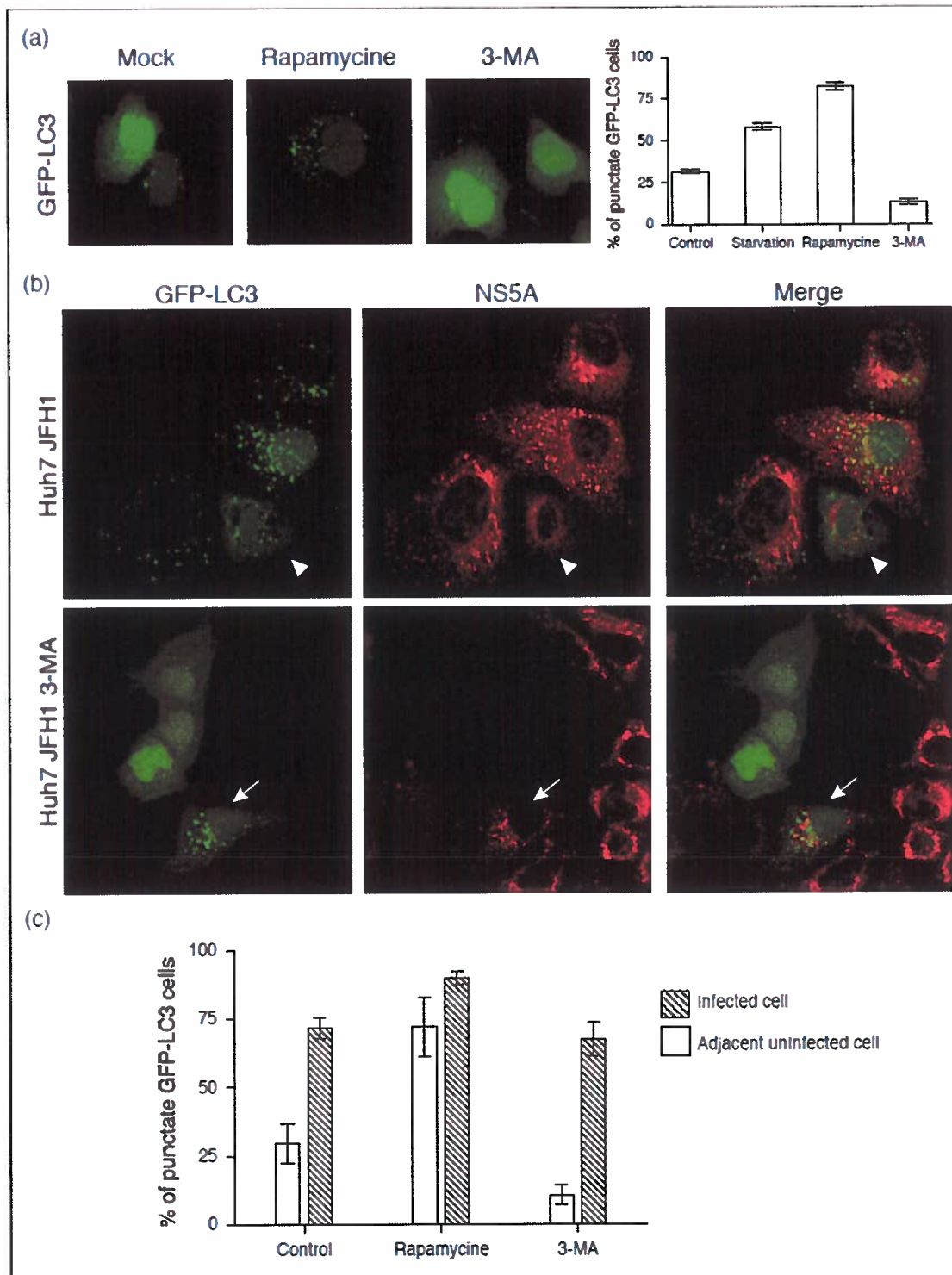


Figure 1

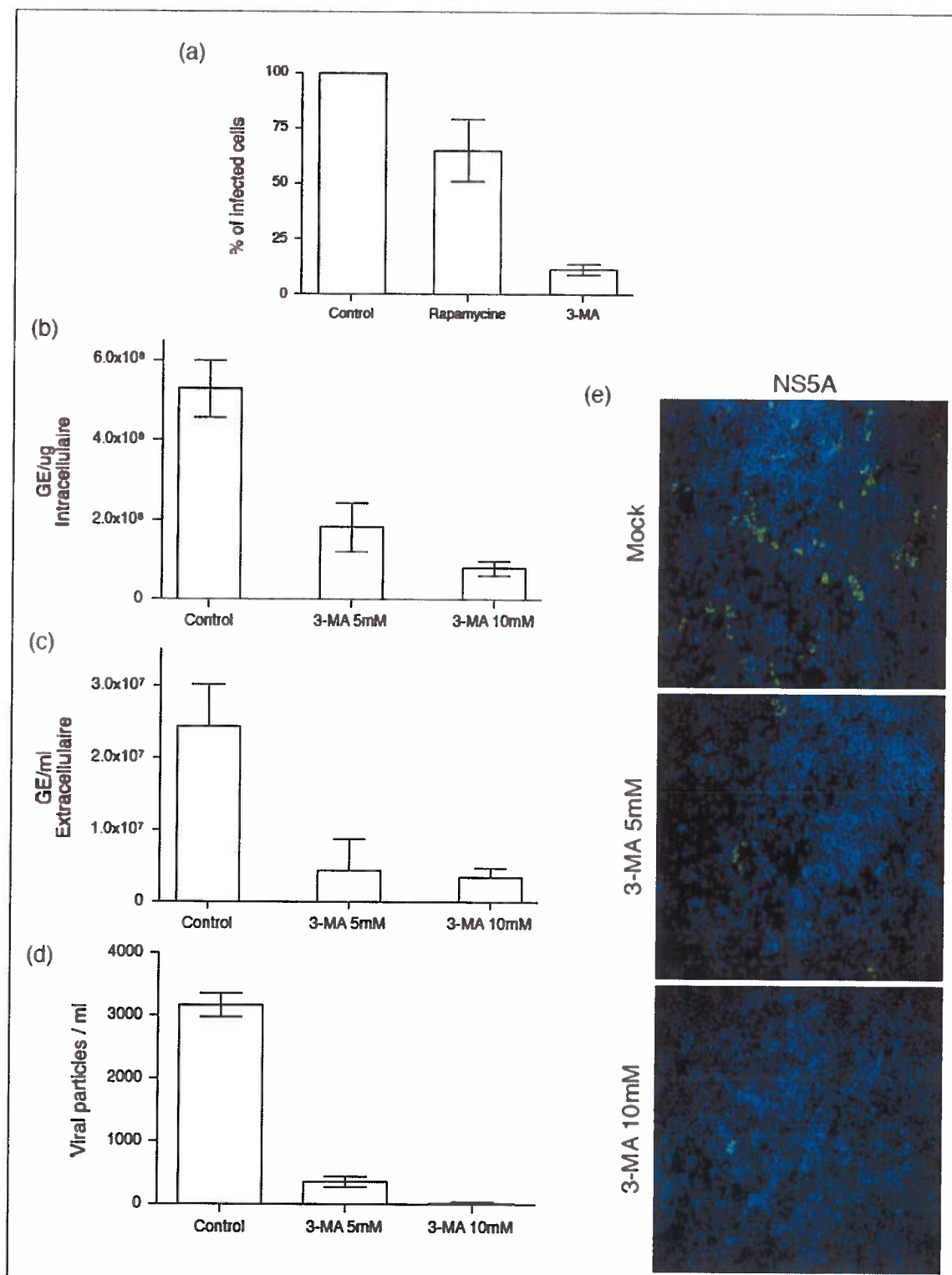


Figure 2

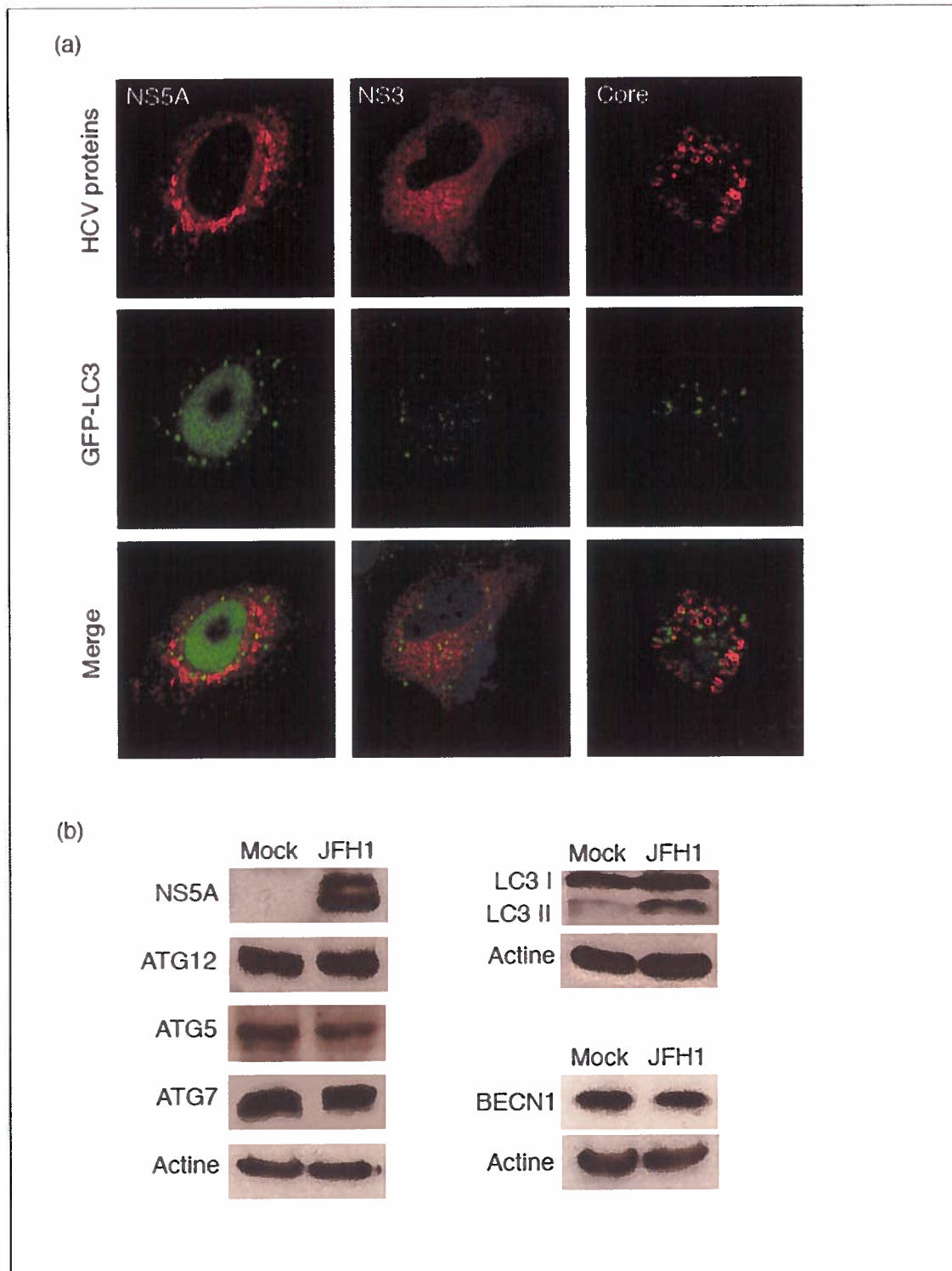


Figure 3

## RÉFÉRENCES

- Aguib, Y., Heiseke, A., Gilch, S., Riemer, C., Baier, M., Schatzl, H. M., et Ertmer, A. 2009. Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy* 5 (3):361-9.
- Ait-Goughoulte, M., Kanda, T., Meyer, K., Ryerse, J. S., Ray, R. B., et Ray, R. 2008. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* 82 (5):2241-9.
- Aizaki, H., Lee, K. J., Sung, V. M., Ishiko, H., et Lai, M. M. 2004. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324 (2):450-61.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F., et Bartenschlager, R. 2006. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* 281 (15):9833-6.
- Backer, J. M. 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal* 410 (1):1-17.
- Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J. P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trepo, C., Gebuhrer, L., Paranhos-Baccala, G., Penin, F., et Inchauspe, G. 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78 (19):10460-9.
- Bartenschlager, R. 2006. Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Curr Opin Microbiol* 9 (4):416-22.
- Bartenschlager, R., et Sparacio, S. 2007. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* 127 (2):195-207.
- Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhardt, R. J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Blum, H. E., et Baumert, T. F. 2006. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80 (21):10579-90.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., et Cosset, F. L. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197 (5):633-42.
- Beaulaton, J., et Lockshin, R. A. 1977. Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscles of *Anthereae polyphemus* and *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) with particular reference of cellular autophagy. *Journal of Morphology* 154 (1):39-57.

- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., et Rouille, Y. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80 (14):6964-72.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F., et Moradpour, D. 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 277 (10):8130-9.
- Cai, Z., Zhang, C., Chang, K. S., Jiang, J., Ahn, B. C., Wakita, T., Liang, T. J., et Luo, G. 2005. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol* 79 (22):13963-73.
- Cao, J., Zhou, Y., et Gong, G. Z. 2006. [Effect of HCV NS5A on STAT1 phosphorylation and nuclear translocation induced by IFN alpha-2b]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 14 (12):894-7.
- Cao, Y., et Klionsky, D. J. 2007. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res* 17 (10):839-49.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., et Dubuisson, J. 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76 (8):3720-30.
- Cecconi, F., et Levine, B. 2008. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Developmental Cell* 15 (3):344-57.
- Cerny, A., et Chisari, F. V. 1999. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 30 (3):595-601.
- Chang, C. P., Yang, M. C., Liu, H. S., Lin, Y. S., et Lei, H. Y. 2007. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* 45 (2):286-96.
- Chaumorcel, M., Souquere, S., Pierron, G., Codogno, P., et Esclatine, A. 2008. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* 4 (1):46-53.
- Dahari, H., Major, M., Zhang, X., Mihalik, K., Rice, C. M., Perelson, A. S., Feinstone, S. M., et Neumann, A. U. 2005. Mathematical modeling of primary hepatitis C infection: noncytolytic clearance and early blockage of virion production. *Gastroenterology* 128 (4):1056-66.
- Daley, J. K., Gechman, L. A., Skipworth, J., et Rall, G. F. 2005. Poliovirus replication and spread in primary neuron cultures. *Virology* 340 (1):10-20.

- Date, T., Kato, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Yasui, K., Mizokami, M., et Wakita, T. 2004. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* 279 (21):22371-6.
- Davis, G. L., Krawczynski, K., et Szabo, G. 2007. Hepatitis C virus infection--pathobiology and implications for new therapeutic options. *Dig Dis Sci* 52 (4):857-75.
- Delgado, M. A., et Deretic, V. 2009. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. *Cell Death and Differentiation*.
- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., et Deretic, V. 2008. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO Journal* 27 (7):1110-21.
- Dice, J. F. 2007. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3 (4):295-9.
- Diedrich, G. 2006. How does hepatitis C virus enter cells? *Febs J* 273 (17):3871-85.
- Dubuisson, J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13 (17):2406-15.
- Dubuisson, J., Helle, F., et Cocquerel, L. 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 10 (4):821-7.
- Eskelinen, E. L., et Saftig, P. 2009. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 (4):664-73.
- Espert, L., Codogno, P., et Biard-Piechaczyk, M. 2007. Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses. *Journal of Molecular Medicine* 85 (8):811-23.
- Feld, J. J., et Hoofnagle, J. H. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436 (7053):967-72.
- Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., et Cecconi, F. 2007. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447 (7148):1121-5.
- Fortunato, F., Burgers, H., Bergmann, F., Rieger, P., Buchler, M. W., Kroemer, G., et Werner, J. 2009. Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* 137 (1):350-60, 360 e1-5.



- Fricke, J., Voss, C., Thumm, M., et Meyers, G. 2004. Processing of a pestivirus protein by a cellular protease specific for light chain 3 of microtubule-associated proteins. *J Virol* 78 (11):5900-12.
- Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R., et Katze, M. G. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18 (9):5208-18.
- Goldsmith, C. S., Tatti, K. M., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Comer, J. A., Lee, W. W., Rota, P. A., Bankamp, B., Bellini, W. J., et Zaki, S. R. 2004. Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis* 10 (2):320-6.
- Griffin, S., Stgelais, C., Owsianka, A. M., Patel, A. H., Rowlands, D., et Harris, M. 2008. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* 48 (6):1779-90.
- Guevin, C., Lamarre, A., et Labonte, P. 2009. Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. *Antiviral Res.*
- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., et Ohsumi, Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 282 (52):37298-302.
- Hartwell, D., et Shepherd, J. 2009. Pegylated and non-pegylated interferon-alfa and ribavirin for the treatment of mild chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care* 25 (1):56-62.
- He, C., Baba, M., et Klionsky, D. J. 2009. Double duty of Atg9 self-association in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 5 (3):385-7.
- Hofmann, W. P., Sarrazin, C., Kronenberger, B., Schonberger, B., Bruch, K., et Zeuzem, S. 2003. Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J Infect Dis* 187 (6):982-7.
- Huang, S. C., Chang, C. L., Wang, P. S., Tsai, Y., et Liu, H. S. 2009. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *Journal of Medical Virology* 81 (7):1241-52.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E., et Moradpour, D. 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284 (1):70-81.

Jackson, W. T., Giddings, T. H., Jr., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., et Kirkegaard, K. 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* 3 (5):e156.

Juhasz, G., et Neufeld, T. P. 2006. Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biology* 4 (2):e36.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., et Yoshimori, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19 (21):5720-8.

Kao, C. C., Yang, X., Kline, A., Wang, Q. M., Barket, D., et Heinz, B. A. 2000. Template requirements for RNA synthesis by a recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 74 (23):11121-8.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., et Wakita, T. 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125 (6):1808-17.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M., et Wakita, T. 2005. Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol* 79 (1):592-6.

Khakpoor, A., Panyasrivanit, M., Wikan, N., et Smith, D. R. 2009. A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *Journal of General Virology* 90 (Pt 5):1093-103.

Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., et Yoshimori, T. 2001. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Reports* 2 (4):330-5.

Klionsky, D. J. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (11):931-7.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et Ohsumi, Y. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell* 5 (4):539-45.

Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M., et Rice, C. M. 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277 (5325):570-4.

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., et Chiba, T.

2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *Journal of Cell Biology* 169 (3):425-34.

Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., et Kondo, S. 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer* 5 (9):726-34.

Kourtis, N., et Tavernarakis, N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death and Differentiation* 16 (1):21-30.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., et Mizushima, N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432 (7020):1032-6.

Labonte, P., Axelrod, V., Agarwal, A., Aulabaugh, A., Amin, A., et Mak, P. 2002. Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by structure-based site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 277 (41):38838-46.

Lee, S. P., Brooks, J. M., Al-Jarrah, H., Thomas, W. A., Haigh, T. A., Taylor, G. S., Humme, S., Schepers, A., Hammerschmidt, W., Yates, J. L., Rickinson, A. B., et Blake, N. W. 2004. CD8 T cell recognition of endogenously expressed Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Journal of Experimental Medicine* 199 (10):1409-20.

Lee, Y. R., Lei, H. Y., Liu, M. T., Wang, J. R., Chen, S. H., Jiang-Shieh, Y. F., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, C. C., et Liu, H. S. 2008. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* 374 (2):240-8.

Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., et Weber, P. C. 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6 (10):937-43.

Levine, B., Goldman, J. E., Jiang, H. H., Griffin, D. E., et Hardwick, J. M. 1996. Bcl-2 protects mice against fatal alphavirus encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (10):4810-5.

Levine, B., Sinha, S., et Kroemer, G. 2008. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4 (5):600-6.

Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H., et Jung, J. U. 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biology* 8 (7):688-99.

Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., et Levine, B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402 (6762):672-6.

- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B., et Levine, B. 1998. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of Virology* 72 (11):8586-96.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., et Rice, C. M. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309 (5734):623-6.
- Lindenbach, B. D., et Rice, C. M. 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436 (7053):933-8.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Talloczy, Z., Levine, B., et Dinesh-Kumar, S. P. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121 (4):567-77.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., et Bartenschlager, R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285 (5424):110-3.
- Mann, S. S., et Hammarback, J. A. 1994. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *Journal of Biological Chemistry* 269 (15):11492-7.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., et Martoglio, B. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21 (15):3980-8.
- McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., Feinstone, S. M., et Rice, C. M. 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (8):2879-84.
- Meshkat, Z., Audsley, M., Beyer, C., Gowans, E. J., et Haqshenas, G. 2009. Reverse genetic analysis of a putative, influenza virus M2 HXXXW-like motif in the p7 protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 16 (3):187-94.
- Miyazari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., et Shimotohno, K. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9 (9):1089-97.
- Miyazari, Y., Hijikata, M., Yamaji, M., Hosaka, M., Takahashi, H., et Shimotohno, K. 2003. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* 278 (50):50301-8.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., et Ohsumi, Y. 1998a. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395 (6700):395-8.

Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., et Ohsumi, Y. 1998b. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 273 (51):33889-92.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., et Yoshimori, T. 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology* 152 (4):657-68.

Mizushima, N., Yoshimori, T., et Ohsumi, Y. 2003. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (5):553-61.

Moffatt, S., Yaegashi, N., Tada, K., Tanaka, N., et Sugamura, K. 1998. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* 72 (4):3018-28.

Moradpour, D., Evans, M. J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H. E., Goff, S. P., Lindenbach, B. D., et Rice, C. M. 2004. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 78 (14):7400-9.

Moradpour, D., Penin, F., et Rice, C. M. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5 (6):453-63.

Moretti, L., Attia, A., Kim, K. W., et Lu, B. 2007a. Crosstalk between Bak/Bax and mTOR signaling regulates radiation-induced autophagy. *Autophagy* 3 (2):142-4.

Moretti, L., Cha, Y. I., Niermann, K. J., et Lu, B. 2007b. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle* 6 (7):793-8.

Murphy, E. L., Bryzman, S. M., Glynn, S. A., Ameti, D. I., Thomson, R. A., Williams, A. E., Nass, C. C., Ownby, H. E., Schreiber, G. B., Kong, F., Neal, K. R., et Nemo, G. J. 2000. Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). *Hepatology* 31 (3):756-62.

Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., et

- Yoshimori, T. 2004. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306 (5698):1037-40.
- Nakashima, A., Tanaka, N., Tamai, K., Kyuuma, M., Ishikawa, Y., Sato, H., Yoshimori, T., Saito, S., et Sugamura, K. 2006. Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology* 349 (2):254-63.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., et Perelson, A. S. 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282 (5386):103-7.
- Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., et Risco, C. 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* 97 (2):147-72.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F., et Imaizumi, K. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and Cellular Biology* 26 (24):9220-31.
- Ohsumi, Y., et Mizushima, N. 2004. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol* 15 (2):231-6.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallozy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., et Levine, B. 2007. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1 (1):23-35.
- Otto, G. A., et Puglisi, J. D. 2004. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119 (3):369-80.
- Pallaoro, M., Lahm, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Nardella, C., Orsatti, L., Bonelli, F., Orru, S., Narjes, F., et Steinkuhler, C. 2001. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol* 75 (20):9939-46.
- Panyasrivanit, M., Khakpoor, A., Wikan, N., et Smith, D. R. 2009. Linking dengue virus entry and translation/replication through amphisomes. *Autophagy* 5 (3):434-5.
- Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., et Codogno, P. 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 90 (2):313-23.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., et Levine, B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122 (6):927-39.

- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D., et Pawlotsky, J. M. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39 (1):5-19.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., et Codogno, P. 2000. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *Journal of Biological Chemistry* 275 (2):992-8.
- Piodi, A., Chouteau, P., Lerat, H., Hezode, C., et Pawlotsky, J. M. 2008. Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology* 48 (1):16-27.
- Pisarev, A. V., Shirokikh, N. E., et Hellen, C. U. 2005. Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol* 328 (7):589-605.
- Prentice, E., Jerome, W. G., Yoshimori, T., Mizushima, N., et Denison, M. R. 2004. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* 279 (11):10136-41.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., et Levine, B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation* 112 (12):1809-20.
- Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R. N., Gilpin, C., et Levine, B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128 (5):931-46.
- Raught, B., Gingras, A. C., et Sonenberg, N. 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (13):7037-44.
- Ravikumar, B., Stewart, A., Kita, H., Kato, K., Duden, R., et Rubinsztein, D. C. 2003. Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Human Molecular Genetics* 12 (9):985-94.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J., et Rubinsztein, D. C. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics* 36 (6):585-95.

- Reggiori, F. 2006. 1. Membrane origin for autophagy. *Current Topics in Developmental Biology* 74:1-30.
- Rehermann, B., et Nascimbeni, M. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5 (3):215-29.
- Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., et Prensier, G. 2008. Hepatitis C virus budding at lipid droplet-associated ER membrane visualized by 3D electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 130 (3):561-6.
- Ropolo, A., Grasso, D., Pardo, R., Sacchetti, M. L., Archange, C., Lo Re, A., Seux, M., Nowak, J., Gonzalez, C. D., Iovanna, J. L., et Vaccaro, M. I. 2007. The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 282 (51):37124-33.
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., et Klionsky, D. J. 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature Reviews. Drug Discovery* 6 (4):304-12.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., et Monica, N. 1995. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* 69 (12):7461-71.
- Sarkar, S., et Rubinsztein, D. C. 2008. Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Molecular BioSystems* 4 (9):895-901.
- Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S., et Munz, C. 2006. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* 84 (3):194-202.
- Shi, C. S., et Kehrl, J. H. 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 283 (48):33175-82.
- Shoji-Kawata, S., et Levine, B. 2009. Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Sinha, S., Colbert, C. L., Becker, N., Wei, Y., et Levine, B. 2008. Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* 4 (8):989-97.
- Sinha, S., et Levine, B. 2008. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 Suppl 1:S137-48.
- Sir, D., Chen, W. L., Choi, J., Wakita, T., Yen, T. S., et Ou, J. H. 2008a. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 48 (4):1054-61.



- Sir, D., Liang, C., Chen, W. L., Jung, J. U., et Ou, J. H. 2008b. Perturbation of autophagic pathway by hepatitis C virus. *Autophagy* 4 (6):830-1.
- Sklan, E. H., Charuworn, P., Pang, P. S., et Glenn, J. S. 2009. Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6 (4):217-27.
- Snijder, E. J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J. J., van der Meulen, J., Koerten, H. K., et Mommaas, A. M. 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol* 80 (12):5927-40.
- Suhy, D. A., Giddings, T. H., Jr., et Kirkegaard, K. 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* 74 (19):8953-65.
- Suzuki, T., Aizaki, H., Murakami, K., Shoji, I., et Wakita, T. 2007a. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 42 (6):411-23.
- Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H., et Wakita, T. 2007b. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* 59 (12):1200-12.
- Tai, C. L., Chi, W. K., Chen, D. S., et Hwang, L. H. 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70 (12):8477-84.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J. U., Cheng, J. Q., Mule, J. J., Pledger, W. J., et Wang, H. G. 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology* 9 (10):1142-51.
- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G. B., et Kondo, S. 2005. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Research* 65 (8):3336-46.
- Tan, Seng-Lai. 2006. *Hepatitis C virus: genomes and molecular biology*. Illustrated: Horizon Scientific Press.
- Tanida, I., Ueno, T., et Kominami, E. 2004a. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *Journal of Biological Chemistry* 279 (46):47704-10.
- Tanida, I., Ueno, T., et Kominami, E. 2004b. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (12):2503-18.

- Taylor, M. P., et Kirkegaard, K. 2007. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* 81 (22):12543-53.
- Tellinghuisen, T. L., Evans, M. J., von Hahn, T., You, S., et Rice, C. M. 2007. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 81 (17):8853-67.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E., et Rice, C. M. 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 279 (47):48576-87.
- Thomson, A. W., Turnquist, H. R., et Raimondi, G. 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature Reviews Immunology* 9 (5):324-37.
- Thomson, B. J., et Finch, R. G. 2005. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 11 (2):86-94.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., et Wolf, D. H. 1994. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 349 (2):275-80.
- Tong, M. J., el-Farra, N. S., Reikes, A. R., et Co, R. L. 1995. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 332 (22):1463-6.
- Troesch, M., Meunier, I., Lapierre, P., Lapointe, N., Alvarez, F., Boucher, M., et Soudeyns, H. 2006. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352 (2):357-67.
- Tsukada, M., et Ohsumi, Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 333 (1-2):169-74.
- Vilasco, M., Larrea, E., Vitour, D., Dabo, S., Breiman, A., Regnault, B., Riezu, J. I., Eid, P., Prieto, J., et Meurs, E. F. 2006. The protein kinase IKKepsilon can inhibit HCV expression independently of IFN and its own expression is downregulated in HCV-infected livers. *Hepatology* 44 (6):1635-47.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., et Liang, T. J. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 (7):791-6.
- Wang, C. W., et Klionsky, D. J. 2003. The molecular mechanism of autophagy. *Molecular Medicine* 9 (3-4):65-76.
- Wang, T. H., Rijnbrand, R. C., et Lemon, S. M. 2000. Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent

translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 74 (23):11347-58.

Wasley, A., et Alter, M. J. 2000. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 20 (1):1-16.

Webber, J. L., Young, A. R., et Tooze, S. A. 2007. Atg9 trafficking in Mammalian cells. *Autophagy* 3 (1):54-6.

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., et Levine, B. 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30 (6):678-88.

Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E., et 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 (5):2293-304.

Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., et Luo, H. 2008. Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *Journal of Virology* 82 (18):9143-53.

Xie, Z., et Klionsky, D. J. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* 9 (10):1102-9.

Xu, Y., Liu, X. D., Gong, X., et Eissa, N. T. 2008. Signaling pathway of autophagy associated with innate immunity. *Autophagy* 4 (1):110-2.

Yamamoto, M., Suzuki, S. O., et Himeno, M. 2009. The effects of dynein inhibition on the autophagic pathway in glioma cells. *Neuropathology*.

Yan, Y., Flinn, R. J., Wu, H., Schnur, R. S., et Backer, J. M. 2009. hVps15, but not Ca<sup>2+</sup>/CaM, is required for the activity and regulation of hVps34 in mammalian cells. *Biochemical Journal* 417 (3):747-55.

Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U., et 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 (16):8738-43.

Yorimitsu, T., et Klionsky, D. J. 2007. Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy. *Autophagy* 3 (2):160-2.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., et Klionsky, D. J. 2006. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 281 (40):30299-304.

Yoshimori, T., et Noda, T. 2008. Toward unraveling membrane biogenesis in mammalian autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 20 (4):401-7.

Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Kochl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., et Tooze, S. A. 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science* 119 (Pt 18):3888-900.

Yu, G. Y., Lee, K. J., Gao, L., et Lai, M. M. 2006. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 80 (12):6013-23.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., et Chisari, F. V. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (26):9294-9.

Zhong, J., Gastaminza, P., Chung, J., Stamataki, Z., Isogawa, M., Cheng, G., McKeating, J. A., et Chisari, F. V. 2006. Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J Virol* 80 (22):11082-93.

Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y., et Hong, Z. 2000. De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol* 74 (4):2017-22.