

CHERIFA AYARI

**ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LA
RIBONUCLÉASE DICER ET LES PROTÉINES NON-
STRUCTURALES DU VIRUS DE L'HÉPATITE C**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

DÉCEMBRE 2005

© Cherifa Ayari, 2005

Résumé

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus à ARN qui affecte plus de 170 millions de personnes à travers le monde, dont plus de 85% sont infectés de façon persistante. Le génome du VHC est susceptible au clivage par la ribonucléase Dicer *in vitro*, mais non *in vivo*, suggérant que ce virus ait développé un moyen pour échapper à la voie de l'interférence à l'ARN, un possible mécanisme de défense de l'hôte contre les virus chez l'humain.

Dans le but d'examiner la possibilité que certaines protéines du virus puissent interagir et/ou interférer avec l'activité de Dicer, nous avons sondé une librairie d'ADN complémentaire virale à l'aide d'une approche de double-hybride chez la levure, en utilisant Dicer comme appât. Nous avons observé une interaction entre Dicer et différents peptides dérivés des protéines non-structurales du VHC et identifié les portions de Dicer impliquées. Nous avons également tenté de confirmer ces interactions par des expériences de coimmunoprécipitation *in vivo* et *in vitro*.

Avant-propos

Des expériences du double-hybride chez la levure ont permis d'identifier des interactions entre Dicer et des protéines non-structurales du VHC. Nous avons donc tenté d'effectuer la mise au point d'un système d'expression permettant la production de la protéine NS3 dans le but de caractériser l'interaction Dicer-NS3 *in vitro*. Cependant, l'élaboration de ce système s'est avéré plus complexe que prévu. Pour pallier à ce problème, nous avons eu recours à la transcription/traduction *in vitro*. Grâce au système de réplicon, un ARN subgénomique codant pour les protéines non-structurales du virus, transfecté dans des cellules Huh-7 (hépatocytes dérivées d'une tumeur hépatique humaine), nous avons pu étudier l'interaction protéique *in vivo*.

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire du Dr. Patrick Provost au sein de l'unité de Rhumatologie et Immunologie.

À l'occasion, je tiens à remercier tout d'abord le Dr. Pierre Borgeat de m'avoir accueillie dans son unité et le Dr. Paul Naccache d'avoir transféré mon dossier entre de très bonnes mains. Je remercie également la Dre Marie Audette, responsable facultaire des études de 2ième et 3ième cycles, et le Dr Sylvain Bourgoïn, directeur du programme, pour leur disponibilité et leur patience.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Patrick Provost. Merci Monsieur de m'avoir donné cette grande chance et confiance, de m'avoir supporté pendant plus de deux années, de ta disponibilité, de ton ouverture d'esprit, de ton respect...Au cours de ma formation, j'ai appris beaucoup de choses, et si je réussis mes éventuelles études, c'est grâce à toi. Tu as su comment me mettre sur la bonne voie. Je voudrais t'exprimer toute ma reconnaissance et gratitude. MERCI!

Au cours de ces années, j'ai eu la chance de côtoyer les membres de mon équipe dans une ambiance familiale et c'est grâce à eux que j'ai pu m'adapter et supporter l'éloignement de ma famille, surtout au cours de ma première année. Je tiens à remercier Isabelle Plante pour sa patience, ses conseils techniques et sa contribution dans les expériences du double-hybride; ton aide a été très précieuse. Dominique Ouellet, la plus serviable et disponible à m'aider, je te remercie pour tes conseils, ton aide et surtout pour ton soutien moral. Je remercie Philippe St-Martin et Pierre Plante pour leur aide et d'avoir partagé avec moi une ambiance sympathique au cours du dîner. J'ai également eu l'immense plaisir de connaître Vincent Boissonneault, Julie Laflamme, Geneviève Pépin, Marjorie Perron et l'adorable Lise-Andrée Gobeil.

Je n'oublie pas l'amitié de Sébastien Lévesque, Élise Lavoie et Michel Fausther. Je vous remercie de votre aide précieuse pour la préparation de mon premier séminaire et pour

votre soutien moral. Sébastien, je te remercie pour ton aide dans la prélecture de ce mémoire.

Je remercie le Dr. Denis Leclerc pour nous avoir fourni la librairie d'ADNc dérivée du VHC.

Je tiens également à remercier mes professeurs pour leur disponibilité et pour m'avoir permis d'acquérir de nouvelles connaissances scientifiques, en particulier le Dr Sylvain Bourgoin et les Drs Jean Sévigny et Fawzi Aoudjit.

J'adresse un grand MERCI aux Drs Guy Boivin et Jean Sévigny d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

À ma mère et mon père, les parents les plus merveilleux au monde, à qui je dois tout. À Balkis ma meilleure amie. À tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près.

Table des matières

Chapitre 1 Introduction.....	6
1.1 L'interférence à l'ARN (iARN).....	6
1.1.1 Historique.....	6
1.1.2 Mécanisme.....	7
1.1.3 Les ribonucléases III.....	10
1.1.3.1 Drosha.....	10
1.1.3.2 Dicer.....	11
1.1.3.3 Les protéines interagissant avec Dicer.....	13
1.1.4 Les microARN.....	14
1.1.5 Les petits ARN interférents (siARN).....	17
1.2 Résistance des virus à l'iARN.....	18
1.3 Le virus de l'hépatite C (VHC).....	20
1.3.1 Classification et épidémiologie.....	20
1.3.2 Organisation génomique.....	20
1.3.3 Le « Internal Ribosome Entry Site » (IRES).....	22
1.3.4 La protéine non-structurale 3 (NS3).....	24
1.3.5 La protéine non-structurale 5B (NS5B).....	25
1.3.6 Modèles d'études du VHC.....	25
1.4 L'iARN et le VHC.....	26
1.5 Hypothèses et objectifs.....	26
Chapitre 2 Matériels et méthodes.....	28
2.1 Le système du double-hybride chez la levure.....	28
2.1.1 Principe.....	28
2.1.2 Construction des vecteurs.....	30
2.1.3 Culture des levures et protocole du double-hybride.....	30
2.2 Expériences de coimmunoprécipitation <i>in vivo</i>	31
2.3 Expériences de coimmunoprécipitation <i>in vitro</i>	33
2.3.1 Construction des vecteurs.....	33
2.3.2 Transcription/traduction <i>in vitro</i>	35
2.3.3 Coimmunoprécipitation <i>in vitro</i>	35
Chapitre 3 Résultats.....	36
3.1 Double-hybride chez la levure.....	36
3.2 Coimmunoprécipitation <i>in vivo</i>	41
3.3 Coimmunoprécipitation <i>in vitro</i>	43
Chapitre 4 Discussion et conclusion.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples de miARN dont la fonction et la cible ont été caractérisées expérimentalement.....	16
Tableau 2 : Construction des vecteurs pour la transcription/traduction <i>in vitro</i>	34
Tableau 3 : Les témoins positifs et négatifs utilisés dans les expériences de double-hybride chez la levure.	37
Tableau 4 : Interaction entre Dicer et différents peptides dérivés du VHC par le système du double-hybride chez la levure.....	39
Tableau 5 : Interaction entre différents domaines de Dicer et les peptides dérivés du VHC par le système du double-hybride chez la levure	40

Liste des figures

Figure 1 Mécanisme général de la voie de l'iARN.....	8
Figure 2 Représentation schématique des domaines des ribonucléases de type III.....	11
Figure 3 Le miARN lin-4 et la reconnaissance de lin-14, son ARNm cible.	15
Figure 4 Organisation génomique du VHC	22
Figure 5 Structure de la région 5'NT du VHC	23
Figure 6 Principe de l'activation des gènes rapporteurs chez la levure PJ69-4A.....	28
Figure 7 Principe de l'approche du double-hybride chez la levure.	29
Figure 8 Identification des différents peptides du VHC pouvant interagir avec Dicer	38
Figure 9 Étude de coimmunoprécipitation <i>in vivo</i> entre Dicer et NS5B	42
Figure 10 Étude de coimmunoprécipitation <i>in vivo</i> entre Dicer et NS3	42
Figure 11 Étude de coimmunoprécipitation <i>in vitro</i> entre Dicer/NS3 et Dicer/NS5B.	44
Figure 12 Étude de coimmunoprécipitation <i>in vitro</i> entre Dicer/DHCV36 et Dicer/DHCV87.	44
Figure 13 Étude de coimmunoprécipitation <i>in vitro</i> entre Dicer/DHCV4 et Dicer/DHCV94.	45
Figure 14 Étude de coimmunoprécipitation <i>in vitro</i> entre Dicer et DHCV4.....	46
Figure 15 Étude de coimmunoprécipitation <i>in vitro</i> entre Dicer et DHCV94.....	46

Liste des abréviations

aa : Acide aminé
 ADAR : « Adenosine deaminase that Acts on RNA »
 ADN : Acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 Ago : Argonaute
 APS : Ammonium persulfate
 ARN : Acide ribonucléique
 ARNdb : ARN double-brin
 ARNm : ARN messenger
 °C : Degré Celsius
 DGCR8 : « DiGeorge syndrome critical region gene 8 »
 DMEM : « Dulbecco's Modified Eagle Medium »
 D.O : Densité optique
 dsRBD : « Double-stranded RNA binding domain » ou domaine liant l'ARN double-brin
 DUF : « Domain of Unknown Function »
 EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
 eIF 3 : « eukaryotic initiation factor 3 » ou facteur d'initiation de la traduction 3
 FMRP : « Fragile X mental retardation protein »
 iARN : Interférence à l'ARN
 IB : Immunobuvardage
 Ig : Immunoglobuline
 INF : Interféron
 IP : Immunoprécipitation
 IRES : « Internal Ribosome Entry Site » ou Site interne d'entrée du ribosome
 IRF-3 : « Interferon regulatory factor-3 » ou facteur de régulation de l'interféron 3
 kb : Kilobases
 kDa : Kilodalton
 LiAc : Acétate de lithium
 LMP7 : « Low Molecular Mass Protein 7 »
 miARN : microARN
 min : Minute
 miRNP : « miRNA ribonucleoprotein particles »
 NS : Non-structural
 nt : Nucléotide
 NT : Non-traduite
 NTPase : nucléoside triphosphatase
 PAZ : « Piwi/Argonaute/Zwille »
 pb : Paire de base
 PFV-1 : « Primate Foamy Virus type 1 »
 PEG : Polyéthylène glycol
 pré-miARN : microARN précurseur
 pri-miARN : microARN primaire
 RdRP : « RNA-dependent RNA polymerase » ou polymérase à ARN dépendante de l'ARN
 RE : Réticulum endoplasmique

RISC : « RNA-induced silencing complex » ou complexe induisant le silence par l'ARN
RNase III : Ribonucléase de type III
RPM : Révolution par minute
SB : « Sample buffer »
SDS : « Sodium dodecyl sulfate »
siARN : « Small interfering RNA » ou petit ARN interférent
shARN : « Short hairpin RNA » ou petit ARN en structure d'épingle à cheveux
TBK1 : « TANK Binding Kinase 1 »
Temed : « N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine »
TLR 3 : « Toll Like Receptor 3 »
TRBP : « Transactivating response RNA-binding protein »
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
YPAD : « Yeast extract/Peptone/Dextrose » contenant de l'adénine

Chapitre 1 Introduction

1.1 L'interférence à l'ARN (iARN)

1.1.1 Historique

Connu sous le nom de « post-transcriptional gene silencing » (PTGS) chez les plantes (Baulcombe, 1996; Hammond et al., 2001a; Ingelbrecht et al., 1994), « quelling » chez les champignons (Cogoni et al., 1994; Romano and Macino, 1992) et **interférence à l'ARN (iARN)** dans le règne animal (Fire et al., 1998), ce phénomène a été initialement découvert chez la pétunia. En 1990, le généticien Richard Jorgensen a observé ce processus, tout à fait par hasard, lors de l'injection de l'ARN codant pour le gène responsable de la coloration mauve chez la fleur afin d'augmenter la synthèse du pigment (l'anthocyanine). Cette intervention a plutôt eu l'effet inverse, générant des fleurs à pétales blanches. Le phénomène par lequel l'introduction d'un deuxième exemplaire d'un gène dans un génome mène à la répression de l'expression du gène endogène a été nommé co-suppression (Jorgensen et al., 1996; Napoli et al., 1990).

Ce n'est qu'en 1998 que les travaux d'Andrew Fire, Craig Mello et leurs collègues ont mis en évidence ce processus chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), où l'introduction d'ARN double-brin (ARNdb) pouvait réduire l'expression du gène correspondant de manière ciblée (Fire et al., 1998). Deux ans plus tard, des chercheurs du « Massachusetts Institute of Technology » (MIT) démontraient que de petits ARN interférents d'environ 19 à 21 nucléotides (nt), provenant du clivage de long ARNdb, sont les effecteurs de l'iARN (Zamore et al., 2000).

À ce jour, iARN constitue un mécanisme ancestral très conservé chez les eucaryotes et représente un mode de régulation de l'expression génique. C'est également un processus qui semble jouer un rôle important au niveau des transposons (parasites moléculaires qui accumulent des séquences répétées dans le génome) et des virus à ARN.

1.1.2 Mécanisme

De nombreuses percées au niveau de notre compréhension des mécanismes impliqués dans la voie de l'iARN ont été réalisées récemment. Les chercheurs continuent à utiliser différentes approches génétique, biologique, biochimique et moléculaire dans le but d'identifier les différentes composantes de ce processus cellulaire et de déterminer comment celles-ci s'intègrent les unes aux autres pour former une voie métabolique fonctionnelle. L'iARN se présente sous deux aspects, selon l'origine de l'ARN précurseur : une voie endogène où les ARN précurseurs sont transcrits du génome et une voie exogène où les précurseurs ribonucléotidiques sont d'origine synthétique, virale ou autre (voir figure 1).

La voie endogène est initiée au noyau par la transcription d'un ARN non-codant appelé microARN primaire (**pri-miARN**) par la polymérase à ARN II (Lee et al., 2004). Le pri-miARN forme des structures secondaires en tige-boucle qui sont clivées en précurseur de microARN (**pré-miARN**) d'environ 70 nt par la ribonucléase III (RNase III) nucléaire **Drosha** (Lee et al., 2003). Ce dernier est transloqué au cytoplasme par l'**Exportine 5** (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003), un transporteur nucléaire dépendant de la Ran-GTP, afin d'être clivé par la RNase III **Dicer** en un duplex de microARN (**miARN**) (ARNdb d'environ 21 à 23 pb ayant deux nucléotides non-appariés à chaque extrémité 3').

Le brin du duplex de miARN dont l'extrémité 5' présente l'énergie thermodynamique la plus faible sera pris en charge par le complexe effecteur de la voie de l'iARN. Ce brin catalytique servira alors de guide pour cibler l'ARN messager (ARNm) d'une manière spécifique; l'autre brin étant présumément dégradé par des nucléases (Bartel, 2004). Si le brin guide présente une complémentarité parfaite avec l'ARNm, principalement dans la région codante et/ou 5' non-traduite (NT) chez les plantes, le complexe effecteur clivera l'ARNm cible, menant à sa dégradation. Cette situation est la plus fréquente dans le règne végétal. Chez la drosophile, le complexe médiant le clivage de l'ARNm cible a été nommé « RNA-induced silencing complex » (RISC) (Hammond et al., 2000). D'autre part, si le brin catalytique présente une complémentarité imparfaite avec l'ARNm cible, mais suffisante pour en permettre la reconnaissance principalement dans la région 3'NT, il

médiera le blocage de la machinerie traductionnelle. Ce scénario est le plus fréquent dans le règne animal, où le complexe effecteur multiprotéique est alors appelé « miRNA ribonucleoprotein particles » (miRNP) (Hutvagner and Zamore, 2002).

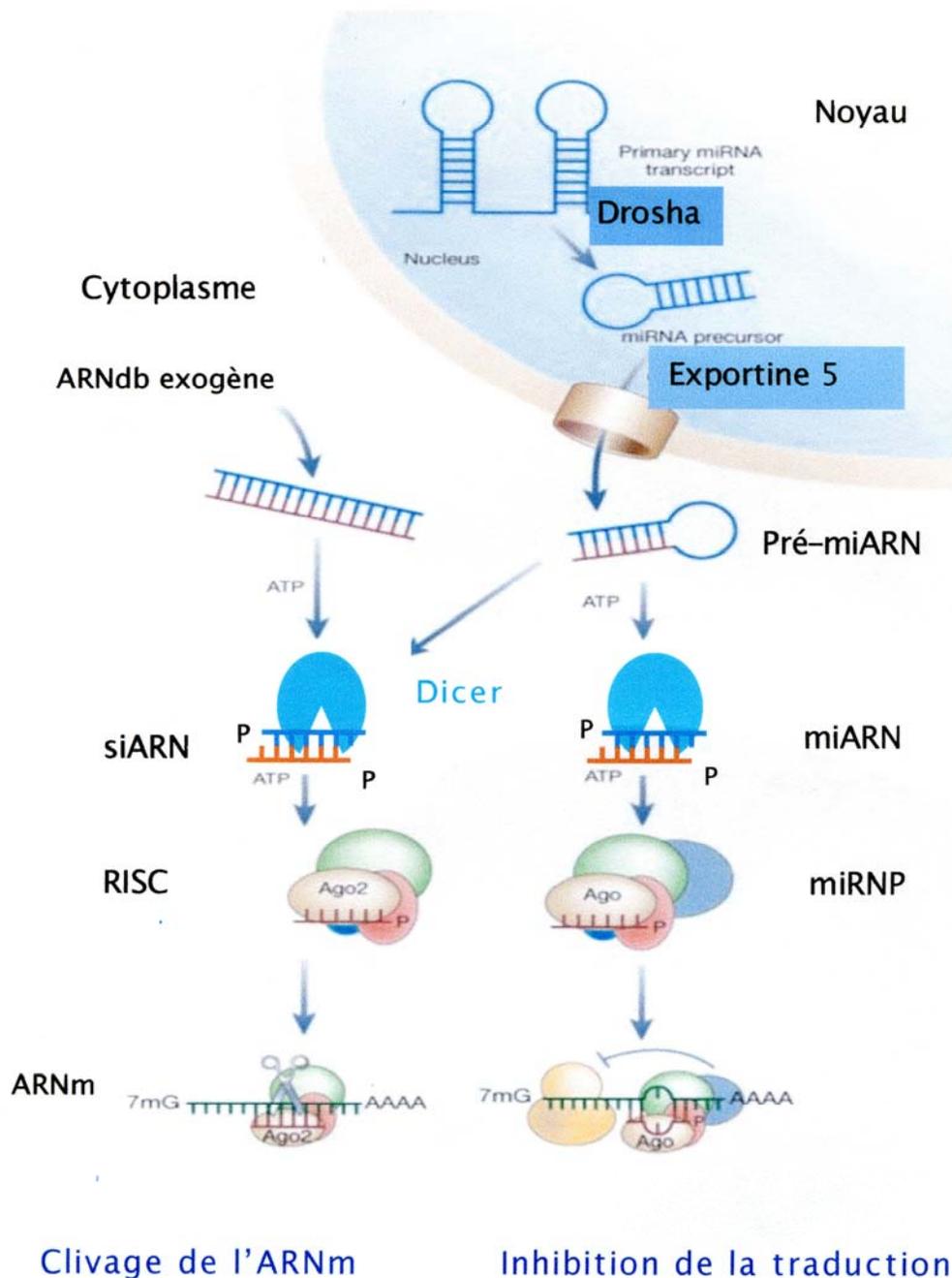


Figure 1 : Mécanisme général de la voie de l'iARN. Tirée et adaptée de Meister et Tuschl (2004).

La voie exogène est initiée par la présence d'ARNdb exogènes dans le cytoplasme. Cet ARNdb peut être clivé par la ribonucléase Dicer en « small interfering RNA » (siARN) ou petits ARN interférents, ou incorporé dans un complexe effecteur multiprotéique, une étape cytoplasmique commune aux miARN. Les siARN montrent une structure et un métabolisme analogues aux duplex de miARN; l'un des brins étant sélectionné (brin catalytique) et incorporé dans un complexe RNP. Ce complexe ainsi activé médiera, selon sa complémentarité avec l'ARNm cible, la dégradation du messager ou la répression de sa traduction (Hutvagner and Zamore, 2002).

La composition du miRNP et du RISC varie d'une espèce à l'autre. Chez l'humain, parmi les composantes déjà identifiées, on retrouve la protéine Argonaute (Ago), les hélicases dépendantes de l'ARN Gemin3 et Gemin4 (Meister and Tuschl, 2004), ainsi que la « Fragile X mental retardation protein » (FMRP) (Jin et al., 2004).

Ago est une protéine basique qui existe sous plusieurs formes (Ago1, Ago2, Ago3 et Ago4). Les protéines Ago possèdent un domaine Piwi apparemment impliqué dans l'interaction avec Dicer (Kolb et al., 2005; Tahbaz et al., 2004) et un domaine Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ) qui permet la liaison du brin d'ARN catalytique (Kolb et al., 2005). Ceci aurait pour effet de protéger cet ARN contre la dégradation et de l'orienter convenablement dans le complexe effecteur (Carmell et al., 2002). Des évidences structurales et biochimiques suggèrent que la protéine Ago2, une composante essentielle du complexe RISC, exerce une activité endonucléasique permettant de cliver et de dégrader l'ARNm cible (Meister et al., 2004; Rand et al., 2004).

FMRP est une protéine possédant deux domaines Lys-His (KH) et une boîte Arg-Gly-Gly (RGG) caractéristiques de certaines protéines pouvant lier l'ARN. FMRP est localisée principalement au niveau des neurones, où elle joue un rôle important dans le transport des ARNm cibles et le contrôle de leur traduction au niveau des sites post-synaptiques dans les dendrites (Khandjian, 1999). Des travaux chez la drosophile ont montré sa présence dans le complexe RISC, son rôle dans le bon fonctionnement de la voie de l'iARN ainsi que l'importance du domaine KH dans l'interaction entre les composantes du complexe (Ishizuka et al., 2002). Le retard mental résultant de l'absence de la protéine FMRP pourrait

être due, entre autres, au dérèglement de la machinerie de la voie de l'iARN (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002).

Outre son rôle dans la régulation post-transcriptionnelle, les composantes de la machinerie de l'iARN jouent également un rôle dans la régulation transcriptionnelle afin d'assurer l'intégrité du génome. Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), le processus est requis pour la formation de l'hétérochromatine centromérique ainsi que dans la ségrégation normale des chromosomes (Volpe et al., 2002). Ce mécanisme de régulation transcriptionnelle a aussi été démontré chez les plantes (Wassenegger et al., 1994) et la drosophile (Corbin and Maniatis, 1989; Pal-Bhadra et al., 2002).

Un processus d'amplification médié par une « RNA-dependent RNA polymerase » (RdRP), ou polymérase à ARN dépendante de l'ARN, a été identifié chez les plantes (*A. thaliana*), les champignons (*S. pombe*) et le nématode (*C. elegans*). Ce processus, qui permet une action systémique et plus durable de l'iARN, est absent chez les insectes et les mammifères (Cogoni and Macino, 2000; Hammond et al., 2001b; Sharp, 2001; Sharp and Zamore, 2000).

1.1.3 Les ribonucléases III

1.1.3.1 Droscha

Droscha appartient à la famille des RNases III de classe II. Elle possède deux domaines RIII, un domaine « double-stranded RNA binding domain » (dsRBD), un domaine RS riche en sérine/arginine et un long domaine N-terminal riche en proline possiblement impliqué dans les interactions protéine-protéine. Droscha est présente chez les insectes, le vers, la souris et l'humain, mais absente chez les plantes et les champignons (Lee et al., 2003).

Des travaux ont montré que Droscha agit sous forme de complexe avec la protéine « DiGeorge syndrome critical region gene 8 » (DGCR8) (Gregory et al., 2004; Han et al., 2004), qui présente deux domaines dsRBD. DGCR8 pourrait avoir un rôle crucial dans la maturation des pri-miARN.

1.1.3.2 Dicer

Dicer est une enzyme qui a été conservée au cours de l'évolution et qui est retrouvée, à ce jour, chez presque tous les organismes eucaryotes. C'est une RNase III de classe III qui présente des homologies avec les RNases III de classe I (*E.coli*) et de classe II (Drosha chez les mammifères) (Carmell and Hannon, 2004) (voir figure 2). Dicer est composée d'un domaine N-terminal montrant une analogie de séquence avec des hélicases à ARN, d'un « Domain of unknown function » (DUF283) ou domaine de fonction inconnue, d'un domaine PAZ pouvant lier l'ARNdb, de deux domaines RNase III (RIIIa et RIIIb) jouant un rôle important dans le mode de clivage de l'ARNdb et d'un domaine dsRBD pouvant lier l'ARNdb (Provost et al., 2002).

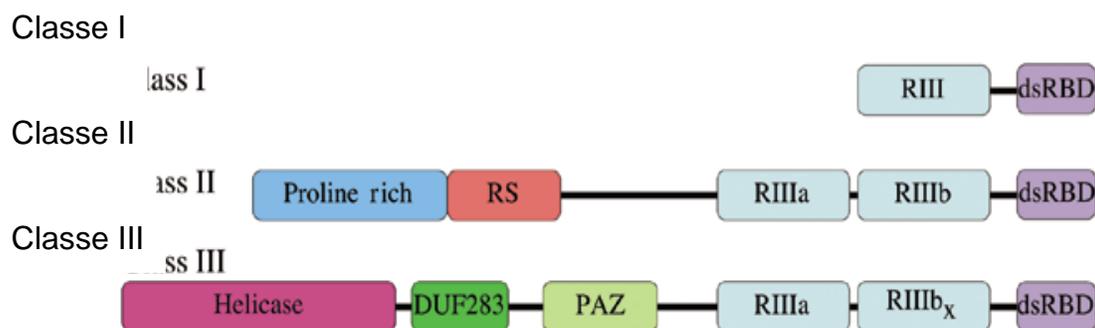


Figure 2 : Représentation schématique des domaines des ribonucléases de type III. La classe I est représentée par la RNase III d'*E. coli*, la classe II par Drosha chez les mammifères et la classe III par Dicer. RIIIb_x désigne un site catalytique RNase III (RIII) non-fonctionnelle. La dimension de ces domaines est approximative. Tirée de Carmell and Hannon (2004).

Dicer a la propriété de lier et de cliver les ARNdb, générant ainsi de petits ARNdb d'environ 21 à 23 pb qui montrent un groupement phosphate à l'extrémité 5', un groupement hydroxyl à l'extrémité 3' et 2 nt non-appariés à l'extrémité 3' (Bernstein et al., 2001; Provost et al., 2002; Zhang et al., 2002; Zhang et al., 2004). Elle joue un rôle-clé dans le mécanisme de l'iARN, aussi bien dans la voie endogène que dans la voie exogène, en exécutant le clivage des pré-miARN en miARN matures ou de l'ARNdb en siARN. Pour qu'elle soit fonctionnelle, Dicer doit former un dimère via ses domaines RIII qui produisent ainsi le site catalytique actif pour le clivage de l'ARNdb. Malgré que le mode exact par lequel Dicer clive l'ARNdb ne soit pas encore connu, trois modèles ont été proposés (Carmell and Hannon, 2004):

- Dicer pourrait opérer en formant un homodimère anti-parallèle, qui lui permettrait de produire des fragments d'environ 22 nt, soit le double en longueur des produits de la RNase III de *E. coli* qui montre, à l'opposé, un seul domaine RIII;
- Selon le modèle tête-queue, les deux molécules de Dicer auraient la même orientation sur l'ARNdb l'une par rapport à l'autre;
- Dicer pourrait agir en monomère, où les domaines RIIIa et RIIIbx créent un dimère intramoléculaire.

Dans les trois scénarios, le domaine PAZ central de Dicer pourrait jouer un rôle très important dans l'étape du clivage en reconnaissant spécifiquement les 2 nt non-appariés à l'extrémité 3' de l'ARNdb générés par Drosha. Le domaine PAZ positionnerait adéquatement les domaines RIIIa et RIIIbx aux sites de clivage, ce qui expliquerait la génération par Dicer de petits ARN d'une longueur déterminée; la structure tridimensionnelle et la disposition des différents domaines en étant les principaux déterminants (Carmell and Hannon, 2004).

Le clonage de la ribonucléase Dicer humaine (218 kDa) a rendu possible la caractérisation de son activité ribonucléasique et de ses propriétés à lier l'ARNdb. Le magnésium, qui n'est pas essentiel pour la liaison de l'ARNdb, est requis pour son activité ribonucléasique. Il a été démontré que le domaine dsRBD localisé dans la portion C-terminale de Dicer

pouvait lier l'ARNdb *in vitro*. Exprimée dans les cellules humaines, Dicer colocalise avec la calreticuline, une protéine résidant au réticulum endoplasmique (RE) (Provost et al., 2002).

1.1.3.3 Les protéines interagissant avec Dicer

Le rôle de Dicer ne se limite pas à l'étape d'initiation de la voie de l'iARN par le clivage des ARN précurseurs. Des travaux ont récemment démontré l'association de Dicer avec le complexe effecteur RISC/miRNP et l'implication de diverses interactions dans le fonctionnement de cette voie. En effet, des interactions directes entre Dicer et les protéines de la famille Argonaute (Ago) (Hammond et al., 2001a) semblent être requises pour le transfert des siARN/miARN aux complexes effecteurs (Hammond et al., 2001a; Sasaki et al., 2003; Sontheimer and Carthew, 2005). Cette liaison, médiée par le domaine Piwi des protéines Ago et les domaines RNases III de Dicer, inhibe l'activité ribonucléasique de cette dernière *in vitro* (Tahbaz et al., 2004).

Une interaction entre Dicer et la protéine FMRP, dont la signification reste à établir, a également été identifiée dans des cellules murines (Lugli et al., 2005). Chez la drosophile, la protéine R2D2, joue un rôle dans la voie de l'iARN en liant Dicer et les protéines Ago ensemble dans le RISC (Liu et al., 2003).

Par ailleurs, des études très récentes ont évoqué la possibilité que certaines protéines virales pouvaient interagir avec Dicer. Ainsi, la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1) inhibe Dicer par contact direct (Bennasser et al., 2005), ce qui soutient l'hypothèse que Dicer pourrait être ciblé par certaines protéines virales.

Plus récemment, l'association de la protéine TRBP «Transactivating response RNA-Binding Protein» au complexe Dicer-Ago2 a été rapportée. Cette association est nécessaire à la stabilité et l'activation du complexe effecteur (Chendrimada et al., 2005).

1.1.4 Les microARN

Les microARN (miARN) sont de petits transcrits d'ARN non-codants d'environ 21 à 23 nt qui régulent négativement et spécifiquement l'expression des gènes (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001).

Exprimés chez la plupart des organismes eucaryotes, les gènes de miARN sont transcrits par l'ARN polymérase de classe II en pri-miARN qui présente un cap à l'extrémité 5' et un segment polyadénylé à l'extrémité 3' (Lee et al., 2004). Les gènes de miARN sont organisés en tandem pouvant être regroupés en amas ayant le même promoteur polycistronique ou isolés (Ambros, 2004). Chez les mammifères, plusieurs centaines de gènes codants pour des miARN ont été recensés. Représentant environ 1% du génome humain, certains chercheurs prévoient que les miARN peuvent réguler l'expression de plus de 30% des gènes (Bartel, 2004; Lai, 2003)!

Des travaux de l'équipe de Victor Ambros ont permis l'identification des deux premiers miARN, le lin-4 et le lin-7, chez le nématode (Lee and Ambros, 2001; Lee et al., 1993). Ces derniers sont requis pour la transition temporelle des stades larvaires au cours du développement post-embryonnaire du ver en inhibant la traduction des ARNm lin-14, lin-28, lin-41 et lin-57 codant pour des gènes hétérochroniques (Banerjee and Slack, 2002; Lee and Ambros, 2001; Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000) (voir figure 3). Des études chez *C. elegans* ont également démontré que lin-4 pouvait se lier à plus de 7 sites dans la région 3'NT de l'ARNm cible lin-14 avec une complémentarité imparfaite, bloquant ainsi sa traduction (Lee et al., 1993; Moss et al., 1997) (voir figure 3b). Lin-4 inhibe la traduction d'un autre ARNm cible, soit lin-28, de façon analogue, suggérant une pluralité d'ARNm cible pour certains miARN.

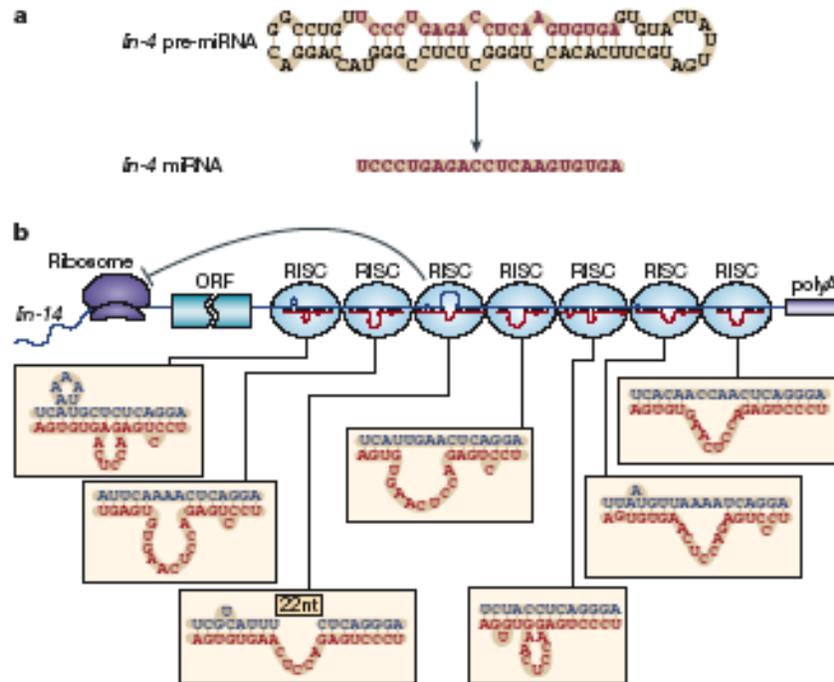


Figure 3 : Le miARN lin-4 et la reconnaissance de lin-14, son ARNm cible. (a) Séquence et structure du pré-miARN et du miARN mature lin-4. (b) Reconnaissance des sites de liaison présents dans la région 3'NT de l'ARNm lin-14 (bleu) par le miARN lin-4 (rouge) montrant une complémentarité imparfaite. La liaison de lin-4 à ces différents sites permet le blocage de la traduction de l'ARNm. Tirée de He and Hammond (2004).

Outre leur rôle dans la transition des stades larvaires chez le nématode, les miARN exercent des fonctions biologiques variées d'un organisme à l'autre, et peuvent être impliqués dans le développement, l'hématopoïèse, la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'organogénèse et la prolifération cellulaire (Bartel, 2004) (voir tableau 1).

Tableau 1 : Quelques exemples de miARN dont la fonction et la cible ont été caractérisées expérimentalement. Tiré de He and Hannon (2004).

MicroARN	Organismes	Gènes cibles	Fonctions biologiques contrôlées
miR-165 miR-166	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phabulosa Phavoluta	Morphogénèse des feuilles (Emery et al., 2003; Tang et al., 2003).
miR-Jaw	Id	Facteur de transcription TCP	Morphogénèse des feuilles et embryogénèse (Palatnik et al., 2003).
miR-172	Id	AP2	Développement floral (Zhou et al., 2004).
Lin-4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Lin-14, lin-28	Transition des stades du développement larvaire L1 et L2 (Lee et al., 1993; Moss et al., 1997)
Let-7	Id	Lin-41, lin-57	Transition des stades du développement larvaires L4 et le stade adulte (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000).
lsy-6	Id	Cog-1	Détermination d'asymétrie neurale droite et gauche (Johnston and Hobert, 2003).
Bantam	<i>Drosophila melanogaster</i>	hid	Prolifération cellulaire et suppression de l'apoptose (Brennecke et al., 2003).
miR-181	<i>Mus musculus</i>	?	Différentiation hématopoïétique (Tian et al., 2004).

Récemment, une étude a montré la présence d'un miARN codé par la cellule hôte qui est dirigé contre un rétrovirus humain, le « Primate Foamy Virus type1 » (PFV-1) (Lecellier et al., 2005). Ce miARN a pour fonction de contrecarrer la réplication du virus dans les cellules humaines, ce qui suggère que l'iARN peut être impliquée dans la défense antivirale chez les mammifères (Lecellier et al., 2005). À l'opposé, il existe également des miARN codés par le génome de certains virus, tel que le virus Epstein-Barr, qui pourraient être impliqués dans la régulation de la réplication virale et de l'expression de certaines protéines de la cellule hôte (Pfeffer et al., 2004).

1.1.5 Les petits ARN interférents (siARN)

Les siARN sont de petits ARN synthétiques d'environ 21 pb parfaitement appariés et destinés à cibler des ARNm spécifiques. Les siARN peuvent également être produits par le clivage de précurseurs d'ARNdb par Dicer *in vitro* ou *in vivo* (virus, transposons). Sur le plan fondamental, les siARN et les miARN présentent des caractéristiques moléculaires similaires, mais diffèrent par leur origine, l'appariement de leurs brins et leur mode d'action sur leur ARNm cible. Ainsi, les siARN visent habituellement un site unique et montrent une complémentarité parfaite avec l'ARNm cible, menant à sa dégradation (He and Hannon, 2004).

Les siARN représentent un outil moléculaire très puissant et de plus en plus utilisé en recherche fondamentale et thérapeutique. Ainsi, il est possible d'investiguer la fonction d'un gène chez les eucaryotes en bloquant spécifiquement et transitoirement l'expression du gène en question, et en observant les conséquences sur le fonctionnement cellulaire. Par ailleurs, l'exploitation de la voie de l'iARN à des fins thérapeutiques s'avère très prometteuse. Des siARN sont en cours de développement chez de nombreuses compagnies de biotechnologie pour cibler de manière spécifique l'expression de gènes pouvant causer des maladies, telles que le cancer, les maladies neurodégénératives et les maladies infectieuses virales (Wall and Shi, 2003). Lorsqu'ils sont introduits dans la cellule de mammifère, les siARN n'activent pas l'immunité non-spécifique, du fait de leur petite taille (Elbashir et al., 2001). L'introduction d'ARNdb d'origine virale ou synthétique, ayant plus de 30 nt de long, active la voie de l'interféron, qui provoque une inhibition généralisée de la traduction menant à l'apoptose (Gil and Esteban, 2000), de même que de la RNase L, qui dégrade de manière non-spécifique les ARNm cellulaires et viraux (Diaz-Guerra et al., 1997; Samuel, 1991).

Très récemment, des études ont montré que le VIH-1 code pour des précurseurs de siARN de même que pour un suppresseur de la voie iARN (Bennasser et al., 2005). Ces observations suggèrent que ce virus, qui pourrait être une cible de la voie de l'iARN, a élaboré un moyen pour échapper à ce mécanisme de défense anti-viral.

1.2 Résistance des virus à l'iARN

L'iARN est le principal mécanisme de défense anti-viral chez les plantes. Cependant, des études récentes ont mis à jour certaines stratégies virales suppressives de la voie iARN. Parmi les stratégies utilisées par certains virus pour échapper à la voie de l'iARN, notons :

- L'expression de protéines virales suppressives qui interagissent et inactivent certaines composantes de la machinerie de la voie de l'iARN (Bennasser et al., 2005; Chapman et al., 2004);
- la production d'ARN viral résistant à l'action des ribonucléases et formant de fortes structures secondaires et tertiaires (Chang et al., 2003; Lu and Cullen, 2004);
- la séquestration de leurs ARN par des protéines virales (Zamore, 2004);
- un mécanisme d'édition de l'ARN viral où l'enzyme « adenosine deaminase that acts on RNA » (ADAR) converti l'adénosine en inosine, modifiant ainsi la structure de l'ARN et sa susceptibilité à la voie iARN (Knight and Bass, 2002; Polson et al., 1991).

Chez les plantes, la première forme de résistance à être identifiée est médiée par la production de protéines virales suppressives, telles que la p21, codée par le « beet western yellow virus », et la p19, codée par le « tomato bushy stunt virus ». Ces deux protéines virales lient les miARN et préviennent leur incorporation dans le RISC, ce qui en font des supprimeurs puissants de l'iARN (Chapman et al., 2004; Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). Une autre forme de résistance est représentée par la protéine virale P1/HC-Pro, codée par le « Turnip mosaic virus », qui pourrait interagir avec R2D2 et prévenir la formation d'un complexe RISC actif (Chapman et al., 2004).

Chez la drosophile, les protéines E3L du virus de vaccinia et NS1 du virus de l'influenza A, B et C, qui sont des protéines pouvant lier l'ARNdb et impliquées dans l'inhibition de la réponse anti-virale médiée par l'interféron, interfèrent avec la voie de l'iARN en liant le pré-miARN (Liu et al., 2004).

Chez l'humain, des stratégies de résistance virale ont récemment été découvertes. Dans le cas de l'adénovirus, celui-ci produit l'ARN non-codant VA1 d'environ 160 nt formant des structures secondaires. Ce dernier est capable de compétitionner avec les pré-miARN pour une quantité limitée du transporteur nucléaire Exportine 5 en plus d'inactiver Dicer par une interaction directe (Lu and Cullen, 2004). En ce qui a trait au virus Epstein-Barr, il produit des transcrits de pri-miARN et exploite la machinerie de l'iARN pour la biosynthèse de miARN qui pourraient être requis pour la réplication du virus (Pfeffer et al., 2004).

Enfin, l'exemple le plus récent est celui du VIH-1. Le génome de ce virus code pour des précurseurs de siARN dirigés contre ses propres ARNm afin de réguler sa réplication. D'autre part, le VIH-1 est capable d'échapper à l'action de l'iARN en exprimant la protéine Tat qui inhibe directement l'activité catalytique de Dicer (Bennasser et al., 2005; Contreras et al., 2005). Ces observations illustrent la complexité et la dynamique des interactions hôte-virus, dans lesquelles la voie de l'iARN semble jouer un rôle important.

1.3 Le virus de l'hépatite C (VHC)

1.3.1 Classification et épidémiologie

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié en 1989 par Choo et al. par des méthodes de biologie moléculaire. Connu comme étant le principal agent étiologique des hépatites « non A, non B », ce virus a été classé au sein de la famille des flaviviridae et est le seul représentant du genre hépacivirus (Choo et al., 1990; Kuo et al., 1989).

Le VHC constitue un problème de santé publique majeur à travers le monde, en particulier dans les pays en développement, affectant au moins 170 millions de personnes, soit 3% de la population mondiale, et entraînant une morbidité et une mortalité considérable (Global surveillance and control of hepatitis C, 1999). Le virus se transmet principalement par voie parentérale (transfusion sanguine, aiguilles souillée) (Zou et al., 2003) et, à une fréquence plus faible, par voies sexuelle et périnatale (Batallan et al., 2003; Wejstal, 1999). À cause du taux d'erreurs relativement élevé commis par la polymérase à ARN du VHC, le génome viral présente une variabilité génomique importante, d'où l'apparition de 6 génotypes et de nombreux sous-types (Robertson et al., 1998).

L'hépatite C peut évoluer vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, nécessitant inexorablement une transplantation du foie (Alter and Seeff, 2000). En dépit des avancées thérapeutiques, le seul remède pour traiter les patients infectés par l'hépatite C est une combinaison de ribavirine et d'interféron alpha ($IFN\alpha$), dont l'efficacité varie selon le génotype et qui représente une thérapie très coûteuse. Aucun vaccin n'est présentement disponible (Moradpour and Blum, 1999). Il y a donc un criant besoin d'explorer d'autres alternatives et moyens pour combattre ce virus.

1.3.2 Organisation génomique

Le VHC est un virus enveloppé à capsidie icosaédrique hébergeant un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive d'environ 9,6 kb. Son génome comprend trois régions distinctes de l'extrémité 5' à l'extrémité 3', soit la région 5'NT, la région codante et la région 3'NT.

La région 5'NT comporte 341 nt et des domaines hautement conservés riches en structures secondaires complexes formant le « internal ribosome entry site » (IRES) ou site interne

d'entrée du ribosome (Friebe et al., 2001). Ce dernier fait d'ailleurs l'objet de la section 1.3.3.

La région codante varie entre 9024 et 9111 nt de long, et présente un cadre de lecture ouvert codant pour une polyprotéine d'environ 3033 acides aminés (aa). Lors de sa maturation post-transcriptionnelle, la polyprotéine est scindée par des protéases cellulaires et virales pour donner naissance aux protéines structurales (C-E1-E2-p7) et non-structurales (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) du virus (Bartenschlager and Lohmann, 2000) (voir figure 4). La protéine C sert essentiellement à la formation de la capsidie par polymérisation et est capable d'interagir avec de nombreux constituants cellulaires. E1-E2 sont les glycoprotéines de l'enveloppe virale. Elles forment un complexe hétérodimériques par des interactions non-covalentes et qui sont principalement impliquées dans la reconnaissance cellulaire. p7 est un polypeptide de 7 kDa présentant plusieurs résidus hydrophobes et ayant une fonction encore inconnue. NS2 est une métalloprotéase qui forme, avec l'extrémité N-terminale de NS3, une protéase auto-catalytique dépendante du zinc qui permet la coupure de la jonction NS2-NS3. NS4A sert comme cofacteur de NS3 pour le clivage de la jonction NS3-NS4A (Reed and Rice, 2000). NS4B présente un rôle plausible dans la réplication virale (Elazar et al., 2004). NS5A ainsi que la glycoprotéine E2 présentent un rôle dans la résistance virale à l'interféron (Gale et al., 1997; Tan and Katze, 2001; Taylor et al., 1999). NS3 et NS5B sont présentées plus en détail dans les sections 1.3.4 et 1.3.5, respectivement.

La région 3'NT de 229 nt comprend une région poly-uridyle impliquée dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif au cours de la réplication virale (Friebe and Bartenschlager, 2002).

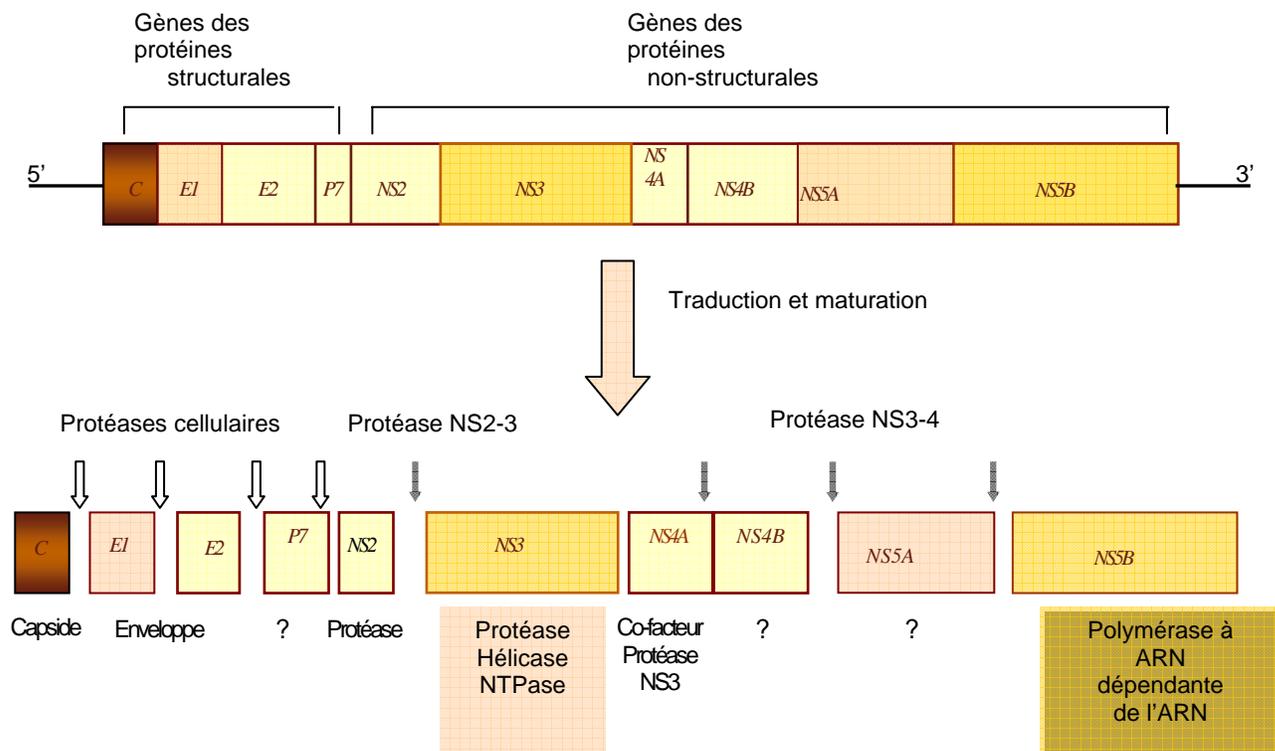


Figure 4: Organisation génomique du VHC. Le génome viral est traduit en une seule polyprotéine qui subit un processus de maturation médié par des protéases cellulaires générant les protéines structurales (C, E1, E2 p7) et par des protéases virales générant les protéines non-structurales (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B). Tirée et adaptée de Tan et al. (2002).

1.3.3 Le « Internal Ribosome Entry Site » (IRES)

La région 5'NT présente des domaines en structures tige/boucle, soit les domaines I, II, III et IV. Les domaines II, III et IV forment l'IRES (Kato et al., 1990; Tsukiyama-Kohara et al., 1992). En fixant la sous-unité 40 S du ribosome et le « eukaryotic initiation factor 3 » (eIF3), l'IRES entraîne l'initiation de la traduction de l'ARN viral indépendamment de la coiffe méthylée. Ces domaines possèdent plusieurs codons AUG en amont du site d'initiation de la traduction; celui-ci étant localisé au niveau du quatrième domaine. Les domaines V et VI font partie de la région codante du génome viral et jouent un rôle

essentiel dans l'activité de l'IRES dans l'initiation de la traduction (Honda et al., 1996; Smith and Simmonds, 1997; Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993) (voir figure 5).

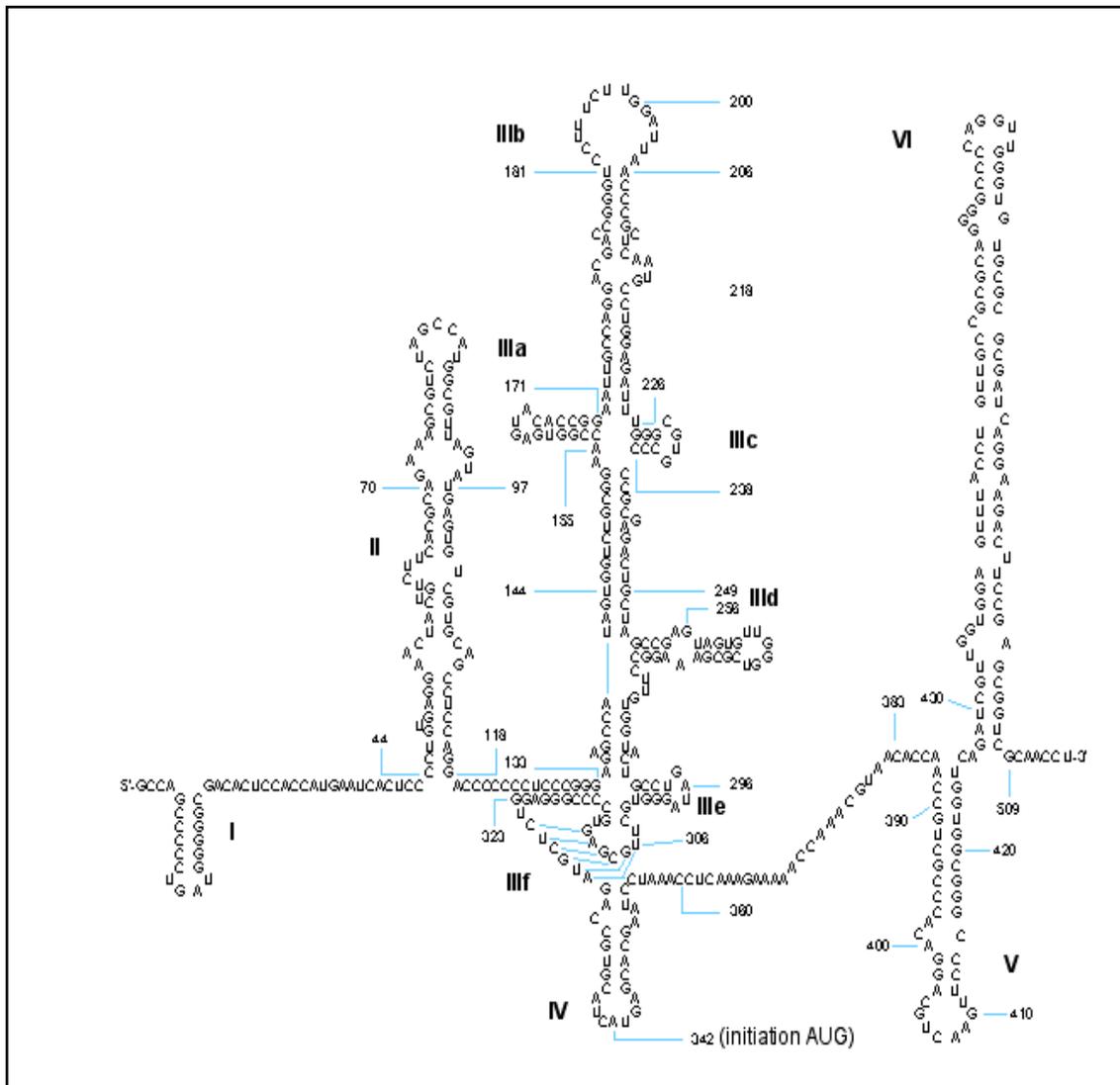


Figure 5 : Structure de la région 5'NT du VHC. Le domaine IV présente le site d'initiation de la traduction cap-indépendante. Les domaines V et VI, qui font partie intégrante de la région codante du génome, sont requis pour la fonction de l'IRES. Tirée et adaptée de Tan et al. (2002).

1.3.4 La protéine non-structurale 3 (NS3)

NS3 est une protéine multifonctionnelle de 70 kDa pouvant exercer trois activités enzymatiques différentes : une fonction sérine protéase dans son tiers N-terminal permettant le clivage de la jonction NS2-NS3 et des protéines non-structurales situées en amont, et deux activités combinées nucléoside triphosphatase (NTPase)/hélicase localisées dans ses deux-tiers C-terminal et jouant un rôle dans la réplication virale. La localisation de NS3 est essentiellement cytoplasmique (Gwack et al., 1996; Kim et al., 1995; Tomei et al., 1993).

Les protéines structurales et non-structurales du VHC interagissent entre elles et avec certaines composantes de l'hôte afin d'assurer la réplication virale et la résistance du virus à l'immunité cellulaire. Dans le cas de NS3, une étude a démontré que celle-ci interagit avec NS4A et NS5B pour former un complexe requis pour la réplication du virus (Ishido et al., 1998). Des travaux récents suggèrent que NS3 soit impliquée dans la résistance anti-virale via une interaction directe avec certaines protéines de l'hôte. Une étude suggère que le domaine protéasique de NS3 peut interférer avec la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I en interagissant avec la « Low Molecular Mass Protein 7 » (LMP7). LMP7 est une composante du protéasome impliqué dans la dégradation du peptide antigénique qui peut être d'origine virale, ce qui rend le virus invisible à la surveillance du système immunitaire (Khu et al., 2004).

Par ailleurs, d'autres études ont rapporté que NS3 pouvait lier directement la protéine kinase « TANK Binding Kinase-1 » (TBK1) et inhiber l'association et l'activation du facteur de transcription « Interferon Regulatory Factor-3 » (IRF-3). Ce dernier est un régulateur-clé de la production de l'interféron de type I via la voie de signalisation médiée par le « Toll-Like Receptor-3 » (TLR-3) (Foy et al., 2003; Otsuka et al., 2005). Le TLR-3 est un récepteur impliqué dans l'immunité innée en fixant l'ARNdb viral. Cette liaison active le facteur IRF-3 et, ultérieurement, toute la cascade de signalisation induisant la production de l'interféron, incluant l'interféron- β , qui est le principal agent anti-viral de l'immunité innée (Akira and Hemmi, 2003).

1.3.5 La protéine non-structurale 5B (NS5B)

NS5B est une protéine phosphorylée de 68 kDa qui exerce principalement une activité polymérase à ARN dépendante de l'ARN (RdRP) permettant la réplication du génome viral. Montrant une localisation cytoplasmique, NS5B est ancrée au niveau du RE grâce à son domaine C-terminal hydrophobe formé de 21 aa (Lohmann et al., 1997).

L'activité RdRP pourrait être régulée par oligomérisation et hétéromérisation avec d'autres protéines virales. Comme dans le cas de NS3, il existe aussi des interactions potentielles entre NS5B et différentes protéines cellulaires de l'hôte. Par exemple, il a été démontré que NS5B pouvait interagir avec l' α -actinine (Lan et al., 2003), une composante du cytosquelette, et avec la p68 (Goh et al., 2004), une hélicase à ARN qui pourrait être impliquée dans la réplication virale. Ces résultats nous laisse croire que NS5B pourrait interférer avec la fonction normale des cellules.

1.3.6 Modèles d'études du VHC

L'absence d'un système de réplication virale efficace représente l'obstacle majeur à l'étude de la fonction biologique du VHC et à la conception éventuelle de nouvelles molécules thérapeutiques. Le seul modèle animal pouvant être utilisé est le chimpanzé. Pour pallier à ce problème, plusieurs systèmes d'expression des protéines non-structurales virales ont été mis au point dans des cellules de mammifère en culture.

Dans cette présente étude, nous avons eu recours à un système basé sur le réplicon, un ARN subgénomique codant pour les protéines non-structurales (NS2-NS5B) du virus, transfecté dans des cellules Huh-7 (hépatocytes dérivées d'une tumeur hépatique humaine) maintenues en culture. L'utilisation de la néomycine dans le milieu de culture permet de sélectionner les cellules hébergeant le réplicon, qui porte un gène de résistance à la néomycine. Ce système offre un double avantage : (1) les protéines non-structurales virales sont produites en quantité suffisante, et (2) les protéines du VHC peuvent être manipulées et étudiées de façon sécuritaire en l'absence de particules infectieuses (Bartenschlager, 2002; Lohmann et al., 1999; Pietschmann et al., 2002; Rosenberg, 2001).

Récemment, des travaux ont permis le développement d'un nouveau système de culture très performant permettant la production de particules virales infectieuses. Ce système consiste en un réplicon codant pour le génome viral entier et qui présente des mutations adaptatives (JFH-1 génotype 2a) afin d'augmenter l'efficacité de la réplication du VHC (Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Ce réplicon a été transfecté dans une lignée cellulaire dérivée des Huh7 et plus performante pour la production de particules virales.

1.4 L'iARN et le VHC

Le traitement actuel de l'hépatite C offre une faible efficacité entraînant plusieurs effets secondaires. La recherche thérapeutique se poursuit afin de développer de nouvelles stratégies plus performantes pour contrer la réplication du VHC chez l'humain. En ce sens, la voie de l'iARN représente une approche thérapeutique intéressante. Ainsi, des siARN synthétiques ont été utilisés avec succès afin d'inhiber spécifiquement l'expression de gènes viraux dans des cellules hépatiques (Huh-7) possédant un réplicon viral. Le recours à des vecteurs d'expression de « short hairpin RNA » (shARN), ou petits ARN en structure d'épingle à cheveux, dirigés spécifiquement contre NS3 et NS5B s'est avéré plus efficace que les siARN pour supprimer la réplication virale et à long terme (Prabhu et al., 2005; Randall et al., 2003; Takigawa et al., 2004). Par ailleurs, d'autres travaux *in vivo* ont permis le blocage de la synthèse de NS5B en utilisant des siARN et des shARN dirigés contre celle-ci dans un modèle murin d'hépatite mimant l'infection chez l'Homme (McCaffrey et al., 2002).

1.5 Hypothèses et objectifs

Deux évidences suggèrent que le VHC pourrait être ciblé par la voie de l'iARN : (1) le VHC produit des intermédiaires d'ARNdb lors de sa réplication; et (2) le génome viral montre des structures d'ARN en tige/boucle dans la région 5'NT susceptibles à l'action de Dicer *in vitro* (Isabelle Plante, résultats non-publiés). La voie de l'iARN pourrait donc constituer un mécanisme de défense anti-viral contre le VHC. Cependant, les niveaux endogènes de petits ARN provenant du clivage du génome du VHC par Dicer sont sous les limites de détection, suggérant que le VHC puisse échapper et/ou contrecarrer la voie de l'iARN *in vivo*.

Étant donné que le cycle répliatif du VHC se déroule au niveau du cytoplasme et que la plupart de ses protéines non-structurales se retrouve, comme Dicer, au niveau du RE, nous avons émis l'hypothèse qu'une ou plusieurs de ces protéines virales puissent interagir et interférer avec la fonction de la ribonucléase Dicer. Le principal objectif de ce travail était donc de détecter et de documenter l'interaction possible entre la ribonucléase Dicer et les protéines non-structurales du VHC.

Chapitre 2 Matériels et méthodes

2.1 Le système du double-hybride chez la levure

2.1.1 Principe

Le système du double-hybride chez la levure permet d'identifier une interaction protéine-protéine (X-Y) *in vivo* par reconstitution d'un activateur de la transcription chimérique (GAL4) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (voir figure 6). Le GAL4 est formé d'un domaine de liaison à l'ADN (DLA) et un domaine d'activation (DA) qui, lorsque séparés, ne sont pas capables d'interagir et d'activer la transcription (Chien et al., 1991; Fields and Song, 1989).

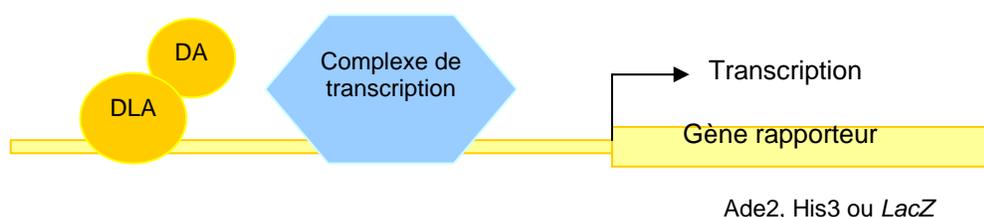


Figure 6 : Principe de l'activation des gènes rapporteurs chez la levure PJ69-4A. La reconstitution fonctionnelle du facteur de transcription GAL4 mène à la transactivation de gènes rapporteurs placés en aval du promoteur.

Expérimentalement, les levures sont transformées simultanément par deux plasmides : l'un code pour la protéine recombinante X fusionnée au DLA de GAL4 (DLA-X) et portant le gène de sélection à la tryptophane TRP1, tandis que l'autre code pour la protéine Y fusionnée au DA (DA-Y) et portant le gène de sélection à la leucine LEU2. Les protéines de fusion exprimées possèdent un signal de localisation nucléaire permettant leur translocation au noyau, où se trouvent les gènes rapporteurs. La première étape consiste à sélectionner les levures transformées simultanément par les deux plasmides en les étalant sur un milieu tryptophane- (Trp-)/leucine- (Leu-) (voir figure 7). La deuxième étape

consiste à déceler une éventuelle interaction entre les deux protéines d'intérêt. L'interaction des protéines X et Y permettra la reconstitution du transactivateur GAL4 et la transcription subséquente des gènes rapporteurs *Ade2*, *His3* et *lacZ*, permettant respectivement la synthèse d'adénine, d'histidine et de la β -galactosidase. L'importance de l'interaction entre les deux protéines peut être estimée par la croissance des colonies sur des milieux déficients en adénine ou en histidine, ou par l'intensité de la coloration bleue sur les milieux contenant le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal).

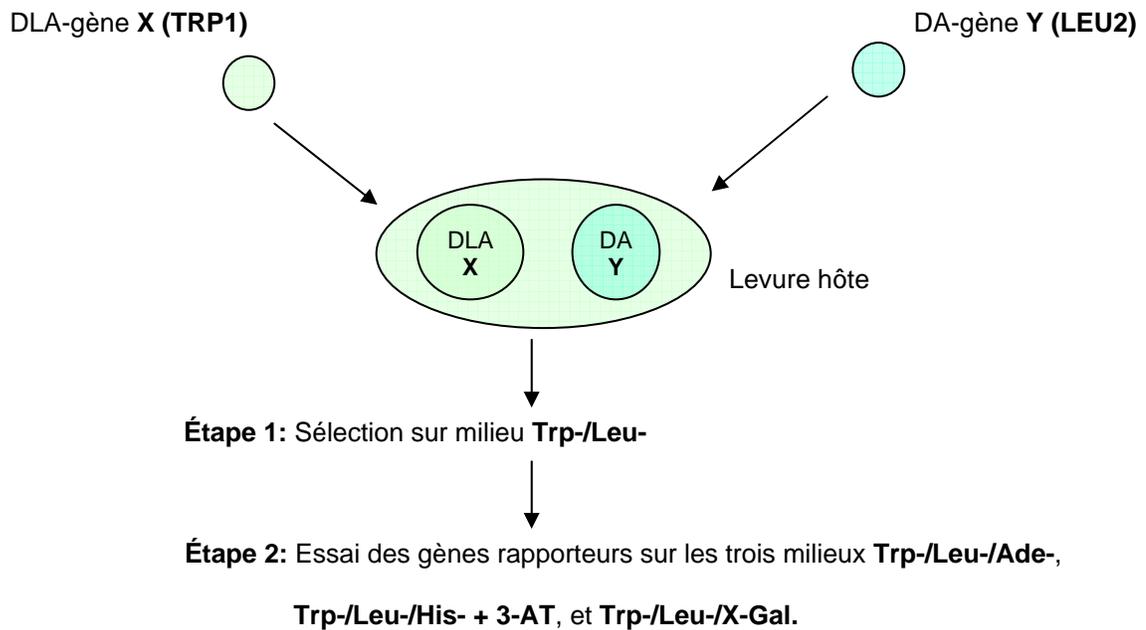


Figure 7 : Principe de l'approche du double-hybride chez la levure.

2.1.2 Construction des vecteurs

Le vecteur GAL4-BD pGBT9 (CLONTECH) portant le gène de sélection TRP1 et les vecteurs GAL4-AD pACT2 (CLONTECH) et pGADT7 (CLONTECH) portant le gène de sélection LEU2 ont été utilisés pour les études de double-hybride (voir annexe C). Une banque de fragments d'ADNc du génome du VHC contenu dans le vecteur pHCV77c (voir annexes E et F) a été générée aléatoirement par l'équipe du Dr Denis Leclerc, puis clonée dans le vecteur pGADT7. Les autres constructions utilisées dans les expériences de double-hybride ont été réalisées par le Dr Patrick Provost. Les vecteurs d'expression de Dicer (no. accession AJ132261) et de ses différents domaines (N-terminal (1-602), central (597-1243), C-terminal (1237-1912) et le domaine dsRBD (1772-1912)), ont été générés par PCR et le clonage des inserts a été effectué dans le cadre de lecture approprié du vecteur pGBT9. Les constructions ont été vérifiées par analyse de restriction. Deux clones de chaque vecteur ont été utilisés en parallèle dans les expériences décrites dans ce mémoire.

2.1.3 Culture des levures et protocole du double-hybride

Nous avons utilisé la lignée de levure PJ69-4A (génotype : MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal180Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2:: GAL7-lacZ) dans laquelle le gène GAL4 est inactivé (James et al., 1996). Les levures, conservées à -80°C, sont décongelées,ensemencées sur un milieu solide « Yeast extract/Peptone/Dextrose » contenant de l'adénine (YPAD) et incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours.

La transformation des levures avec les plasmides d'intérêt était effectuée selon le protocole PEG/LiAc (Gietz et al., 1995). Brièvement, deux à trois colonies étaient inoculées dans 50 ml de milieu YPAD liquide, incubées à 30°C sous agitation et ultérieurement diluées afin d'obtenir une densité optique à 600 nm ($D.O_{600}$) en phase exponentielle d'environ 2.56. Les levures étaient ensuite lavées à l'eau stérile et récupérées par centrifugation. Le culot de cellules était d'abord resuspendu dans 1 ml de LiAc 100 mM, puis 50 µl de la suspension étaient distribués dans chaque tube. Après centrifugation de la suspension, 349 µl de la solution de transformation (240 µl PEG 50%, 36 µl LiAc 1.0 M, 25 µl d'ADN de sperme de saumon 2.0 mg/ml préalablement bouilli pendant 5 min et 48 µl d'eau stérile) et

1 µl de chaque vecteur (0,1 µg/µl) était ajouté au culot. Après la resuspension des cellules et une incubation à 30°C pendant 30 min, les levures étaient soumises à un choc thermique par incubation à 42°C pour 30 min. Après centrifugation à 2500 RPM pendant 1 min, le culot était resuspendu très délicatement dans 1 ml d'eau stérile.

Les levures ainsi transformées étaient étalées sur un milieu Trp-/Leu- « Synthetic Dropout (SD) » (milieu contenant tous les acides aminés (aa) essentiels pour la croissance des levures en absence de l'aa utilisé pour la sélection) et incubées à 30°C pendant environ 6 jours. Pour l'essai des gènes rapporteurs, les levures étaient repiquées, étalées sur les milieux (SD)/Leu-/Trp-/Ade-, (SD)/Leu-/Trp-/His- + 4 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) (Sigma) et (SD)/Leu-/Trp- + 0.04 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-Gal) (Sigma) et incubées à 30°C (voir annexe A). La première lecture des résultats a été faite après 3 jours et la deuxième après 6 jours en se référant toujours aux témoins positifs et négatifs.

2.2 Expériences de coimmunoprécipitation *in vivo*

La lignée cellulaire Huh-7, portant un réplicon codant pour les protéines non-structurales de VHC (clone 9-13 gracieusement offert par le Dr Ralf Bartenschlager), a été utilisée en parallèle avec des cellules Huh-7 natives. Les cellules étaient maintenues dans du milieu « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM, Gibco) complété avec 10% de sérum de bœuf fœtal (Hyclone), un mélange de pénicilline, streptavidine et glutamine (PSG) 1X et d'un mélange d'acides aminés non-essentiels 1X. Les cellules contenant le réplicon étaient sélectionnées par l'ajout de 1 µg/ml de G418 (Sigma) au milieu. Les cellules étaient cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂, et diluées 1/3 à tout les 3-4 jours.

Lors des expériences de coimmunoprécipitation *in vivo*, 10⁷ cellules étaient lavées 2 fois avec du « Phosphate Buffered Saline » (PBS) froid et décollées délicatement du pétri à l'aide d'un gratoire. La suspension cellulaire était ensuite centrifugée à 2500 RPM pendant 1 min, le surnageant enlevé et le culot de cellules mis sur glace. Par la suite, les cellules étaient resuspendues dans 1 ml de tampon de lyse froid (50 mM Tris•HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1X d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases complet (Roche), 1 mM de PMSF, 1%

Triton X-100) et incubées sur glace pendant 15 min. Le lysat cellulaire était ensuite centrifugé à 13000 RPM pendant 3 min, et la concentration de protéines du surnageant était mesurée selon la méthode colorimétrique de Bradford en employant le réactif « Protein Assay Dye Reagent » de Bio-Rad. Un milligramme de protéine était utilisé pour chaque immunoprécipitation (IP). Vingt μ l du premier anticorps (IgG de lapin) dirigé contre la forme humaine de Dicer étaient ajoutés et incubés pendant deux heures à 4°C sous rotation continue. Ensuite, 20 μ l de billes protéine G-agarose (Roche), prélavées 4 fois avec du PBS, étaient ajoutés. Après une heure d'incubation, les billes étaient lavées 3 fois avec 1 ml de PBS froid, en récupérant à chaque fois les billes par centrifugation à 2500 RPM pendant 1 min. Au terme de ces lavages, les billes étaient resuspendues dans 50 μ l de tampon « sample buffer » (SB) 1X, bouillies et mises sur glace durant 5 min. Les billes étaient ensuite centrifugées à 2500 RPM pendant 1 min et le surnageant était prélevé et analysé.

Les protéines étaient séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en présence de « Sodium dodecyl sulfate » (SDS) et analysées par immunobuvardage (voir annexe B). Les protéines étaient transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Amersham) à 400 mA constant pendant 12-16 h. La membrane était bloquée dans une solution de « Tris Buffered Saline » (TBS) contenant 5% de lait en poudre pendant 1 h sous agitation. La membrane était ensuite lavée 3 fois avec du TBS-Tween 0.1% et incubée pendant 1 h avec le premier anticorps sous agitation à la température de la pièce. Les anticorps primaires utilisés à cette fin étaient : anticorps monoclonal 1B6 (IgG murin) dirigé contre NS3 (Wolk et al., 2000), l'anticorps monoclonal 5B-12B7 (IgG murin) dirigé contre NS5B (Moradpour et al., 2002) et l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre Dicer (Provost et al., 2002). Les anticorps étaient dilués à 1:1000 dans du TBS-T contenant 1% lait en poudre. Finalement, les bandes étaient visualisées par chemiluminescence (ECL) et la membrane exposée à un film XAR (Kodak).

2.3 Expériences de coimmunoprécipitation *in vitro*

2.3.1 Construction des vecteurs

Le vecteur d'expression chez les mammifères pcDNA3.1(+) (Invitrogen) possédant le promoteur T7 a été modifié afin de pouvoir y insérer les ADNc d'intérêt et exprimer des protéines portant l'épitope Flag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (voir annexe D). Les amorces utilisées pour la production du vecteur pcDNA3.1-5'Flag sont : l'amorce sens 5'-TCGAGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTGAGGGCC-3' et l'amorce anti-sens 5'-GGCCCTCACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCTCGA-3'. Ces amorces ont été appariées et insérées dans les sites de restriction XhoI/ApaI. Pour le vecteur pcDNA3.1-3'Flag, l'amorce sens est 5'-CTAGCCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGAAGCTT-3' et l'amorce anti-sens 5'-AGCTTCTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATGGTGGGCTAG-3' ont été appariés et insérés dans les sites de restriction NheI/HindIII (voir Annexe C).

Ces deux vecteurs ont accueilli l'ADNc codant pour les protéines NS3 et NS5B, de même que celui codant pour des fragments dérivant de ces protéines, soit DHCV36 (NS3, nt 3991-4522), DHCV87 (NS3, nt 3749-4432), DHCV4 (NS5B, nt 8557-8823) et DHCV94 (NS5B, nt 8617-8857) (voir tableau 2). Les séquences indiquées étaient amplifiées par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) extraites sur gel d'agarose à l'aide du « Gel Extraction Kit » (Qiagen) puis insérées dans le vecteur d'expression.

2.3.2 Transcription/traduction *in vitro*

Le système d'extrait de réticulocytes de lapin « TNT Coupled Transcription/Translation » (Promega) a été utilisé pour générer *in vitro* la protéine Dicer, les protéines virales NS3, NS5B de même que les fragments de protéines DHCV87, DHCV36, DHCV4, DHCV94 fusionnées à l'épitope Flag. Brièvement, le mélange réactionnel comportait 25 µl d'extrait de réticulocytes, 1 µl de tampon de réaction, 2 µg d'ADN, 40 U/µl d'inhibiteur de ribonucléases, 2 µl de l'ARN polymérase le T7, 1 mM d'un mélange d'acides aminés sans méthionine, 20 µCi de méthionine marquée au ³⁵S (Amersham Bioscience) et 16 µl d'eau. Le mélange réactionnel était incubé à 30°C pendant 90 min. Les tubes étaient ensuite transférés sur glace afin d'empêcher la dénaturation et la dégradation des protéines.

2.3.3 Coimmunoprécipitation *in vitro*

Les protéines générées par transcription/traduction *in vitro* et marquées à la méthionine ³⁵S ont été utilisées pour les expériences de coimmunoprécipitation *in vitro*. Brièvement, 10 µl de billes protéine G-agarose (Roche) prélavées 4 fois avec du PBS étaient préincubées pendant 2 h avec 35 µg d'anticorps monoclonal anti-Flag M2 (Sigma). Après un lavage à l'aide de 1 ml de PBS froid, 15 µl de Dicer et 15 µl de protéine ou peptide viral étaient ajoutés et incubés pendant 1 h additionnelle. Par la suite, les billes étaient lavées 4 fois avec 1 ml de PBS pendant 5 min sous rotation à 4°C, et récupérées par centrifugation à 2500 RPM. À la fin, 30 µl de tampon SB 1X était ajouté, les protéines bouillies et analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10%, tel que décrit dans la section 2.2. Le gel était séché à 80°C pendant 1 h et les bandes révélées par autoradiographie.

Chapitre 3 Résultats

3.1 Double-hybride chez la levure

Afin d'identifier les protéines du VHC pouvant interagir avec Dicer, nous avons criblé une banque d'ADNc du VHC en utilisant la forme humaine de la ribonucléase Dicer comme appât dans le système du double-hybride chez la levure. Suite à la cotransformation des levures avec le vecteur exprimant le domaine DLA du GAL4 fusionné à Dicer et le vecteur exprimant le domaine DA fusionné à une librairie d'inserts provenant du génome du VHC, les transformants étaient sélectionnés sur un milieu SD/Trp-/Leu-/Ade-. Les colonies poussant sur ce milieu ont ensuite été étalées sur d'autres milieux afin de vérifier et de confirmer l'activation des gènes rapporteurs Ade2, His3 et *LacZ*. À cette fin, des témoins positifs et négatifs appropriés étaient utilisés dans le but de comparer les résultats et de les interpréter adéquatement (voir tableau 3). Les témoins positifs comportent des protéines présentant des interactions déjà documentées, telles que la « coactosin-like protein » (CLP)-5-lipoxygénase (5LO), la SNF1-SNF4 et la 5LO-dsRBD Dicer. En ce qui concerne les témoins négatifs, l'utilisation de différentes combinaisons impliquant des vecteurs vides ou des protéines aléatoires a été préconisée.

Tableau 3 : Les témoins positifs et négatifs utilisés dans les expériences de double-hybride chez la levure. Légende : +++, très forte interaction; ++, forte interaction; +, interaction; -, absence d'interaction. CLP, « coactosin-like protein »; 5LO, 5-lipoxygénase.

Vecteur DA	Vecteur DLA	Interaction
pACT2-CLP	pGBT9-5LO	++
pACT2- dsRBD Dicer	pGBT9-5LO	+++
pACT2-5LO	pGBT9- dsRBD Dicer	++++
pACT2	pGBT9-Dicer et ses domaines	-
pGADT7	pGBT9-Dicer et ses domaines	-
pACT2	pGBT9-5LO	-
pGADT7	pGBT9-5LO	-
pGADT7-DHCV	pGBT9-5LO	-
pACT2-NS3	pGBT9-5LO	-
pACT2-NS5B	pGBT9-5LO	-

Sur un total de 3.08×10^5 transformants, plus de 25 clones viraux (DHCV) indépendants présentant une interaction avec la protéine Dicer complète ont pu être identifiés (Isabelle Plante, résultats non-publiés). À partir des clones DHCV, l'ADN plasmidique était extrait et l'identification des peptides viraux codés par les inserts de la librairie d'ADNc par réaction de séquençage a été effectuée (Isabelle Plante, résultats non-publiés).

Les résultats obtenus sont résumés à la figure 8. Les peptides viraux identifiés proviennent des protéines structurales E1 (clones DHCV79 et 118) et E2 (clone DHCV77), et des protéines non-structurales NS3 (clones DHCV17, 87, 89, 36, 43, 50, 54 et 68), NS4B (clones DHCV2 et 10) et NS5B (clones DHCV104, 4, 14, 20, 21, 44, 71, 75, 5 et 94). On a également identifié 2 clones (DHCV1 et 25) dont les inserts montraient une orientation inversée (voir figure 8).

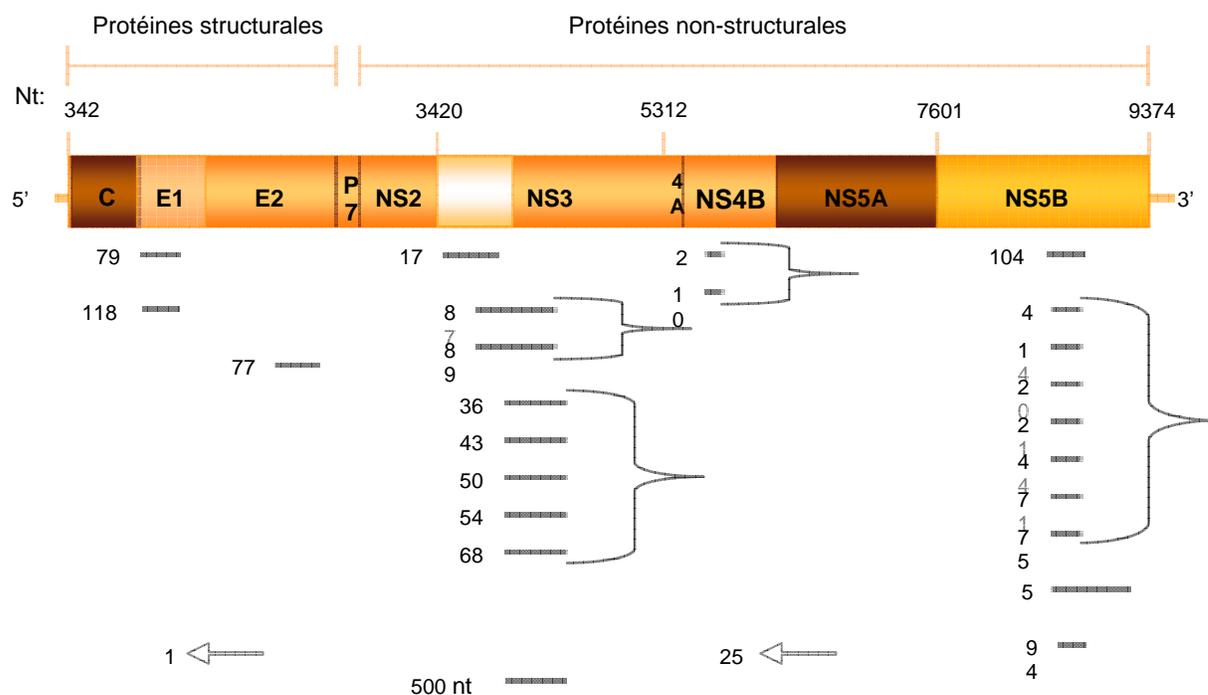


Figure 8 : Identification des différents peptides du VHC (clones DHCV) pouvant interagir avec Dicer.

On remarque que la majorité des clones identifiés représentent des peptides dérivés des protéines non-structurales NS3 (8 clones) et NS5B (10 clones). Il est intéressant de constater que deux clones, en particulier, ont été identifiés plusieurs fois. Ceci démontre la saturation du criblage de la librairie d'ADNc du VHC et reflète la reproductibilité des résultats obtenus.

Ces observations nous ont incité à se pencher de plus près sur les protéines non-structurales NS3 et NS5B. L'ADNc codant pour ces dernières a été amplifié et cloné dans le vecteur pACT2 afin de produire une protéine fusionnée avec le DA du GAL4. Nous avons ensuite validé les résultats présentés à la figure 8 et procédé à nouveau au double-hybride chez la levure en y incorporant, cette fois, NS3 et NS5B. Un représentant de chaque clone DHCV pouvant interagir avec la protéine Dicer complète (clones DHCV79, 77, 17, 87, 36, 10,

104, 4 et 94) a été analysé (voir tableau 4). Ces expériences sont nécessaires afin de s'assurer que les interactions observées sont bien reliées aux plasmides qui ont été isolés et aux inserts séquencés.

Les résultats compilés dans le tableau 4 montrent que les peptides DHCV79 (E1), DHCV17, DHCV87, DHCV36 (NS3) et DHCV4 (NS5B) présentent une interaction avec Dicer, alors que le peptide DHCV94 (NS5B) présente l'interaction la plus forte dans ce contexte expérimental. Cependant, les protéines NS3 et NS5B complètes ne montrent qu'une très faible interaction avec Dicer.

Tableau 4 : Interaction entre Dicer et différents peptides dérivés du VHC par le système du double-hybride chez la levure. Légende : +++, forte interaction; ++ interaction; +, faible interaction; +/-, très faible interaction; -, absence d'interaction.

Vecteur DA	Vecteur DLA	Interaction
pGADT7-DHCV79 (E1)	pGBT9-Dicer	++
pGADT7-DHCV77 (E2)	pGBT9-Dicer	+
pACT2-NS3	pGBT9-Dicer	+/-
pGADT7-DHCV17	pGBT9-Dicer	++
pGADT7-DHCV87	pGBT9-Dicer	++
pGADT7-DHCV36	pGBT9-Dicer	++
pGADT7-DHCV10 (NS4B)	pGBT9-Dicer	+
pACT2-NS5B	pGBT9-Dicer	+/-
pGADT7-DHCV104	pGBT9-Dicer	+
pGADT7-DHCV4	pGBT9-Dicer	++
pGADT7-DHCV94	pGBT9-Dicer	+++

Nous avons ensuite déterminé l'implication des différents domaines de Dicer, soit le domaine N-terminal (nt 1-602), le domaine central (nt 597-1243), le domaine C-terminal (nt 1237-1912) et le domaine dsRBD (nt 1772-1912) dans l'interaction avec NS3, NS5B et les différents peptides viraux. Tel que démontré au tableau 5, le domaine N-terminal de Dicer interagit fortement avec les peptides DHCV4 et DHCV94 dérivés de NS5B. Quant aux domaines central et C-terminal, ils interagissent plus particulièrement avec les peptides viraux DHCV87 et DHCV36 dérivés de NS3. Le domaine dsRBD n'interagit pas de façon significative avec NS3, NS5B ou les peptides viraux. Les protéines NS3 et NS5B complètes n'ont montré aucune interaction avec les différents domaines de Dicer.

Tableau 5 : Interaction entre différents domaines de Dicer et les peptides dérivés du VHC par le système du double-hybride chez la levure. Légende : +++, forte interaction; ++, interaction; +, faible interaction; +/-, très faible interaction; -, absence d'interaction.

DLA-Dicer (nt) (domaine) DA-VHC	pGBT9-Dicer 1-602 (N-terminal)	pGBT9-Dicer 597-1243 (Central)	pGBT9-Dicer 1237-1912 (C-terminal)	pGBT9-Dicer 1772-1912 (dsRBD)
pGADT7-DHCV79 (E1)	-	+	+/-	+/-
pGADT7-DHCV77 (E2)	-	+/-	+/-	-
pACT2-NS3	-	-	-	-
pGADT7-DHCV17	-	+	++	+
pGADT7-DHCV87	-	+++	+++	-
pGADT7-DHCV36	+	++	++	+/-
pGADT7-DHCV10 (NS4B)	-	-	-	-
pACT2-NS5B	-	-	-	-
pGADT7-DHCV104	-	+	+	-
pGADT7-DHCV4	++	+	+/-	-
pGADT7-DHCV94	+++	+	+	-

3.2 Coimmunoprécipitation *in vivo*

Le système du double-hybride chez la levure nous a permis de détecter des interactions significatives entre Dicer et certains peptides du VHC. Cependant, les protéines NS3 et NS5B complètes ne lient Dicer que très faiblement. Cela pourrait être relié à une limitation expérimentale. De fait, il est possible que NS3 et/ou NS5B adoptent leur conformation native lorsqu'exprimées avec les autres protéines du VHC dans des cellules humaines en culture.

La coimmunoprécipitation représente la méthode de choix pour valider les interactions potentielles entre protéines *in vivo*. L'étape suivante de mon projet consistait donc à étudier l'interaction entre Dicer et les protéines non-structurales NS3 et NS5B *in vivo* en utilisant la lignée cellulaire Huh7 hébergeant un réplicon. Ce dernier exprime de façon stable les protéines non-structurales du VHC.

Dans un premier temps, les cellules étaient lysées à l'aide d'un tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases (1X) et du PMSF (1 mM) afin de limiter la dénaturation et la dégradation des protéines. Les lysats étaient ensuite incubés avec l'anticorps anti-Dicer, préfixé à des billes protéine G-agarose et servant à immunoprécipiter la protéine Dicer endogène. Les protéines cellulaires recueillies grâce à l'anti-Dicer étaient séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10% et analysées par immunobuvardage (IB).

Tel qu'illustré à la figure 9, la protéine Dicer a pu être immunoprécipitée par l'anticorps anti-Dicer (puit 2), alors qu'aucun signal n'a été détecté dans les IP réalisées avec les billes vides seulement (puit 3). Lorsque la membrane a été révélée avec l'anticorps anti-NS5B, une bande de poids moléculaire correspondant à NS5B était détectée dans les IPs de Dicer. Une bande d'intensité plus faible apparaît également avec les billes vides seulement. Malgré que cette dernière observation suggère que NS5B interagit avec les billes de façon non-spécifique, nous ne pouvons exclure, à ce stade-ci, que NS5B interagit bel et bien avec Dicer.

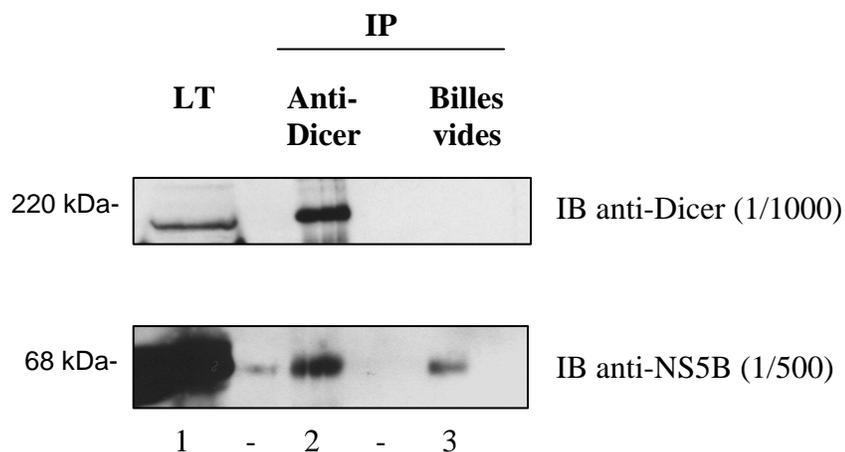


Figure 9 : Étude de coimmunoprécipitation *in vivo* entre Dicer et NS5B. 1, lysat total (LT); 2, IP de Dicer à l'aide de l'anticorps anti-Dicer; 3, IP contrôle réalisée en absence de l'anticorps anti-Dicer; -, puit vide.

Utilisant une approche similaire, nous n'avons pas pu démontrer une interaction entre Dicer et NS3 (voir figure 10), où la bande de NS3 n'est pas plus intense dans les IP Dicer (puit 2) versus les billes vides seulement (puit 3). Ces résultats suggèrent que Dicer lie NS5B, mais non NS3, *in vivo*.

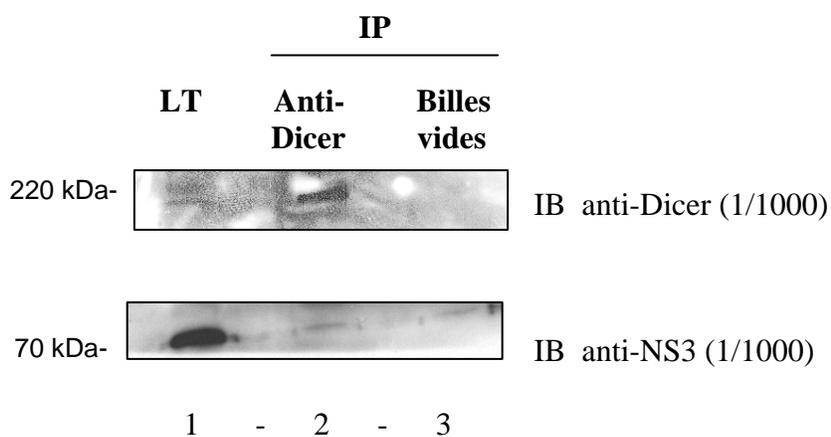


Figure 10 : Étude de coimmunoprécipitation *in vivo* entre Dicer et NS3. 1, lysat total (LT); 2, IP de Dicer à l'aide de l'anticorps anti-Dicer; 3, IP contrôle réalisée en absence de l'anticorps anti-Dicer; -, puit vide.

3.3 Coimmunoprécipitation *in vitro*

Considérant la possibilité que les niveaux de NS3 coimmunoprécipitée soient trop près des limites de détection dans les expériences d'immunobuvardage précédentes, nous avons opté pour une technique plus sensible utilisant des protéines marquées à la méthionine ³⁵S.

Nous avons donc réalisé des expériences de coimmunoprécipitation *in vitro* entre Dicer et NS3, NS5B ou les peptides viraux dérivés de NS3 (DHCV36 et DHCV87) et de NS5B (DHCV4 et DHCV94). Ces peptides viraux ont été sélectionnés étant donné leur interaction avec Dicer dans le système du double-hybride chez la levure (voir tableaux 4 et 5).

Dans un premier temps, la protéine Dicer intacte de même que NS3, NS5B et les peptides viraux fusionnés à l'épitope Flag, étaient produits par des réactions de transcription/traduction *in vitro*. Toutes les protéines étaient marquées à la méthionine ³⁵S. Par la suite, une IP a été réalisée *in vitro*. Brièvement, les protéines marquées étaient incubées avec le premier anticorps dirigé contre l'épitope Flag préfixé aux billes protéine G-agarose. Les protéines collectées grâce à l'anticorps anti-Flag étaient ensuite séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10%, et révélées par autoradiographie.

Tel qu'illustré aux figures 11, 12 et 13, les protéines Flag-NS3 (70 kDa), Flag-NS5B (68 kDa) ainsi que les peptides viraux Flag-DHCV36 (20,2 kDa), DHCV87-Flag (25,6 kDa), DHCV4-Flag (9,8 kDa) et Flag-DHCV94 (9,2 kDa) ont pu être immunoprécipité par l'anticorps anti-Flag (voir figures 11-13). Une bande correspondant à Dicer était détectée par autoradiographie, suggérant que Dicer peut interagir avec ces protéines et peptides viraux *in vitro*.

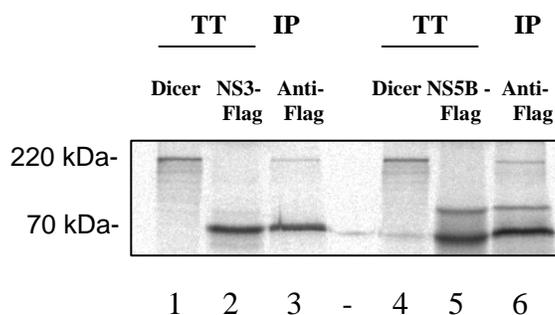


Figure 11 : Étude de coimmunoprécipitation *in vitro* entre Dicer/NS3 et Dicer/NS5B. 1, 2, 4 et 5, les protéines Dicer, Flag-NS3 et Flag-NS5B produites par transcription/traduction (TT) *in vitro*; 3 et 6, IP de Flag-NS3 et Flag-NS5B, incubés en présence de Dicer, à l'aide de l'anticorps anti-Flag; -, puit vide. Les protéines marquées au ^{35}S étaient détectées par autoradiographie.

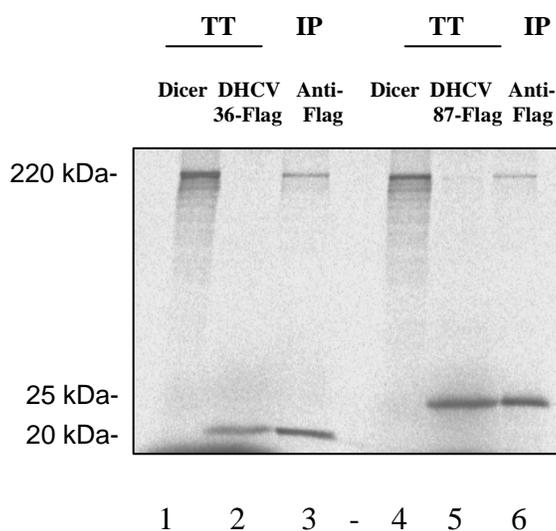


Figure 12 : Étude de coimmunoprécipitation *in vitro* entre Dicer/DHCV36 et Dicer/DHCV87. 1, 2, 4 et 5, les protéines Dicer, Flag-DHCV36 et DHCV87-Flag produites par transcription/traduction (TT) *in vitro*; 3 et 6, IP des peptides Flag-DHCV36 et DHV87-Flag, incubés en présence de Dicer, à l'aide de l'anticorps anti-Flag; -, puit vide. Les protéines marquées au ^{35}S étaient détectées par autoradiographie.

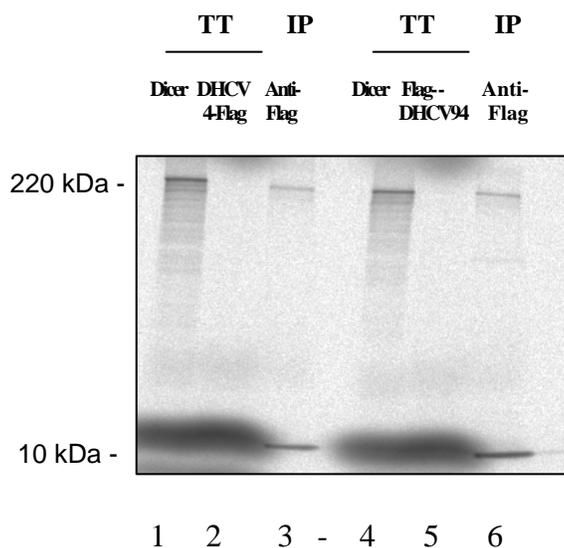


Figure 13 : Étude de coimmunoprécipitation *in vitro* entre Dicer/DHCV4 et Dicer/DHCV94. 1, 2, 4 et 5, les protéines Dicer, DHCV4-Flag et Flag-DHCV94 produites par transcription/traduction (TT) *in vitro*; 3 et 6, IP des peptides DHCV4-Flag et Flag-DHCV94, incubés en présence de Dicer, à l'aide de l'anticorps anti-Flag; -, puits vides. Les protéines marquées au ^{35}S étaient détectées par autoradiographie.

Nous avons ensuite utilisé des billes protéine G-agarose vides afin de documenter l'adsorption non-spécifique des protéines à celles-ci dans le cadre d'expérience de coIP *in vitro*. Nous avons également effectué des IPs à l'aide d'IgG non-spécifiques de souris.

Les résultats indiquent la présence d'une certaine quantité de protéines qui se fixent sur les billes de manière non-spécifique (voir figure 14, puits 4 et 5 et figure 15, puits 4 et 5). Cependant, l'intensité des bandes correspondant à Dicer avec DHCV4 et DHCV94 immunoprécipités par l'anticorps anti-Flag est légèrement supérieure à celle des témoins négatifs (voir figure 14 puit 3 vs puits 4 et 5, et figure 15 puit 3 vs puits 4 et 5). Ces observations laissent entrevoir la possibilité que Dicer puisse interagir avec les peptides viraux DHCV4 et DHCV94 *in vitro*.

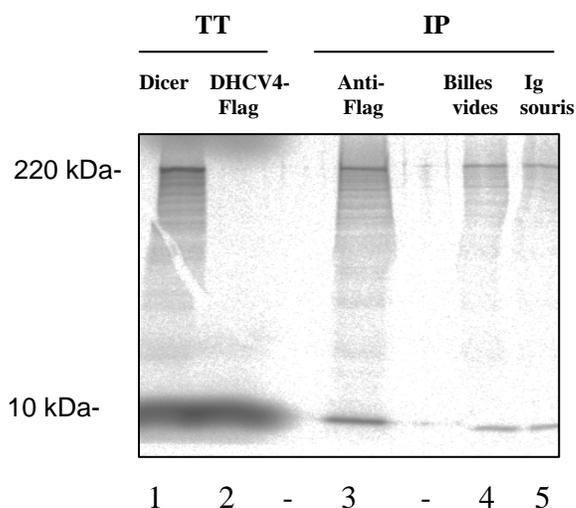


Figure 14 : Étude de coimmunoprécipitation *in vitro* entre Dicer et DHCV4. 1 et 2, les protéines Dicer et DHCV4-Flag produits par transcription/traduction (TT) *in vitro*. 3, IP de DHCV4-Flag, incubé en présence de Dicer, à l'aide de l'anticorps anti-Flag; 4, IP contrôle réalisée en absence d'anticorps; 5, IP contrôle réalisée à l'aide d'IgG de souris; -, puit vide. Les protéines marquées au ^{35}S étaient détectées par autoradiographie.

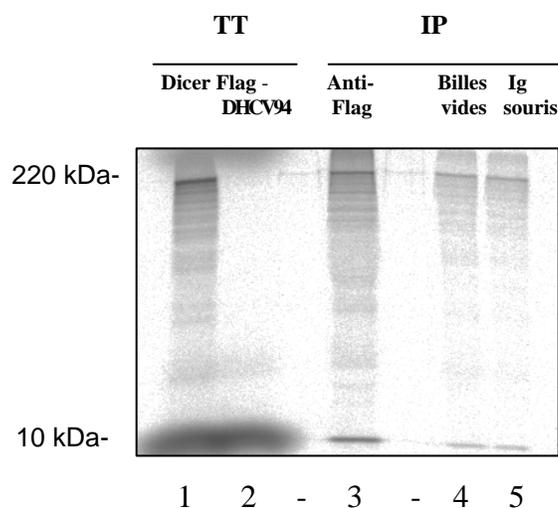


Figure 15 : Étude de coimmunoprécipitation *in vitro* entre Dicer et DHCV94. 1 et 2, les protéines Dicer et Flag-DHCV94 produites par transcription/traduction (TT) *in vitro*. 3, IP de Flag-DHCV94, incubé en présence de Dicer, à l'aide de l'anticorps anti-Flag; 4, IP contrôle réalisée en absence d'anticorps; 5, IP contrôle réalisée à l'aide d'IgG de souris; -, puit vide. Les protéines marquées au ^{35}S étaient détectées par autoradiographie.

Chapitre 4 Discussion et conclusion

La complexité des interactions hôte-virus, la persistance et la résistance virale peuvent être associées, du moins en partie, à différentes stratégies développées par certains virus afin d'échapper à l'immunité anti-virale. Parmi ces stratégies, notons la production de protéines virales interagissant avec certaines composantes de l'hôte ayant pour effet d'interférer avec leur fonction biologique ou de les détourner pour leur propre réplication. La susceptibilité du génome du VHC à l'action de Dicer *in vitro*, mais non *in vivo*, nous porte à croire que certaines protéines du VHC pourraient interférer avec celle-ci afin d'échapper à la voie de l'iARN.

Dans cette présente étude, nous avons étudié l'interaction potentielle entre Dicer et les protéines non-structurales du VHC. Pour réaliser notre objectif, nous avons criblé une banque d'ADNc du VHC afin d'identifier les protéines/peptides pouvant interagir avec Dicer à l'aide du système du double-hybride chez la levure. L'un des désavantages de ce système est l'auto-activation des gènes rapporteurs, en particulier celui de l'histidine. Pour pallier à ce problème, nous avons eu recours au vecteur de faible expression pGBT9 (Provost et al., 2001). De plus, nous avons utilisé le 3-AT, un inhibiteur compétitif de l'histidine chez la levure, lors de l'essai du gène rapporteur His3. D'autre part, la lignée de levure PJ69-4A présente l'avantage d'avoir les trois gènes rapporteurs combinés sous le contrôle de trois promoteurs GAL4 différents (GAL1-HIS3, GAL2-ADE2 et GAL7-lacZ), réduisant ainsi l'émergence de faux positifs (Chen et al., 1997).

Les différents peptides du VHC pouvant interagir avec Dicer dans le double-hybride (voir figure 8) proviennent aussi bien des protéines structurales (E1 et E2) que des protéines non-structurales (NS3, NS4B et NS5B). Les peptides viraux dérivés de NS3 (DHCV17, 36 et 87) et NS5B (DHCV4 et 94) sont ceux qui interagissent le plus fortement avec Dicer dans ce contexte expérimental. La conformation, la taille et la surface exposée de ces peptides peuvent influencer leur interaction avec Dicer. Par ailleurs, la présence des domaines DA et DLA fusionnés aux protéines étudiées dans les expériences du double-hybride peuvent également influencer ces interactions.

Le peptide DHCV17 fait partie du domaine protéase N-terminal de NS3, tandis que les peptides DHCV87 et DHCV36 chevauchent les domaines protéase et NTPase/hélicase. Cela suggère que cette interaction implique davantage le domaine protéase. Il serait intéressant de tester cette interaction en enlevant le domaine protéasique de NS3 ou de le fusionner avec une autre protéine qui n'interagit pas avec Dicer.

Nous avons également identifié les portions de Dicer qui peuvent lier ces peptides viraux (voir tableau 5). Le domaine N-terminal, présentant une possible fonction hélicase, lie efficacement les peptides DHCV4 et DHCV94 dérivant de la polymérase NS5B. Quant aux domaines central (contenant le domaine PAZ) et C-terminal (contenant les domaines RIIIa, RIIIb et dsRBD) de Dicer, ils sont cruciaux dans l'interaction avec les peptides DHCV87 et DHCV36. Ces observations intrigantes soulèvent plusieurs hypothèses évoquant la nature de cette interaction. Cependant, NS3, NS5B ou les peptides viraux n'interagissent pas de façon significative avec le domaine dsRBD de Dicer, excluant une possible modulation de la capacité de Dicer à lier les ARNdb.

Une faible interaction a été observée entre Dicer et les protéines NS3 et NS5B complètes (voir tableau 4). Ceci n'exclut pas l'existence d'une interaction significative dans un autre contexte et pourrait être dû, du moins pour NS5B, à la présence de son domaine hydrophobe en position C-terminal. Ce domaine hydrophobe, ayant pour rôle l'ancrage de NS5B aux membranes de la cellule hôte, pourrait cependant gêner le transport de la protéine de fusion (DA-NS5B) au noyau, site d'activation de la transcription des gènes rapporteurs. En effet, des chercheurs ont réussi à restaurer une interaction entre NS5B et l' α -actinine, une composante cellulaire requise pour la réplication virale, dans le système du double-hybride chez le levure en éliminant les 21 a.a hydrophobes à l'extrémité C-terminal de NS5B, facilitant ainsi la solubilité et le transport nucléaire de celle-ci (Lan et al., 2003). Il serait donc intéressant de refaire l'expérience en retirant ce domaine hydrophobe de la protéine NS5B.

La banque d'ADNc viral dérivé du génome du VHC a été créée de façon aléatoire. Il serait donc important d'examiner plus en détails les portions peptidiques pouvant interagir avec Dicer par des études de délétion et/ou de mutagenèse dirigée.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu confirmer les résultats obtenus en double-hybride par l'approche de la coIP. Nous nous sommes concentré sur les protéines non-structurales NS3 et NS5B, puisque ces deux protéines présentent plusieurs peptides montrant une interaction avec Dicer dans les expériences du double-hybride. La coIP *in vivo* et *in vitro* représente une alternative de choix aux possibles problèmes de transport nucléaire de NS5B dans le contexte du double-hybride.

Le système de réplicon, exprimant les protéines non-structurales du VHC dans les cellules Huh7, a fourni un outil expérimental intéressant afin d'étudier l'interaction entre Dicer et les protéines du VHC *in vivo*. Chez ces cellules, nous avons pu détecter une interaction entre Dicer et NS5B par coIP *in vivo* (voir figure 9). Quant à NS3, aucune interaction n'a été observée dans ce contexte expérimental (voir figure 10). Ceci peut être relié, du moins en partie, à une compartimentation de NS3. Ces expériences ont pu être reproduites à trois reprises.

Grâce au système de transcription/traduction *in vitro*, nous avons pu produire efficacement Dicer, NS3, NS5B, les peptides DHCV36 et DHCV87 dérivant de NS3 ainsi que DHCV4 et DHCV94 dérivant de NS5B. Les résultats obtenus des coIP *in vitro* semblaient indiquer une interaction entre les protéines ou peptides viraux et Dicer (voir figures 11-13). Cependant, il a fallu avoir recours à des contrôles supplémentaires afin de tenir compte de l'apparente adsorption de certaines protéines/peptides aux billes. Malgré l'optimisation de nombreux paramètres expérimentaux, le bruit de fond n'a pu être diminué davantage. Toutefois, il est intéressant de constater qu'avec les peptides DHCV4 et DHCV94, l'intensité des bandes immunoprécipitées spécifiquement semblait plus importante. Il serait important de répéter les expériences avec NS3, NS5B ainsi qu'avec les autres peptides viraux avec ces témoins négatifs, tout en changeant certaines conditions (composition des tampons, nature du détergent, blocage des billes, modification du temps d'incubation, lavages, température, etc.) afin de diminuer davantage, voire éliminer, le bruit de fond.

La présente étude pourrait être prometteuse et encourageante pour développer d'avantage l'hypothèse d'une interaction entre le VHC et la voie de l'iARN. Il serait intéressant d'étudier l'impact de cette interaction sur l'activité de Dicer et l'efficacité de la voie de l'iARN. Par ailleurs, la conception de nouveaux systèmes de culture du VHC permettra

l'étude *in vivo* des protéines structurales et non-structurales dans un contexte plus proche de la situation clinique.

Note : Au cours de la rédaction de ce mémoire, une étude analogue à la nôtre et appuyant notre hypothèse a identifié, pour la première fois, une interaction entre Dicer et une protéine virale, soit la protéine Tat du VIH-1. Tat permettrait possiblement au virus d'échapper à l'action de la voie de l'iARN (Bennasser et al., 2005).

Annexe A Préparation des milieux utilisés pour le double-hybride chez la levure

Milieu YPAD liquide (pour 700 ml) :

Bacto-peptone (Difco) 14.0 g
Extrait de levure (Difco) 7.0 g
Adénine hémissulfate (Sigma) 70.0 mg
Compléter avec de l'eau millipore à 650 ml
(Pour milieu solide, ajouter 10.0 g de Bacto-agar (Difco)).
Autoclaver à 121°C pendant 15 min, puis ajouter :
D(+)-glucose (Sigma) 40% stérile 35 ml
Eau millipore stérile 15 ml
Storage à l'obscurité à la température de la pièce.

Milieu SD/-Leu/-Trp (pour 700 ml) :

Base azotée de levures sans aa 4.69 g
Mélange d'aa #1 578 mg
Mélange d'aa #2 224 mg
Mélange d'aa #3 (-Leu/-Trp) 49 mg
Compléter avec de l'eau millipore à 650 ml
Ajuster le pH à 5.6 - 5.7.
Bacto-agar (Difco) 11.7 g
Autoclaver à 121°C pendant 15 min, puis ajouter :
D(+)-glucose 40% stérile 35 ml
Eau millipore stérile 15 ml
Storage à l'obscurité à 4°C.

Milieu SD/-Leu/-Trp/-Ade (pour 700 ml) :

Base azotée de levures sans aa 4.69 g
Mélange d'aa #1 578 mg
Mélange d'aa #2 224 mg
Histidine (Sigma) 17.5 mg
Compléter avec l'eau millipore à 650 ml
Ajuster le pH à 5.6 - 5.7
Bacto-agar (Difco) 11.7 g
Autoclaver à 121°C pendant 15 min, puis ajouter :
D(+)-glucose 40% stérile 35 ml
Eau millipore stérile 15 ml
Storage à l'obscurité à 4°C.

Milieu SD/-Leu/-Trp/-His + 4 mM 3-AT pour (700 ml) :

Base azotée de levure sans aa 4.69 g

Mélange d'aa #1 578 mg
 Mélange d'aa #2 224 mg
 Adénine hémissulfate (Sigma) 28 mg
 Compléter avec de l'eau millipore à 650 ml
 Ajuster le pH à 5.6 - 5.7
 Bacto-agar (Difco) 11.7 g
 Autoclaver à 121°C pendant 15 min, puis ajouter :
 D(+)-glucose 40% stérile 35 ml
 Eau millipore stérile 15 ml
 À T° environ 55°C, ajouter 2.8 ml de 3-AT (1 M)
 Storage à l'obscurité à 4°C.

Milieu SD/-Leu/-Trp + X-Gal (pour 700 ml) :

Base azotée de levures sans aa 4.69 g
 Mélange d'aa #1 578 mg
 Mélange d'aa #2 224 mg
 Mélange d'aa #3 (-Leu/-Trp) 49 mg
 Compléter avec de l'eau millipore à 650 ml
 Ajuster le pH à 5.6 - 5.7.
 Bacto-agar (Difco) 11.7 g
 Autoclaver à 121°C pendant 15 min, puis ajouter :
 Tampon phosphate 0.7 M (pH 7.0) 70 ml
 D(+)-glucose 40% stérile 35 ml
 À T° environ 55°C, ajouter 1.4 ml de X-Gal (20 mg/ml)
 Storage à l'obscurité à 4°C.

Mélange d'aa (Sigma):

Mélange d'aa #1 :	Mélange d'aa #2 :	Mélange d'aa #3 :
Phe 750 mg Met 350 mg Val 2.25 g Glu 1.5 g Ser 5.625 g Asp 1.5 g	Thr 6.0 g Arg 600 mg Ura 700 mg Tyr 900 mg Lys 1.05 g	His 1.25 g Ade 2.0 g

3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT) 1 M :

3.3632 g de 3-AT (Sigma) dans 40 ml d'eau millipore.
 Stérilisation par filtration et storage à -20°C.

Tampon phosphate 0.7 M, pH 7.0 :

(A) 0.7 M K₂HPO₄ : 48.77 g dans 400 ml d'eau (basique).

(B) 0.7 M KH_2PO_4 : 38.105 g dans 400 ml d'eau (acide).
Mélanger (A) et (B) jusqu'à l'obtention d'un pH de 7.0. Stérilisation par filtration et storage à 4°C.

X-Gal (20 mg/ml):

200.0 mg de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (Sigma) dans 10.0 ml de diméthylformamide (DMF). Storage à l'obscurité à -20°C.

Annexe B Préparation des solutions

PBS 10 X : 80 g NaCl
2 g KCl
26,8 g Na₂HPO₄ · 7H₂O
2,4 g KH₂PO₄

Dissoudre dans 800 ml d'eau millipore, ajuster le pH à 7.4 avec du HCl. Ajuster à un volume de 1 L et stériliser par autoclavage. Diluer à 1/10 avec de l'eau stérile avant chaque utilisation.

G418 solution (généticine) :

Dissoudre la généticine (No. cat. 11811-031, Gibco) dans l'eau millipore stérile jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 500 mg/ml.

Storage à 4°C.

Sample buffer 2 X : 25 ml 4x Tris-Cl/SDS, pH 6.8
20 ml glycerol
4 g SDS
2 ml β-mercaptoethanol
1 mg bleu de bromophenol
Compléter avec de l'eau millipore à 100 ml et mélanger.
Storage en aliquots de 1 ml à -70°C.

PMSF 100 mM : Dissoudre 0,017 g dans 1 ml d'éthanol 95 %.
Storage à -20°C.

Tampon de migration pour l'électrophorèse (5X) :

9.0 g Tris
43.2 g Glycine
3.0 g SDS
Compléter à 600 ml avec de l'eau millipore.
Storage à 4°C.

Tampon de transfert pour l'immunobuvardage :

3.0 g Tris
14.4 g Glycine
200 ml Méthanol
Compléter à 1 L avec de l'eau millipore.
Storage à 4°C.

TBS 10X : 180 ml Tris-Cl 1 M (pH 7.6)

246.6 ml NaCl 5 M
Compléter à 900 ml avec de l'eau millipore.

TBS-Tween : 100 ml TBS 10X
Ajouter 900 ml d'eau millipore et 1 ml de Tween-20.

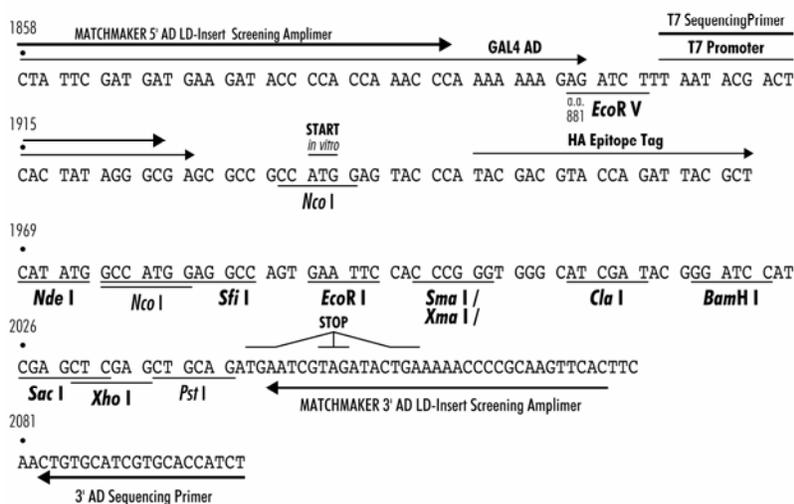
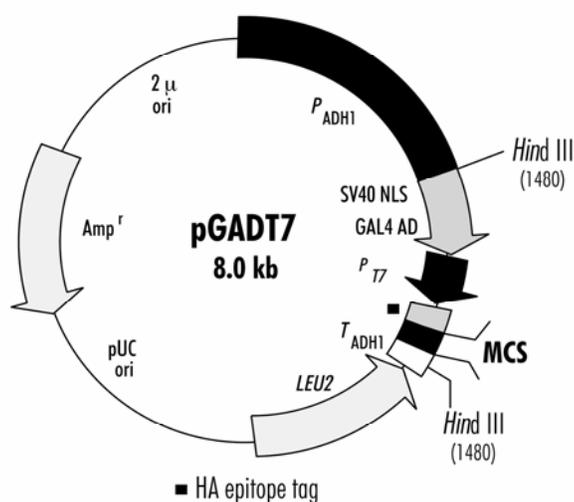
Annexe C Vecteurs utilisés pour l'expression de protéines dans le système du double-hybride chez la levure

pGADT7 Vector Information

GenBank Accession #: submission in progress

PT3249-5

Catalog # K1612-1

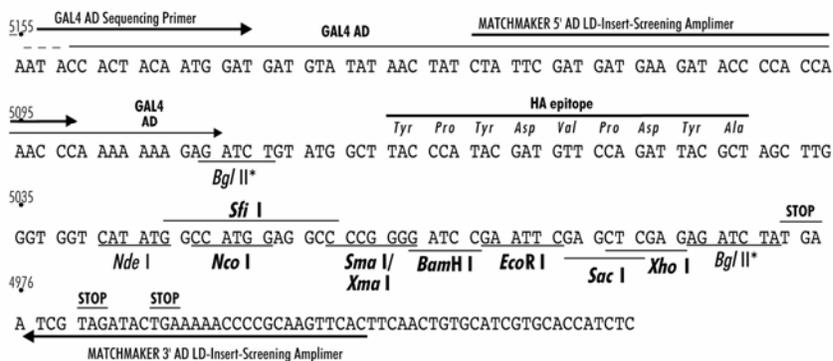
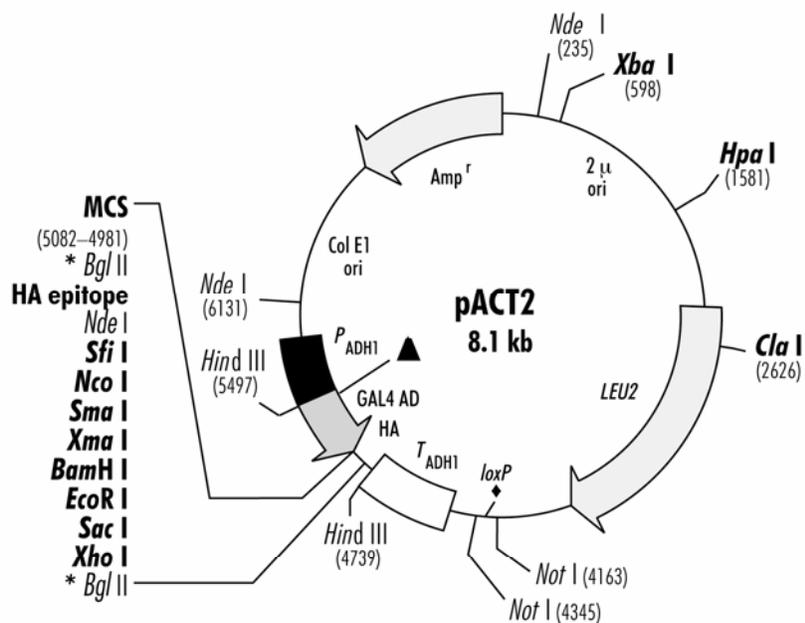


pACT2 AD Vector Information

GenBank Accession #: U29899.

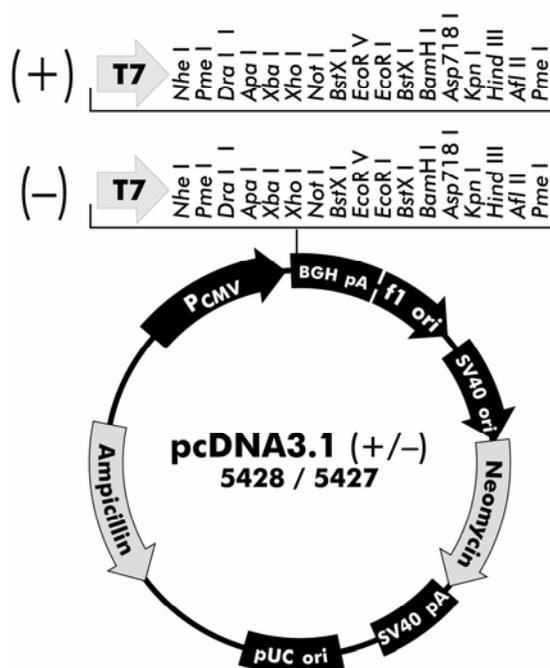
PT3022-5

Catalog #K1604-A



Annexe D Vecteur utilisé pour l'expression de protéines dans les cellules de mammifère en culture

No. Catalogue V790-20



Annexe E Génome du VHC utilisé pour la création de la librairie d'ADNc sondée à l'aide du double-hybride chez la levure

No. Acc. AF011751

pCV-H77C

Sequence 9599 BP; 1892 A; 2889 C; 2721 G; 2097 T; 0 other;

gccagcccc	tgatgggggc	gacactccac	catgaatcac	tcccctgtga	ggaactactg	60
tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgtcgtgcag	cctccaggac	120
ccccctccc	gggagagcca	tagtggctctg	cggaaccggg	gagtacaccg	gaattgccag	180
gacgaccggg	tcctttcttg	gataaaccgg	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcgtgcccc	240
gcaagactgc	tagccgagta	gtgttgggtc	gcgaaaggcc	ttgtgggtact	gcctgatagg	300
gtgcttgcca	gtgccccggg	aggtctcgta	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcctaacc	360
ctcaaagaaa	aaccaaacgt	aacaccaacc	gtcgcccaca	ggacgtcaag	ttcccgggtg	420
gcggtcagat	cgttggtgga	gtttacttgt	tgccgcgcag	gggccctaga	ttgggtgtgc	480
gcgcgacgag	gaagacttcc	gagcggtcgc	aacctcgagg	tagacgtcag	cctatcccca	540
aggcacgtcg	gcccaggggc	aggacctggg	ctcagcccgg	gtacccttgg	cccctctatg	600
gcaatgaggg	ttgcgggtgg	gcgggatggc	tctgtctccc	ccgtggctct	cggcctagct	660
ggggccccac	agacccccgg	cgtaggtcgc	gcaatttggg	taaggtcatc	gataccctta	720
cgtgcggctt	cgccgacctc	atggggtaca	taccgctcgt	cggcgcccct	cttggaggcg	780
ctgccagggc	cctggcgcgt	ggcgtccggg	ttctggaaga	cggcgtgaac	tatgcaacag	840
ggaaccttcc	tggttgctct	ttctctatct	tcctctctgg	cctgctctct	tgctgactg	900
tgcccgcctc	agcctaccaa	gtgcgcaatt	cctcggggct	ttaccatgtc	accaatgatt	960
gccctaactc	gagtattgtg	tacgagggcg	ccgatgccat	cctgcacact	ccgggggtgtg	1020
tccttgcggt	tcgcgagggg	aacgcctcga	ggtgttgggt	ggcggtgacc	cccacgggtg	1080
ccaccagggc	cggcaaacct	cccacaacgc	agcttcgacg	tcataatgat	ctgcttctcg	1140
ggagccagca	cctctgctcg	gcctctctag	tggggagcct	gtgcgggtct	gtcttctctg	1200
ttggtcaact	gtttaccttc	tctcccaggc	gccactggac	gacgcaagac	tgcaattgtt	1260
ctatctatcc	cggccatata	acgggtcatc	gcatggcatg	ggatatgatg	atgaactggg	1320
cccctacggc	agcgttgggtg	gtagctcagc	tgctccggat	cccacaagcc	atcatggaca	1380
tgatcgctgg	tgctcactgg	ggagtccctg	cgggcatagc	gtatttctcc	atgggtgggga	1440
actgggcgaa	ggtcctggta	gtgctgctgc	tatttgccgg	cgctgcagcg	gaaaccacag	1500
tcaccggggg	aaatgcggcg	cgaccacggg	ctgggcttgt	tggtctcctt	acaccaggcg	1560
ccaagcagaa	catccaactg	atcaacacca	acggcagttg	gcacatcaat	agcacggcct	1620
tgaattgcaa	tgaaagcctt	aacaccggct	ggttagcagg	gctcttctat	caacacaaat	1680
tcaactcttc	aggctgtcct	gagaggttgg	ccagctgccg	acgccttacc	gattttgccc	1740
agggctgggg	tcctatcagt	tatgccaacg	gaagcggcct	cgacgaacgc	ccctactgct	1800
ggcactaccc	tccaagacct	tgtggcattg	tgcccgcaaa	gagcgtgtgt	ggcccgggat	1860
attgcttcc	tcccagcccc	gtggtgggtg	gaacgaccga	caggtcgggc	gcgcctacct	1920
acagctgggg	tgcaaatgat	acggatgtct	tcgtccttaa	caacaccagg	ccaccgtggg	1980
gcaattgggt	cggttgctacc	tggatgaact	caactggatt	caccaaagtg	tgccggagcgc	2040
ccccttgtgt	catcggaggg	gtgggcaaca	acaccttgct	ctgccccact	gattgcttcc	2100
gcaaacatcc	ggaagccaca	tactctcggt	gcggctccgg	tccttggatt	acaccaggt	2160
gcatgggoga	ctaccgctat	aggctttggc	actatccttg	taccatcaat	tacacatat	2220
tcaaagtccg	gatgtacgtg	ggaggggtcg	agcacaggct	ggaagcggcc	tgcaactgga	2280
cgcggggcga	acgtgtgat	ctggaagaca	gggacaggtc	cgagctcagc	ccgttgtctg	2340
gtccaccac	acagtggcag	gtccttccgt	gtctttccac	gacctgcca	gccttgtcca	2400
ccggcctcat	ccacctccac	cagaacattg	tggacgtgca	gtacttgtac	ggggtagggg	2460
caagcatcgc	gtcctggggc	attaagtggg	agtacgtcgt	tctcctgttc	cttctgcttg	2520
cagacgcgcg	cgtctgctcc	tgcttgggga	tgatgttact	catatcccaa	gcggaggcgg	2580
ctttggagaa	cctcgtaata	ctcaatgcag	catccctggc	cgggacgcac	ggtcttgtgt	2640
ccttctcgt	gttcttctgc	tttgcgtggg	atctgaaggg	taggtgggtg	cccggagcgg	2700
tctacgcct	ctacgggatg	tggcctctcc	tcctgctcct	gctggcgttg	cctcagcggg	2760
cataccact	ggacacggag	gtggcgcgct	cgtgtggcgg	cgttgttctt	gtcgggtaa	2820
tggcgtgac	tctgtcgcca	tattacaagc	gctatatcag	ctgggtgcag	tggtggcttc	2880
agtattttct	gaccagagta	gaagcgcaac	tgacgtgtg	ggttcccccc	ctcaacgtcc	2940
ggggggggcg	cgatgccgtc	atcttactca	tgtgtgtagt	acaccgacc	ctgggtattg	3000
acatcaccaa	actactcctg	gccatcttcc	gacccctttg	gattcttcaa	gccagtttgc	3060
ttaaagtccc	ctacttctgt	cgcgttcaag	gccttctccg	gatctgcgcg	ctagcgcgga	3120

agatagccgg	aggtcattac	gtgcaaatgg	ccatcatcaa	gttagggggcg	cttactggca	3180
cctatgtgta	taaccatctc	accctcttcc	gagactgggc	gcacaacggc	ctgcgagatc	3240
tggccgtggc	tgtggaacca	gtcgtcttct	cccgaatgga	gaccaagctc	atcacgtggg	3300
gggcagatac	cgccgcgtgc	ggtgacatca	tcaacggctt	gcccgtctct	gcccgtaggg	3360
gccaggagat	actgcttggg	ccagccgacg	gaatggcttc	caaggggtgg	aggttgctgg	3420
cgcccatcac	ggcgtacgcc	cagcagacga	gaggcctcct	aggggtgtata	atcaccagcc	3480
tgactggccg	ggacaaaaac	caagtggagg	gtgaggcca	gatcgtgtca	actgctacc	3540
aaaccttct	ggcaacgtgc	atcaatgggg	tatgctggac	tgtctaccac	ggggccggaa	3600
cgaggacat	cgatcacc	aagggtcctg	tcatccagat	gtataccaat	gtggaccaag	3660
acctgtggg	ctggcccgt	cctcaaggtt	cccgtctatt	gacaccctgt	acctgcccgt	3720
cctcggacct	ttacctggtc	acgaggcacg	ccgatgtcat	tcccgtgcgc	cgccgaggtg	3780
atagcagggg	tagcctgctt	tcgccccggc	ccatctccta	cttgaaaggc	tcctcggggg	3840
gtccgtggt	gtgccccggc	ggacacgcgc	tgggcctatt	cagggccgcg	gtgtgcacc	3900
gtggagtggc	taaagcggtg	gactttatcc	ctgtggagaa	cctagggaca	accatgagat	3960
ccccggtgt	cacggacaac	tcctctccac	cagcagtgcc	ccagagcttc	caggtggccc	4020
acctgcatgc	tcaccaccggc	agcggtaaga	gcaccaaggt	cccggctgcg	tacgcagccc	4080
agggctacaa	ggtgttggg	ctcaaccct	ctgttctg	aacgtgggc	tttgggtctt	4140
acatgtccaa	ggcccatggg	ggtgatccta	atatcaggac	cggggtgaga	acaattacca	4200
ctggcagccc	catcacgtac	tcaccctacg	gcaagttcct	tgccgacggc	gggtgctcag	4260
gaggtgctta	tgacataata	atgtgtgacg	agtgccactc	cacggatgcc	acatccatct	4320
tgggcatcgg	cactgtcctt	gaccaagcag	agactgcggg	ggcgagactg	gttgtgctcg	4380
ccactgctac	ccctccgggc	tcctgctcctg	tgtcccctcc	taacatcgag	gaggttgctc	4440
tgtccaccac	cggagagatc	cccttttacg	gcaaggctat	ccccctcgag	gtgatcaagg	4500
ggggaagaca	tctcatcttc	tgccactcaa	agaagaagtg	cgacgagctc	gccgcgaagc	4560
tggtcgcatt	gggcatcaat	gcccgtggcct	actaccgcgg	tcttgacgtg	tctgtcatcc	4620
cgaccagcgg	cgatgttgtc	gtcgtgtcga	ccgatgctct	catgactggc	tttaccggcg	4680
acttcgactc	tgtgatagac	tgcaacacgt	gtgtcactca	gacagtcat	ttcagccttg	4740
acctacctt	taccattgag	acaaccacgc	tcccccagga	tgctgtctcc	aggactcaac	4800
gcccggggcag	gactggcagg	gggaagccag	gcatctatag	atgtgtggca	ccgggggagc	4860
gcccctccgg	catgttcgac	tcgtccgtcc	tctgtgagtg	ctatgacgcg	ggctgtgctt	4920
ggatgagcgt	cacgcccgcc	gagactacag	ttaggtacag	agcgtacatg	aacaccccgg	4980
ggcttcccgt	gtgccaggac	catcttgaat	tttgggaggg	cgtctttacg	ggcctcactc	5040
atatagatgc	ccacttttta	tcacagacaa	agcagagtgg	ggagaacttt	ccttacctgg	5100
tagcgtacca	agccaccgtg	tcgctagggg	ctcaagcccc	tcccccatcg	tgggaccaga	5160
tgtggaagtg	ttgatccgc	cttaaaccca	ccctccatgg	gccaacaccc	ctgctataca	5220
gactggggcg	tggtcagaat	gaagtacccc	tgacgcaccc	aatcaccaaa	tacatcatga	5280
catgcatgtc	ggccgacctg	gaggtcgtca	cgagcacctg	ggtgctcgtt	ggcggcgctc	5340
tggctgctct	ggccgcgtat	tgccctgtcaa	cagggtcgt	ggtcatagtg	ggcaggatcg	5400
tcttgtccgg	gaagccggca	attatacctg	acagggaggt	tctctaccag	gagttcgatg	5460
agatggaaga	gtgctctcag	cacttacctg	acatcgagca	agggatgatg	ctcgctgagc	5520
agttcaagca	gaaggccctc	ggcctcctgc	agaccgcgtc	ccgccatgca	gaggttatca	5580
ccccgtctgt	ccagaccaac	tggcagaaac	tcgaggctct	ttgggccaag	cacatgtgga	5640
atctcatcag	tgggatacaa	tacttggcgg	gcctgtcaac	gctgctcgtt	aaccccgcga	5700
ttgcttcatt	gatggctttt	acagctgccg	tcaccagccc	actaacctc	ggccaacc	5760
tcctctcaa	catattgggg	gggtgggtgg	ctgcccagct	cgccgcccc	ggcgccgcta	5820
ctgcctttgt	gggtgctggc	ctagctggcg	ccgccatcgg	cagcgttggg	ctggggaagg	5880
tcctcgtgga	cattcttgca	gggtatggcg	cggcgctggc	gggagctctt	gtagcattca	5940
agatcatgag	cggtgaggtc	ccctccacgg	aggacctggg	caatctgctg	cccgccatcc	6000
tctcgcctgg	agcccttgta	gtcgggtgtg	tctgcgcagc	aatactgcgc	cggcacgttg	6060
gcccggggcga	gggggcagtg	caatggatga	accggctaac	agccttcgcc	tcocggggga	6120
accatgtttc	cccacgcac	tacgtgccg	agagcagatg	agccgcccgc	gtcactcca	6180
tactcagcag	cctcactgta	accagctcc	tgaggcgact	gcatcagtg	ataagctcgg	6240
agtgtaaccac	tcctatgctc	ggttcctggc	taagggacat	ctgggactgg	atatgagagg	6300
tgctgagcga	ctttaagacc	tggctgaaag	ccaagctcat	gccacaactg	cctgggattc	6360
cctttgtgtc	ctgccagcgc	gggtataggg	gggtctggcg	aggagacggc	attatgcaca	6420
ctcgtgcca	ctgtggagct	gagatcactg	gacatgtcaa	aaacgggacg	atgaggatcg	6480
ctggctcctg	gacctgcagg	aacatgtgga	gtgggacgtt	cccattaac	gcctaccca	6540
cgggccctct	tactcccctt	cctgcgccga	actataagtt	cgcgctgtgg	aggggtctct	6600
cagaggaata	cgtggagata	agcgggtgg	gggacttcca	ctacgtatcg	ggtatgacta	6660
ctgacaatct	taaatgccc	tgccagatcc	catcgcccga	atctttcaca	gaattggacg	6720
gggtgcgcct	acacaggttt	gcgcccctt	gcaagccctt	gctgcgggag	gaggtatcat	6780
tcagagtagg	actccacgag	taccgggtgg	ggtcgcaatt	accttgcgag	cccgaaccgg	6840
acgtagccgt	gttgacgtcc	atgctcactg	atccctccca	tataacagca	gagggggccc	6900

ggagaagggt	ggcgagaggg	tcacccctt	ctatggccag	ctcctcggct	agccagctgt	6960
ccgctccatc	tctcaaggca	acttgcaccg	ccaaccatga	ctcccctgac	gccgagctca	7020
tagaggctaa	cctcctgtgg	aggcaggaga	tgggcggcaa	catcaccagg	gttgagtcag	7080
agaacaaagt	ggtgattctg	gactccttcg	atccgcttgt	ggcagaggag	gatgagcggg	7140
aggtctccgt	acctgcagaa	attctgcgga	agtctcggag	attcgcccgg	gccctgcccg	7200
tctgggcgcg	gccggactac	aacccccgc	tagtagagac	gtggaaaaag	cctgactacg	7260
aaccacctgt	ggtccatggc	tgcccgttac	cacctccacg	gtcccctcct	gtgcctccgc	7320
ctcggaaaaa	gcgtacggtg	gtcctcaccg	aatcaaccct	atctactgcc	ttggccgagc	7380
ttgccaccaa	aagttttggc	agctcctcaa	cttccggcat	tacggggcgac	aatacgacaa	7440
catcctctga	gcccgcacct	tctggctgcc	cccccgactc	cgacggttag	tcctattctt	7500
ccatgcccc	cctggagggg	gagcctgggg	atccggatct	cagcgacggg	tcatggctga	7560
cggtcagtag	tggggccgac	acggaagatg	tctgtgtctg	ctcaatgtct	tattcctgga	7620
caggcgcact	cgtcaccccg	tcgctgcg	aagaacaaaa	actgcccatc	aacgcactga	7680
gcaactcgtt	gctacgccat	cacaatctgg	tgtattccac	cacttcacgc	agtgcttgcc	7740
aaaggcagaa	gaaagtcaca	tttgacagac	tgcaagttct	ggacagccat	taccaggacg	7800
tgctcaagga	ggtcaaagca	gcggcgtcaa	aagtgaaggc	taacttgcta	tccgtagagg	7860
aagcttgacg	cctgacgccc	ccacattcag	ccaaatccaa	gtttggctat	ggggcaaaag	7920
acgtccgttg	ccatgccaga	aaggccgtag	cccacatcaa	ctccgtgtgg	aaagaccttc	7980
tggaagacag	tgtaacacca	atagacacta	ccatcatggc	caagaacgag	gttttctgcy	8040
ttcagcctga	gaaggggggt	cgtaagccag	ctcgtctcat	cgtgttcccc	gacctgggcy	8100
tgcgctgtg	cgagaagatg	gccctgtacg	acgtggtttag	caagctcccc	ctggccgtga	8160
tgggaagctc	ctacggattc	caatactcac	caggacagcg	ggttgaattc	ctcgtgcaag	8220
cgtggaagtc	caagaagacc	ccgatgggggt	tctcgtatga	taccgcgtgt	tttgactcca	8280
cagctactga	gagcgacatc	cgtacggagg	aggcaattta	ccaatgttgt	gacctggacc	8340
cccaagcccg	cgtggccatc	aagtccctca	ctgagaggct	ttatggtggg	ggccctctta	8400
ccaattcaag	gggggaaaaac	tcgcgctacc	gcaggtgccg	cgcgagcggc	gtactgacaa	8460
ctagctgtgg	taacaccctc	acttgctaca	tcaaggcccc	ggcagcctgt	cgagccgcag	8520
ggctccagga	ctgcaccatg	ctcgtgtgtg	gcgacgactt	agtcgttatc	tgtgaaagtg	8580
cgggggtcca	ggaggacgcy	gcgagcctga	gagccttcac	ggaggctatg	accagggtact	8640
ccgccccccc	cggggaccccc	ccacaaccag	aatacgactt	ggagcttata	acatcatgct	8700
cctccaacgt	gtcagtcgcc	cacgacggcg	ctggaaagag	ggtctactac	cttaccctgtg	8760
acctacaac	ccccctcgcy	agagccgcyt	gggagacagc	aagacacact	ccagtcaatt	8820
cctggctagg	caacataatc	atgtttgccc	ccacactgtg	ggcgaggatg	atactgatga	8880
cccatttctt	tagcgtcctc	atagccaggg	atcagcttga	acaggctctt	aactgtgaga	8940
tctacggagc	ctgctactcc	atagaaccac	tggatctacc	tccaatcatt	caaagactcc	9000
atggcctcag	cgattttca	ctccacagtt	actctccagg	tgaaatcaat	aggggtggccg	9060
catgcctcag	aaaacttggg	gtcccgcctt	tgcgagcttg	gagacaccgg	gcccggagcg	9120
tccgcgctag	gcttctgtcc	agaggaggca	gggctgccat	atgtggcaag	tacctcttca	9180
actgggcagt	aagaacaaaag	ctcaaaactca	ctccaatagc	ggccgctggc	cggctggact	9240
tgtccggttg	gttcacggct	ggctacagcg	ggggagacat	ttatcacagc	gtgtctcatg	9300
cccggccccg	ctggtctctg	ttttgcctac	tctgtctcgc	tcaggggta	ggcatctacc	9360
tcttccccaa	ccgatgaagg	ttggggtaaa	cactccggcc	tcttaagcca	tttctctgtt	9420
tttttttttt	tttttttttt	tttttctttt	tttttttctt	tcctttctct	ctttttttcc	9480
tttctttttc	ccttctttaa	tggtagctcc	atcttagccc	tagtcacggc	tagctgtgaa	9540
aggtccgctga	gccgcatgac	tcagagagat	gctgatactg	gcctctctgc	agatcatgt	9599

Annexe F Polyprotéine du VHC

LOCUS NP_671491 3011 aa linear VRL 29-JUN-2005
 DEFINITION polyprotein [Hepatitis C virus].
 ACCESSION NP_671491
 VERSION NP_671491.1 GI:22129793
 DBSOURCE REFSEQ: accession [NC_004102.1](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE Hepatitis C virus
 ORGANISM [Hepatitis C virus](#)
 Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Flaviviridae;
 Hepacivirus.
 REFERENCE 1 (residues 747 to 809)
 AUTHORS Carrere-Kremer,S., Montpellier-Pala,C., Cocquerel,L., Wychowski,C.,
 Penin,F. and Dubuisson,J.
 TITLE Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of
 hepatitis C virus
 JOURNAL J. Virol. 76 (8), 3720-3730 (2002)
 PUBMED [11907211](#)
 REFERENCE 2 (residues 1 to 3011)
 AUTHORS Kolykhalov,A.A., Agapov,E.V., Blight,K.J., Mihalik,K.,
 Feinstone,S.M. and Rice,C.M.
 TITLE Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with
 transcribed RNA
 JOURNAL Science 277 (5325), 570-574 (1997)
 PUBMED [9228008](#)
 REFERENCE 3 (residues 1 to 3011)
 AUTHORS .

CONSRTM NCBI Genome Project
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-AUG-2002) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA

REFERENCE 4 (residues 1 to 3011)
 AUTHORS Kolykhalov,A.A. and Rice,C.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-JUN-1997) Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Ave., St. Louis, MO 63110-1093, USA

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AAB66324](#).
 The mature peptides have been annotated by the NCBI staff using the data from current literature as well as other annotations available for this virus.
 Method: conceptual translation.

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..3011 /organism="Hepatitis C virus" /serotype="1a" /isolate="H77" /db_xref="taxon: 11103 " /note="assembled from cDNA library representing a population of Hepatitis C virus genomes; viable virus can be reconstituted from this sequence"
Protein	1..3011 /product="polyprotein" /mol_wt=327058
mat_peptide	1..191 /product="core protein" /note="cleaved from polyprotein by signal peptidase; further processed to loose the C-terminal signal peptide and thereby to be released (as a smaller protein, p19c) from the endoplasmic reticulum membrane; viral capsid protein; reportedly involved in diverse processes, e.g. viral morphogenesis or regulation of host gene expression; p21c" /protein_id=" NP_751919.1 " /db_xref="GI: 26053621 " /mol_wt=20766
mat_peptide	192..383 /product="E1 protein" /note="product of cellular signal peptidase; forms a heterodimer with the E2 protein; viral envelope protein" /protein_id=" NP_751920.1 " /db_xref="GI: 26053622 " /mol_wt=20895
mat_peptide	384..746 /product="E2 protein" /note="product of cellular signal peptidase; forms a heterodimer with the E1 protein; viral envelope protein" /protein_id=" NP_751921.1 " /db_xref="GI: 26053623 " /mol_wt=40027
mat_peptide	747..809 /product="p7 protein" /note="product of cellular signal peptidase; integral membrane polypeptide; has a double membrane-spanning topology, with both its N and C termini oriented toward the extracellular environment" /protein_id=" NP_751922.1 " /db_xref="GI: 26053624 " /mol_wt=7018

[mat_peptide](#) 810..1026
 /product="NS2 protein"
 /note="N-terminus is cleaved by a cellular signal peptidase; C-terminus is produced by the only known cleavage event mediated by the NS2-NS3 metal-dependent proteinase; membrane protein with 2 internal signal sequences; suggested type III membrane topology protein; inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis"
 /protein_id="[NP_751923.1](#)"
 /db_xref="GI:26053625"
 /mol_wt=24054

[mat_peptide](#) 1027..1657
 /product="NS3 protease/helicase"
 /note="N-terminus is produced by the only cleavage in HCV polyprotein mediated by the NS2-NS3 metal-dependent proteinase; cleaves itself at the C-terminus; with the help of NS4A, mediates processing of all the other HCV non-structural proteins; physically and functionally interacts with the NS5B RNA polymerase; susceptible to inhibition by the N-terminal cleavage products of substrate peptides"
 /protein_id="[NP_803144.1](#)"
 /db_xref="GI:28921568"
 /mol_wt=67255

[mat_peptide](#) 1658..1711
 /product="NS4A protein"
 /note="cofactor for the NS3 protease"
 /protein_id="[NP_751925.1](#)"
 /db_xref="GI:26053627"
 /mol_wt=5786

[mat_peptide](#) 1712..1972
 /product="NS4B protein"
 /note="membrane protein; negative regulator of the NS3-NS5B replication complex"
 /protein_id="[NP_751926.1](#)"
 /db_xref="GI:26053628"
 /mol_wt=27206

[mat_peptide](#) 1973..2420
 /product="NS5A protein"
 /note="phosphorylated; associated with interferon sensitivity"
 /protein_id="[NP_751927.1](#)"
 /db_xref="GI:26053629"
 /mol_wt=49032

[mat_peptide](#) 2421..3011
 /product="NS5B RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="[NP_751928.1](#)"
 /db_xref="GI:26053630"
 /mol_wt=65312

[CDS](#) 1..3011
 /locus_tag="HCVgpl"
 /coded_by="NC_004102.1:342..9377"
 /db_xref="GeneID:[951475](#)"

ORIGIN

```

1 mstnkpqqrk tkrntnrrpq dvkfpqggqi vggvylprrr gprlgvratr ktsersqprg
61 rrpqpkarr pegrtwaqpg ypwplyneg cgwagwllsp rgsrpswgpt dprrrsrnlq
121 kvidtltcgf adlmgyiply gaplggaara lahgvrvled gvnyatgnlp gcsfsiflla
181 llscitvpas ayqvrnssgl yhvtnpcpns sivyeaada lhtpgcvpcv regnasrcwv
241 avtptvatrd gklpttqlrr hidllvgsat lcsalyvgdl cgsvflvgql ftfsprrhwt
301 tqdcncsiyp ghithrmaw dmmmnwspta alvvaqlrri pqaimdmiag ahwgvlagia
361 yfsmvgnwak vlvvlllfag vdaethvtgg sagrttaglv glltpgakqn iqlintngsw
421 hinstalnnc eslntgwlag lfyqhkfnss gcperlascr rltdfagqwg pisyangsgl
481 derpycwhyp prpcgivpak svcgpyvcft pspvvvgttdd rsgaptyswg andtdvfvln

```


Chapitre 5 Références bibliographiques

- Akira, S. and Hemmi, H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*, **85**, 85-95.
- Alter, H.J. and Seeff, L.B. (2000) Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis*, **20**, 17-35.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431**, 350-355.
- Banerjee, D. and Slack, F. (2002) Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays*, **24**, 119-129.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- Bartenschlager, R. (2002) In vitro models for hepatitis C. *Virus Res*, **82**, 25-32.
- Bartenschlager, R. and Lohmann, V. (2000) Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, **81**, 1631-1648.
- Batallan, A., Faucher, P., Poncelet, C., Demaria, F., Benifla, J.L. and Madelenat, P. (2003) [Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: recent news about the benefit of caesarean sections]. *Gynecol Obstet Fertil*, **31**, 964-968.
- Baulcombe, D.C. (1996) RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, **32**, 79-88.
- Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M. and Jeang, K.T. (2005) Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, **22**, 607-619.

- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and Gorlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, **10**, 185-191.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, **113**, 25-36.
- Carmell, M.A. and Hannon, G.J. (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 214-218.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, **16**, 2733-2742.
- Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. and Hammond, S.M. (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, **16**, 2491-2496.
- Chang, J., Provost, P. and Taylor, J.M. (2003) Resistance of human hepatitis delta virus RNAs to dicer activity. *J Virol*, **77**, 11910-11917.
- Chapman, E.J., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*, **18**, 1179-1186.
- Chen, K.S., Manian, P., Koeuth, T., Potocki, L., Zhao, Q., Chinault, A.C., Lee, C.C. and Lupski, J.R. (1997) Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat Genet*, **17**, 154-163.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **436**, 740-744.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9578-9582.
- Choo, Q.L., Weiner, A.J., Overby, L.R., Kuo, G., Houghton, M. and Bradley, D.W. (1990) Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull*, **46**, 423-441.
- Cogoni, C. and Macino, G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 638-643.
- Cogoni, C., Romano, N. and Macino, G. (1994) Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **65**, 205-209.
- Contreras, X., Bennasser, Y., Chazal, N., Moreau, M., Leclerc, C., Tkaczuk, J. and Bahraoui, E. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production. *Virology*, **332**, 316-328.
- Corbin, V. and Maniatis, T. (1989) Role of transcriptional interference in the *Drosophila melanogaster* *Adh* promoter switch. *Nature*, **337**, 279-282.
- Diaz-Guerra, M., Rivas, C. and Esteban, M. (1997) Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology*, **236**, 354-363.

- Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M. and Glenn, J.S. (2004) An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol*, **78**, 11393-11400.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F. and Bowman, J.L. (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol*, **13**, 1768-1774.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S.M. and Gale, M., Jr. (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, **300**, 1145-1148.
- Friebe, P. and Bartenschlager, R. (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*, **76**, 5326-5338.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. and Bartenschlager, R. (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol*, **75**, 12047-12057.
- Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R. and Katze, M.G. (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, **230**, 217-227.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Gil, J. and Esteban, M. (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, **5**, 107-114.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**, 235-240.
- Gwack, Y., Kim, D.W., Han, J.H. and Choe, J. (1996) Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 654-659.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001a) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A. and Hannon, G.J. (2001b) Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, **2**, 110-119.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. and Kim, V.N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, **18**, 3016-3027.
- He, L. and Hannon, G.J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, **5**, 522-531.
- Honda, M., Ping, L.H., Rijnbrand, R.C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D. and Lemon, S.M. (1996) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*, **222**, 31-42.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **297**, 2056-2060.
- Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1994) Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10502-10506.
- Ishido, S., Fujita, T. and Hotta, H. (1998) Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 35-40.
- Ishizuka, A., Siomi, M.C. and Siomi, H. (2002) A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*, **16**, 2497-2508.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jin, P., Zarnescu, D.C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T.A., Nelson, D.L., Moses, K. and Warren, S.T. (2004) Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci*, **7**, 113-117.
- Johnston, R.J. and Hobert, O. (2003) A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **426**, 845-849.
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J., Que, Q. and Napoli, C.A. (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol*, **31**, 957-973.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. (1990) Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9524-9528.
- Khandjian, E.W. (1999) Biology of the fragile X mental retardation protein, an RNA-binding protein. *Biochem Cell Biol*, **77**, 331-342.
- Khu, Y.L., Tan, Y.J., Lim, S.G., Hong, W. and Goh, P.Y. (2004) Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoproteasome, and affects its proteasome activity. *Biochem J*, **384**, 401-409.
- Kim, D.W., Gwack, Y., Han, J.H. and Choe, J. (1995) C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **215**, 160-166.
- Knight, S.W. and Bass, B.L. (2002) The role of RNA editing by ADARs in RNAi. *Mol Cell*, **10**, 809-817.
- Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Tahbaz, N., Hobman, T.C. and Filipowicz, W. (2005) Human dicer: purification, properties, and interaction with PAZ PIWI domain proteins. *Methods Enzymol*, **392**, 316-336.
- Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M.J., Stevens, C.E. and et al. (1989) An assay for

- circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, **244**, 362-364.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, **294**, 853-858.
- Lai, E.C. (2003) microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Curr Biol*, **13**, R925-936.
- Lan, S., Wang, H., Jiang, H., Mao, H., Liu, X., Zhang, X., Hu, Y., Xiang, L. and Yuan, Z. (2003) Direct interaction between alpha-actinin and hepatitis C virus NS5B. *FEBS Lett*, **554**, 289-294.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 858-862.
- Lecellier, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A. and Voinnet, O. (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, **308**, 557-560.
- Lee, R.C. and Ambros, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*, **23**, 4051-4060.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P. and Wang, X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, **301**, 1921-1925.
- Lohmann, V., Korner, F., Herian, U. and Bartenschlager, R. (1997) Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol*, **71**, 8416-8428.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110-113.
- Lu, S. and Cullen, B.R. (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol*, **78**, 12868-12876.
- Lugli, G., Larson, J., Martone, M.E., Jones, Y. and Smalheiser, N.R. (2005) Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem*, **94**, 896-905.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**, 95-98.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Kay, M.A. (2002) RNA interference in adult mice. *Nature*, **418**, 38-39.

- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, **15**, 185-197.
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, **431**, 343-349.
- Moradpour, D., Bieck, E., Hugle, T., Wels, W., Wu, J.Z., Hong, Z., Blum, H.E. and Bartenschlager, R. (2002) Functional properties of a monoclonal antibody inhibiting the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*, **277**, 593-601.
- Moradpour, D. and Blum, H.E. (1999) Current and evolving therapies for hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **11**, 1199-1202.
- Moss, E.G., Lee, R.C. and Ambros, V. (1997) The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell*, **88**, 637-646.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Otsuka, M., Kato, N., Moriyama, M., Taniguchi, H., Wang, Y., Dharel, N., Kawabe, T. and Omata, M. (2005) Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology*, **41**, 1004-1012.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J.A. (2002) RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell*, **9**, 315-327.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425**, 257-263.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T. (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, **304**, 734-736.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. and Bartenschlager, R. (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*, **76**, 4008-4021.
- Polson, A.G., Crain, P.F., Pomerantz, S.C., McCloskey, J.A. and Bass, B.L. (1991) The mechanism of adenosine to inosine conversion by the double-stranded RNA unwinding/modifying activity: a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Biochemistry*, **30**, 11507-11514.
- Prabhu, R., Vittal, P., Yin, Q., Flemington, E., Garry, R., Robichaux, W.H. and Dash, S. (2005) Small interfering RNA effectively inhibits protein expression and negative strand RNA synthesis from a full-length hepatitis C virus clone. *J Med Virol*, **76**, 511-519.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frenthewey, D., Samuelsson, B. and Radmark, O. (2002) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J*, **21**, 5864-5874.
- Provost, P., Doucet, J., Hammarberg, T., Gerisch, G., Samuelsson, B. and Radmark, O. (2001) 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *J Biol Chem*, **276**, 16520-16527.

- Rand, T.A., Ginalski, K., Grishin, N.V. and Wang, X. (2004) Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14385-14389.
- Randall, G., Grakoui, A. and Rice, C.M. (2003) Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 235-240.
- Reed, K.E. and Rice, C.M. (2000) Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*, **242**, 55-84.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**, 901-906.
- Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin i, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L. and Weiner, A. (1998) Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol*, **143**, 2493-2503.
- Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, **6**, 3343-3353.
- Rosenberg, S. (2001) Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol*, **313**, 451-464.
- Samuel, C.E. (1991) Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*, **183**, 1-11.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S. and Shimizu, N. (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics*, **82**, 323-330.
- Sharp, P.A. (2001) RNA interference--2001. *Genes Dev*, **15**, 485-490.
- Sharp, P.A. and Zamore, P.D. (2000) Molecular biology. RNA interference. *Science*, **287**, 2431-2433.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*, **5**, 659-669.
- Smith, D.B. and Simmonds, P. (1997) Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J Mol Evol*, **45**, 238-246.
- Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2005) Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, **122**, 9-12.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W. and Hobman, T.C. (2004) Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep*, **5**, 189-194.
- Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Hidajat, R., Tanaka, M., Mizuta, H. and Hotta, H. (2004) Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol*, **48**, 591-598.

- Tan, S.L. and Katze, M.G. (2001) How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, **284**, 1-12.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*, **17**, 49-63.
- Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N. and Lai, M.M. (1999) Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, **285**, 107-110.
- Tian, J., Liu, J., He, W., Hu, Z., Yao, X. and Chen, X. (2004) Probing the binding of scutellarin to human serum albumin by circular dichroism, fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling method. *Biomacromolecules*, **5**, 1956-1961.
- Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R. and La Monica, N. (1993) NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol*, **67**, 4017-4026.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. and Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **66**, 1476-1483.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J. and Tanaka Hall, T.M. (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, **115**, 799-811.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. and Liang, T.J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, **11**, 791-796.
- Wall, N.R. and Shi, Y. (2003) Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet*, **362**, 1401-1403.
- Wang, C., Sarnow, P. and Siddiqui, A. (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol*, **67**, 3338-3344.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sanger, H.L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**, 567-576.
- Wejstal, R. (1999) Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol*, **31 Suppl 1**, 92-95.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.G., Dammacco, F., Rice, C.M., Blum, H.E. and Moradpour, D. (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol*, **74**, 2293-2304.
- Ye, K., Malinina, L. and Patel, D.J. (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, **426**, 874-878.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**, 3011-3016.
- Zamore, P.D. (2004) Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA. *Curr Biol*, **14**, R198-200.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.

- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E. and Filipowicz, W. (2002) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J*, **21**, 5875-5885.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. and Filipowicz, W. (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, **118**, 57-68.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T. and Chisari, F.V. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9294-9299.
- Zhou, F., Ma, Z.E., Hu, W., Feng, Z.L., Chen, K.L., Qin, G.M., Sun, Q., Liu, G., Liang, S., He, Y.X., Liu, S.Z., Ruan, Y.H. and Shao, Y.M. (2004) [Study on the relationship between hepatitis C virus infection and sharing injection equipment, sexual behavior among injecting drug users]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, **25**, 329-332.
- Zou, S., Forrester, L. and Giulivi, A. (2003) Hepatitis C update. *Can J Public Health*, **94**, 127-129.