HAL
open science

Détection de séquences d'ARN du VHC dans des extraits de moustiques du genre Aedes : Etude cinétique après infections expérimentales

Yassine Rechoum

To cite this version:

Yassine Rechoum. Détection de séquences d'ARN du VHC dans des extraits de moustiques du genre Aedes : Etude cinétique après infections expérimentales. Virologie. Université Joseph Fourier, 2009. Français. NNT : . tel-01192943

HAL Id: tel-01192943

https://theses.hal.science/tel-01192943

Submitted on 12 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNOLOGIES ET DE LA SANTE A GRENOBLE

Thèse

Présentée à l'Institut Pasteur à Paris pour obtenir le diplôme de Docteur de l'université Joseph Fourier – Grenoble I

École Doctorale de l'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement
Spécialisation : Biotechnologie et Santé

Par

Yassine RECHOUM

Détection de séquences d'ARN du VHC dans des extraits de moustiques du genre *Aedes* : Etude cinétique après infections expérimentales

Soutenue le 29 octobre 2009 devant la commission d'examen :

Dr. Anna-Bella Failloux	Rapporteur
Dr. Gilles Duverlie	Rapporteur
Pr. Renée Grillot	Examinateur
Dr. Jean-Claude Manuguerra	Examinateur
Pr. Emmanuel Drouet	Directeur de thèse

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNOLOGIES ET DE LA SANTE A GRENOBLE

Thèse

Présentée à l'Institut Pasteur à Paris pour obtenir le diplôme de Docteur de l'université Joseph Fourier – Grenoble I

École Doctorale de l'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement
Spécialisation : Biotechnologie et Santé

Par

Yassine RECHOUM

Détection de séquences d'ARN du VHC dans des extraits de moustiques du genre *Aedes* : Etude cinétique après infections expérimentales

Soutenue le 29 octobre 2009 devant la commission d'examen :

Dr. Anna-Bella Failloux	Rapporteur
Dr. Gilles Duverlie	Rapporteur
Pr. Renée Grillot	Examinateur
Dr. Jean-Claude Manuguerra	Examinateur
Pr. Emmanuel Drouet	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie chaleureusement les membres de Jury : Mesdames Renée Grillot et Anna-Bella Failloux, Messieurs Jean-Claude Manuguerra, Gilles Duverlie et Emmanuel Drouet, d'avoir accepté de consacrer de leur temps pour juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement Emmanuel Drouet qui a non seulement été pour moi un professeur mais aussi un directeur de Master puis de thèse, toujours disponible et efficace. Je le remercie pour toute la confiance et la liberté qu'il m'a accordées au cours de ces quelques années de travail.

Je remercie Jean-Claude Manuguerra de m'avoir accueilli dans son laboratoire, je le remercie pour son dévouement, son aide et ses précieux conseils, aussi bien pour les manips que pour la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie Anna-Bella Failloux de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, quand la chaleur et l'humidité n'étaient pas au rendez-vous, je la remercie pour ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie Florence Fouque pour son aide pour le lancement de ce projet et pour ses conseils pour la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie tout le personnel de Floralis SAS pour leur confiance et leur soutien sans failles, je pense tout particulièrement à Bruno Tillier, Eric et Anne-Sophie Larrey.

Un très grand merci à Ana-Maria Burguière pour son aide, son soutien et ses précieux conseils.

Je remercie Marie-Anne Petit pour sa collaboration et son aide.

Je remercie, du fond du cœur, tous les membres de la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence : India, Christophe, Amélie, Frédérique, Claudine, Gilberte, Marie-Dominique, Sayuri, Philippe, Meriadeg, Anne, Yolande et Fabienne pour la superbe ambiance, c'était un vrai plaisir de travailler avec vous. Je n'oublie pas le personnel du SAM : Valérie, Ingrid, Laurent et Alexandre.

Merci à tous les membres de l'Unité Génétique Moléculaire des Bunyavirus : Marie, Sara, Laurence et Estelle, pour votre accueil, votre aide et votre sympathie.

Je remercie Jennifer pour ton aide et ton acharnement, et Aure pour ton soutien et tes encouragements. Merci Marta !

Merci à tout le personnel de la PF8.

Merci au « Petit Nicolas ».

Encore merci à vous tous de m'avoir soutenu pendant ces années de thèse

A mes très chers parents,

à mes frères,

à mes sœurs

TABLE DES MATIERES

Liste des Figures _____ *4*

Liste des Tableaux _____ *6*

Abréviation _____ *7*

I. Introduction générale _____ *9*

II. Introduction _____ *13*

1. Paramètres épidémiologiques de l'infection virale C _____ **13**

a. Incidence _____ 14

b. Prévalence _____ 14

2. Modes de contamination _____ **15**

a. Transfusions _____ 15

b. Toxicomanie par voie intraveineuse _____ 15

c. Transmission sexuelle du VHC _____ 15

d. Transmission dans le contexte professionnel _____ 16

e. Autres modes de transmission _____ 16

3. Evolution de la maladie _____ **16**

a. La phase aigüe _____ 16

b. La phase chronique _____ 17

4. Biologie moléculaire du VHC _____ **19**

a. Morpho-structure du VHC _____ 19

b. Phylogénie et variation génomique _____ 27

c. Cycle viral du VHC et interaction virus – hôte _____ 29

d. Modèles d'études du VHC _____ 35

5. Réponse de l'hôte à l'infection virale _____ **38**

a. Les réponses innées _____ 40

b. Les réponses immunitaires adaptatives _____ 41

6. Traitement et antiviraux _____ **43**

7. Transmission des virus par les arthropodes : Notion d'arbovirus et d'arboviroses _____ **46**

a. Définitions _____ 46

b. La transmission de maladies _____ 47

c. Dynamique des maladies transmises par les arthropodes _____ 48

d. Les moustiques, en tant qu'arthropodes vecteurs _____ 49

e. Principales arboviroses transmises par les moustiques (183-185) _____ 50

III. Problématique et Objectifs du travail _____ *57*

IV. Matériels et méthodes ____ *58*

1. Détection de l'ARN viral ____ **58**

a. Mises au point de la détection et détermination du seuil de sensibilité ____ 58

b. Construction du témoin positif pour la quantification ____ 63

c. Transcription *in vitro* ____ 63

d. Détermination de la limite de sensibilité ____ 65

2. Infections expérimentales ____ **65**

a. Inoculum VHC ____ 65

b. Moustiques testés et conditions d'élévage ____ 66

c. Repas sanguin ____ 68

d. Séparation : tête / reste du corps ____ 69

3. Clonage des produits amplifiés ____ **70**

a. Protocole de clonage à façon : ____ 70

b. Protocole de clonage dans pCR II TOPO® ____ 71

c. Transformation bactérienne ____ 71

d. Analyse des produits de clonage ____ 71

4. Séquençage des produits amplifiés ____ **72**

5. Analyse des séquences ____ **72**

V. Résultats – 1ière partie ____ *76*

VI. Discussion – 1ière partie ____ *77*

VII. Résultats – 2ième partie ____ *79*

a. Mise au point de la méthode de détection ____ 79

b. résultats des infections expérimentales ____ 87

VIII. Discussion – 2ième partie ____ *104*

IX. Conclusion générale ____ *115*

IX. Bibliographie ____ *117*

Annexe 1 : Procédé d'amplification du VHC chez le moustique Aedes (Brevet 1) ____ *128*

Annexe 2 : Mutations dans la protéine NS5B du VHC (Brevet 2) ____ *150*

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

(V : verso)

Figure 1 : Origines des hépatites 12V
Figure 2 : Prévalence du VHC dans le monde (OMS – 1999). 13V
Figure 3 : Modes de contamination par le VHC. 14V
Figure 4 : Stades d'évolution de l'infection par le VHC 15V
Figure 5 : Organisation des génomes des *Flaviviridae*. 18V
Figure 6 : Organisation génomique du VHC.. ..... 18V
Figure 7 : La structure II^{aire} de la région 5'NTR du génome du VHC et modèle de formation du complexe d'initiation 80S. 19V
Figure 8 : Modèle de comportement des domaines transmembranaires (TM) de E1 et E2 ..... 21V
Figure 9 : Répartition géographique des principaux génotypes et sous-types du VHC. 26V
Figure 10 : Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du HCV et leur répartition dans le monde. 26V
Figure 11 : Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du VHC. 27V
Figure 12 : Comparaison par analyse phylogénétique des séquences de la RdRp du VHC, GBV, des *Pestivirus et des Flavivirus.* 27V
Figure 13 : Cycle cellulaire du VHC.. 28
Figure 14 : Les principaux acteurs impliqués dans l'entrée du VHC dans les cellules hôtes. 28
Figure 15 : Protéines du VHC. 32
Figure 16 : Comparaison des différents systèmes de réplicons.. ..... 35V
Figure 17 : Caractéristiques virologiques et immunologiques d'une infection à VHC à résolution spontanée.. ..... 37V
Figure 18 : Caractéristiques virologiques et immunologiques d'une infection persistante.. ..... 38V
Figure 19 : Diagramme montrant comment les interactions VHC – cellule-hôte. 39
Figure 20 : Le cycle viral et les principales voies de défense cellulaire. 39V
Figure 21 : Carte de la séquence de E1 reconnue par l'anticorps D32.10. ..... 41V
Figure 22 : Carte de la séquence de E2 reconnue par l'anticorps D32.10.. ..... 41V
Figure 23 : Représentation schématique du cycle du VHC. 42V
Figure 24 : Les différents mécanismes proposés pour l'action antivirale de la ribavirine.. ..... 43V
Figure 25 : Cycle des arboviroses. 45V
Figure 26 : les arbovirus alternent au moins deux hôtes : un vertébré et un arthropode. 46V
Figure 27 : Barrières supposées dans une infection par un arbovirus. 47V
Figure 28 : Les étapes nécessaires à l'infection et la transmission d'un Flavivirus par le moustique. 48V
Figure 29 : Cycle de vie du moustique. 48V
Figure 30 : Cycle d'absorption et de transmission des Flavivirus transmis par les moustiques. 51V
Figure 31 : Principe de la technique WTA. 59V
Figure 32 : Différentes étapes de construction du transcrit 62V
Figure 33 : Schéma général des étapes du protocole d'infection. 64V
Figure 34 : Dispositif des infections expérimentales. 65V
Figure 35 : Etude de l'effet inhibiteur des anticorps D32.10 et D4.12.9 sur l'adsorption du VHC sur les cellules cibles. 77V
Figure 36 : Préparation du transcrit.. ..... 78V
Figure 37 : Screening sur colonies.. ..... 79V
Figure 38 : Carte du vecteur pCRII©-TOPO contenant la séquence de l'IRES du VHC.. 80
Figure 39 : Détermination de l'orientation de l'insert. 80
Figure 40 : Test de l'efficacité de la qPCR. 81
Figure 41 : Vérification de la qualité du transcrit.. ..... 81V
Figure 42: Test de l'efficacité de transcription.. ..... 81V
Figure 43: Efficacité de la transcription. 82V
Figure 44 : Choix du mode d'extraction (manuel/automatique).. ..... 83V
Figure 45 : Choix du kit d'extraction.. ..... 83V

Figure 46 : Choix du kit du d'amplification par qRT-PCR.. ..... 84V
Figure 47 : Optimisation de la concentration des amorces.. ..... 84V
Figure 48 : Optimisation de la concentration de la sonde..... 85
Figure 49 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par WTA.. ..... 85V
Figure 50 : Détection de l'ARN viral – Campagne d'infection 2005..... 87V
Figure 51 : Détection de l'ARN viral dans les moustiques du genre *Aedes* – Campagne d'infection 2006. ..... 88V
Figure 52 :. Détection de l'ARN viral dans les moustiques du genre *Culex* – Campagne d'infection 2006. ..... 88V
Figure 53 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des clones transformés..... 89V
Figure 54 : Alignement des séquences nucléotidiques obtenues après séquençage des fragments de NS5B à J21. 90
Figure 55 : Séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21..... 90V
Figure 56 : Alignement des séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21. 91
Figure 57 : Séquences consensus en acides aminés obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21. 91
Figure 58 : Alignement des séquences en acides aminés obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21..... 91
Figure 59 : Détection de l'ARN du VHC dans les corps des moustiques (infectés) à J0 ..... 91V
Figure 60 : Détection de l'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par la de WTA..... 91V
Figure 61 : Détection de l'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par la de WTA..... 92V
Figure 62 : Détection de l'ARN du VHC après amplification par WTA dans les têtes des moustiques (infectés) à J0..... 92V
Figure 63 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC par PCR dans les échantillons amplifiés par WTA. 93
Figure 64 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur l'échantillon 210T..... 93V
Figure 65 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur les échantillons 208C, 209C et 212C..... 93V
Figure 66 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur l'échantillon 210C..... 94V
Figure 67 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur les échantillons 210T, 210C et 212C.. ..... 94V
Figure 68 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des clones transformés..... 95
Figure 69 : Séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de l'IRES à J0 et J15 après infection. 95
Figure 70 : Alignement des séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de l'IRES à J0 et J15 après infection.. 95V
Figure 71 : Structure tridimensionnelle de l'IRES du VHC montrant les positions des mutations apparues à 15 JPI..... 96
Figure 72 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des colonies ayant intégré la séquence amplifiée par le couple d'amorces 7a-f / 7a-r..... 96
Figure 73 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des clones ayant intégré les séquences amplifiées par le couple d'amorces 7a-f / 7a-r... 96
Figure 74 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits amplifiés par PCR en utilisant les amorces PR1 et PR2..... 96V
Figure 75 : Alignement de la séquence en acides aminés d'un fragment de la NS5B obtenu dans un moustique à 15 JPI..... 96V
Figure 76 : Estimation de l'effet inhibiteur de l'extrait de moustiques sur la détection de l'ARN du VHC. 97
Figure 77 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC par RT-PCR en deux étapes..... 98V
Figure 78 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC par RT-PCR en deux étapes..... 98V
Figure 79 : Confirmation de la présence d'ARN viral négatif dans les échantillons à J0 par RT-qPCR en deux étapes.. ..... 99V
Figure 80 : Mise au point de la WTA spécifique au VHC (HCV-GA) et détection de l'ARN viral. 99V
Figure 81 : Confirmation par séquençage de la présence d'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par RT-PCR.. 100
Figure 82 : Confirmation par séquençage de la présence d'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par RT-PCR.. 100
Figure 83 : Confirmation par séquençage de la présence d'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par RT-PCR.. ..... 100V
Figure 84 : Détection de l'ARN du VHC après HCV-GA.. ..... 100V
Figure 85 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% montrant la détection de l'ARN du VHC après HCV-GA.. ..... 101V
Figure 86 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% montrant la détection de l'ARN du VHC après HCV-GA.. ..... 101V
Figure 87 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% montrant la détection de l'ARN du VHC après HCV-GA.. 102
Figure 88 : Superposition de la localisation des souches endémiques du VHC et la distribution de différents vecteurs de maladies. 103V
Figure 89 : Paramètres optimisés pour la détermination du seuil de détection de l'ARN du VHC.. ..... 105V
Figure 90 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la NS5B du VHC et des mutations Alanine dirigées.. ..... 107V
Figure 91 : Cinétique d'infection d'*Aedes vexans* par le VHC.. ..... 110V
Figure 92 : Schéma explicatif de la notion d'alternance supposée dans le cas du VHC.. .....113V

LISTE DES TABLEAUX

(V : verso)

Tableau 1: Estimation de la prévalence de l'infection par le VHC et le nombre d'infectés dans le monde par régions (OMS – 1999) 13V
Tableau 2 : Les principaux virus enregistrés associés à des arthropodes 45V
Tableau 3 : Les principales maladies transmissibles par les moustiques dues aux Flavivirus et Alphavirus 51V
Tableau 4 : Travaux expérimentaux réalisés pour tester la compétence des moustiques pour le VHC 56V
Tableau 5: Protocole d'amplification par (q)RT-PCR One-step ou (q)PCR. A) composition du « mix » réactionnel. B) conditions des cycles. 58V
Tableau 6: Protocole d'amplification par RT-PCR en deux étapes. 58V
Tableau 7 : Protocole d'amplification par RT-PCR en deux étapes. 58V
Tableau 8: Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 59V
Tableau 9 : Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 59V
Tableau 10 : Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 61
Tableau 11 : Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 61
Tableau 12: Amorces spécifiques sélectionnées pour l'amplification par HCV-GA 61
Tableau 13 : Combinaison des amorces utilisées dans la PCR dissymétique 62V
Tableau 14 : Protocole d'amplification par PCR dissymétrique. 62V
Tableau 15 : Interprétation des résultats de la PCR dissymétrique et déduction de l'orientation de l'insert 63V
Tableau 16 : Composition du mix de digestion 63V
Tableau 17 : Composition du mix de la transcription 63V
Tableau 18 : Composition du « mix » de la digestion par la turbo DNase 63V
Tableau 19 : Récapitulatif des conditions d'infection pour les 4 campagnes 67V
Tableau 20 : Liste des couples d'amorces ayant servi pour l'infection expérimentale n°3 ..... 72V
Tableau 21 : Liste des couples d'amorces ayant servi pour l'infection expérimentale n°4 73
Tableau 22 : Liste des amorces utilisées pour la détection de l'ARN du VHC 73V
Tableau 23 : Interprétation des résultats de la PCR dissymétrique et déduction de l'orientation de l'insert 81
Tableau 24 : Seuil de détection de la région 5'NTR du VHC par prise d'essai de 4µl et test de présence d'inhibiteurs 81V
Tableau 25 : Détermination du seuil de détection en fonction du ratio de concentration ([Extrait]/[ARN]). 82V
Tableau 26 : Récapitulatif des conditions d'élevage et résultats des infections 86V
Tableau 27 : Résultats de l'expérience 1 ..... 87V
Tableau 28 : Résultats de l'expérience 2 ..... 89V
Tableau 29 : Résultats de l'expérience 3 93
Tableau 30 : Les zones amplifiées du génome du VHC dans les échantillons positifs à 15 jours après infection. 93V
Tableau 31 : Résultats de l'expérience 4 97
Tableau 32 : Les zones amplifiées du génome du VHC dans les échantillons positifs à 30 jours après infection. 102

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

- 3'NTR/UTR : région 3' non codante (non translated ou untranslated region)
- 5'NTR/UTR : région 5' non codante (non translated ou untranslated region)
- AcN : Anticorps neutralisant
- ALP : ApoLipoProtéine
- ALT : Alanine aminotransférase ou Alanine transaminase (ALanine Transaminase)
- Anti-HBc : Anticorps anti-capside du VHB (Anti-Hepatitis B Capside)
- ARFP : Protéine du décalage alternatif du cadre de lecture (Alternative Reading Frameshift Protein)
- Blast : Outil basic de recherche d'alignement local (Basic Local Alignment Search Tool)
- BVDV : Virus de la diarrhée bovine (Bovine Viral Diarrhea Virus)
- Cd81 : Cluster de differentiation 81 (Cluster of differentiation 81)
- CDS : Séquence codante (CoDing Sequence)
- CLDN : Claudine
- CSFV : Virus du choléra des porcs (Classical Swine Fever Virus)
- DC-SIGN : Molécule d'adhésion intercellulaire 3-grabbing non-integrin spécifique des cellules dendritiques (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)
- DENV : Virus de la Dengue
- DH : Dengue Hémorragique
- DSC : Dengue avec Syndrôme de Choc
- FVR : Fièvre de la Vallée du Rift
- GBV (GBV-A, GBV-B, GBV-C) : Virus de l'Hépatite G (A, B, C).
- GFP : Protéine de fluorescence verte (Green Fluorescent Protein)
- GSP : Amorces spécifiques (Gene Specific Primers)
- HCV : VHC (Hepatitis C Virus)
- HCV-LP : Particules ressemblant au VHC (HCV Like-Particles)
- HCVpp : Pseudo-particules du VHC (HCV Pseudo-Particles)
- HDL : Lipoprotéine de haute densité (High density lipoprotein)
- Ifn : interféron
- ICAM : Molécule d'adhésion intracellulaire (Intercellular Adhesion Molecule)
- IRF : Facteur de régulation de l'interféron (Interferon regulatory factor)
- ISG : Gènes induits par l'interféron (Interferon Stimulated Genes)
- JAK-STAT Pathway: voie impliquant les Kinases Janus et/ou les transducteurs de signal et les activateurs de transcription (Janus Activated Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway)
- KB : Kilo base
- LDL : Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)
- LPL : LipoProtéines Lipase

- L-SIGN : ICAM-3 grabbing non-integrin spécifique de foie / du ganglion lymphatique foie ganglionnaire-ICAM-3 (liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing non-integrin)
- Mir, MiRNA : micro-ARN (micro-RNA)
- MLV : Virus de la leucémie murine (Murine Leukemia Virus)
- NANB : non-A non-B
- Ntd : nucléotide
- ORF : Cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame)
- pb : paire de base
- PBH : Ponction biopsie hépatique
- PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate Buffer Salin)
- PCR : Réaction d'amplification en chaine (PolyChaine Reaction)
- PKR : Protéine kinase ARN double brin-dépendante (double stranded RNA-dependent Protein Kinase).
- Pol : ADN polymérase
- qPCR : PCR qualitative, PCR en temps réel (quantitative PCR)
- RdRp : ARN polymérase ARN dépendante
- RE : réticulum endoplasmique
- RT : rétro-transcription / transcription inverse / rétro-transcriptase (Reverse Transcription / Reverse Transcriptase)
- SAA : Sérum Amyloïde A
- SP : Protéase à sérine (Serin Protease)
- SPP : Signal Peptide Peptidase
- STAT-C : Thérapie antivirale spécifique dirigée contre le VHC (Specifically Targeted Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C)
- TBEV : Virus de l'encéphalite à tiques (Tick-Borne Encephalitis Virus)
- Ubi : ubiquitine
- VFJ : Virus de la Fièvre Jaune
- VHA : Virus de l'Hépatite A
- VHB : Virus de l'Hépatite B
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- VSL : Tige-boucle variable (Variable Stem Loop)
- WGA : Amplification du génome entier (Whole Genome Amplification)
- WNV : Virus du West Nile (West Nile Virus)
- WTA : Amplification du transcriptome entier (Whole Transcriptome Amplification)

INTRODUCTION GENERALE

I. INTRODUCTION GENERALE

Le Virus de l'Hépatite C (VHC) est à part dans le monde des virus pathogènes chez l'homme. En effet ce virus, longtemps englobé dans les agents des hépatites « non A non B », a de nombreuses caractéristiques « par défaut » : ce virus ne se cultive pas sur cellules, il n'existe pas de vaccin, les traitements antiviraux, basés sur des molécules intrinsèquement efficaces, ne parviennent pas à contrôler la maladie et le coût des thérapeutiques est très élevé. Au stade aigu, c'est-à-dire dans les étapes initiales de l'infection, celle-ci est asymptomatique dans l'immense majorité des cas. Enfin, les scientifiques n'arrivent pas à expliquer comment une fraction des sujets a pu être contaminée par ce virus. Tous ces éléments contrastent fortement avec ceux des autres virus des hépatites (VHA et VHB) au sujet desquels un grand nombre d'inconnues ont été levées (pas ou peu de chronicité chez le sujet infecté, vaccins efficaces, caractéristiques épidémiologiques clairement identifiées).

Nous pouvons admettre aisément que l'absence de vaccin prophylactique anti-VHC et la mauvaise compliance des patients traités sont en grande partie la conséquence de l'incapacité du virus à se répliquer sur cellules et, dans une moindre mesure, de la quasi-absence de modèle animal susceptible de reproduire la maladie (hépatite persistante). Ainsi, c'est seulement à l'aide de moyens moléculaires (réplicons, pseudo-particules virales), tentant tant bien que mal de « mimer » le virus authentique, que les chercheurs sont arrivés à expliquer certains fragments du cycle viral et occasionnellement à produire (laborieusement) des particules virales à partir de cellules transfectées. On peut, à ce stade, affirmer que l'essentiel des connaissances sur le VHC est basé sur des méthodes d'ingénierie moléculaire et cellulaire qui ont permis (i) de découvrir l'ARN viral (et non le virus authentique) en 1988 et secondairement de rattacher ce virus à une famille largement connue des virologues et des infectiologues, les *Flaviviridae* (ii) d'identifier progressivement – par analogie – son protéome et les propriétés des régions codantes et non codantes de son génome (iii) de définir une série de récepteurs cellulaires – mais sur des souches cellulaires très limitées, en général des lignées de cellules hépatiques (HepG2 ou Huh7) – et de caractériser les étapes-clés du cycle (traduction et réplication). Parallèlement à la connaissance du virus, les chercheurs (principalement les immunologistes) ont bien caractérisé la réponse immune aussi bien innée qu'adaptative chez l'hôte infecté. Il s'avère

que ce contrôle n'est que partiel (particulièrement dans les phases précoces qui suivent la contamination) et, globalement, il est maintenant admis que 10 à 20% des sujets seulement éliminent le virus à ce stade, alors que 80 à 90% des sujets restent infectés à vie, avec des risques de développer une hépatite chronique, voire une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. Ce contrôle relatif est dû (i) à des caractéristiques immunologiques : incapacité pour certains sujets de contrôler le virus à la phase précoce notamment *via* les effecteurs de l'immunité innée, exemple interférons, (ii) à des caractéristiques virologiques : forte mutabilité du virus, notamment sur les épitopes-cibles de l'immunité humorale et cellulaire, avec secondairement développement de multiples quasi-espèces chez l'individu infecté, potentiel immunosubversif de nombreuses protéines codées par le virus, mettant le virus « à l'abri » de la réponse de l'hôte.

Toutes ces caractéristiques font qu'actuellement l'incidence de l'infection augmente, et augmentera encore dans les décennies à venir (2050-2060). Seul élément positif, la contamination par transfusion sanguine et par usage de drogues intraveineuses est en régression constante grâce à la détection efficace des anticorps sériques et de la charge virale au niveau du sang (ARN). En effet c'est essentiellement par le sang que le virus est transmis, y compris par voie sexuelle.

Sur le plan épidémiologique, on distingue deux types de génotypes du VHC ; les génotypes « épidémiques » (1a, 1b, 2a, 2b, 2c and 3a), qui sont caractérisées par une distribution géographique assez large et des prévalences élevées, et les génotypes « endémiques » génotype 2 (2c a 2l) et génotype 4 (4b, 4c, 4e a 4m)) qui, à l'opposé, sont géographiquement plus confinés et leur prévalence assez faibles (1). Les analyses phylogénétiques de ces génotypes estiment « l'âge » du VHC entre 500 et 2000, ans indiquant que les souches endémiques étaient apparues depuis des siècles et circulaient chez l'homme bien avant l'introduction des injections à usage médical, de la chirurgie et des transfusions. Les génotypes épidémiques du VHC seraient à l'origine des génotypes endémiques qui ont été ensuite associés, vraisemblablement par hasard, aux réseaux efficaces de transmissions du XXe siècle (2, 3). Un argumentaire au sujet des moyens de transmission a été proposé pour expliquer la transmission endémique du VHC : circoncision, incisions rituelles, circoncision féminine et mutilations génitales, acuponcture (4). Toutefois, même si ces pratiques peuvent contribuer, jusqu'à un certain degré, à la transmission du VHC dans les régions où elles sont

pratiquées, la persistance de l'endémicité du VHC à travers les siècles et les continents nécessite des mécanismes de transmission ubiquitaires et plus généralement distribués (3). Certains auteurs commencent par admettre d'autres moyens de transmission, notamment la possibilité de transmission par les arthropodes. Cette hypothèse suppose évidemment que certains arthropodes puissent être compétents pour le VHC et établir un cycle viral complet de l'ingestion jusqu'à l'excrétion par les glandes salivaires, pour une transmission horizontale, ou vers les œufs pour une transmission verticale. Dans le début des années 2000, notre laboratoire s'était intéressé à l'interaction entre le VHC et les cellules de moustiques (cellules AP61) et avait obtenu des résultats allant dans le sens d'une possibilité pour le VHC (sérum de patient infecté avec le VHC) d'interagir avec les membranes de ces dites cellules (Germi *et al.*) avec une efficacité apparemment supérieure aux cellules de mammifères. Ces résultats ainsi que de rares autres publiés entre 1996 et 2003, avait intrigué la communauté scientifique (http://www.hcvets.com/data/transmission_methods/tics.htm) et nous avons décidé de mener aussi loin que possible une série d'infections expérimentales chez des moustiques. C'est le propos principal de cette thèse, dont le plan sera le suivant : (i) une première partie exposera les principales caractéristiques du VHC ; ces données développeront ce qui a déjà été énoncé dans cette introduction et devra aider le lecteur à découvrir la complexité de ce virus et les points stratégiques supportant le choix de ce sujet difficile. Dans cette partie, un chapitre concernera également la description des arbovirus et arboviroses avec les vecteurs correspondants. (ii) Une deuxième partie concernera les méthodes utilisées et le matériel employé. En premier lieu les méthodes de détection/quantification de l'ARN viral (essentiellement dans les extraits totaux d'ARN d'insectes), de séquençage et de clonage ; ensuite les méthodes d'infection expérimentale chez le moustique (collaboration très étroite avec la CIBU, Institut Pasteur, Paris (IPP) et l'Unité des Bunyavirus, (IPP) : ces dernières (déjà employées pour étudier la compétence des virus classiquement décrits comme transmis par les arthropodes ; ex Virus de la fièvre jaune, Virus Chikungunya,…) ont été adaptées à notre situation, et le cas échéant modifiées pour optimiser l'infection. (iii) Une troisième partie concernera les résultats : nous commencerons par un article écrit en collaboration avec l'équipe de Marie-Anne Petit (INSERM 871, Lyon). Notre participation à cet article concerne la détection et la quantification de l'ARN viral résiduel après infection avec du sérum de malades infectés et neutralisation à l'aide d'un anticorps monoclonal. Enfin nous décrirons

l'ensemble de nos propres résultats, allant de l'optimisation de la détection de l'ARN VHC chez le moustique, jusqu'à la détection de séquences virales dans le cadre d'une étude cinétique d'infection expérimentale.

INTRODUCTION

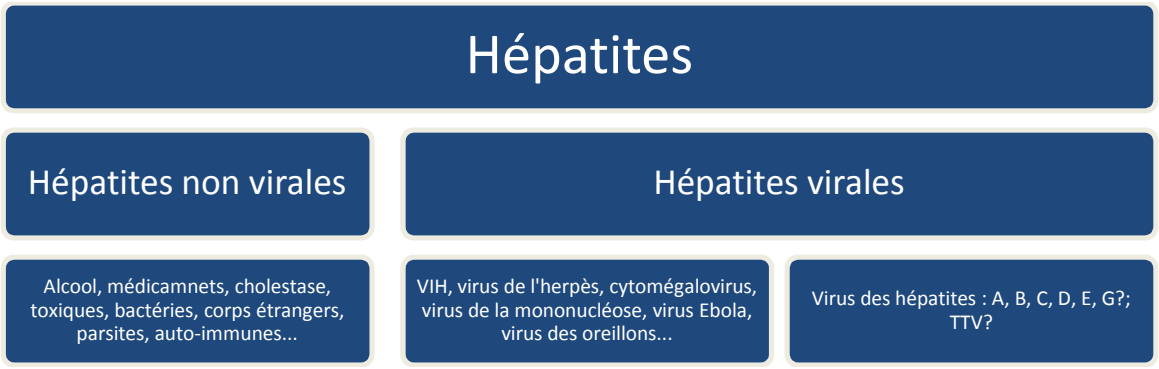


Figure 1 : Origines des hépatites

II. INTRODUCTION

1. Paramètres épidémiologiques de l'infection virale C

Les virus des hépatites A et B sont connus depuis bien longtemps, et des vaccins ont été développés afin de prévenir une infection par les deux virus. Le virus de l'hépatite B a été découvert en 1965 d'abord par Baruch S. Blumberg, en tant qu'antigène, avant d'être baptisé ensuite comme le virus de l'hépatite B (VHB). Le vaccin anti-VHB est disponible depuis 1982. Le virus de l'hépatite A (VHA) a été identifié en 1973 et le vaccin anti-VHA est disponible depuis 1995. Un vaccin combiné qui permet la prévention simultanée contre l'infection par le VHA et le VHB est disponible depuis 2001.

Avant que le virus de l'hépatite C (VHC) ne soit identifié, les infections hépatiques étaient le plus souvent retrouvées dans les individus transfusés. Les screening étaient négatifs pour le VHA et seulement 25% des hépatites liées à la transfusion étaient dues au VHB (5) (*cf.* Figure 1). Les 75% restants de ces infections étaient de ce fait attribués à un virus tout d'abord appelé virus de l'hépatite non-A non-B (NANB), considéré comme inoffensif, à cette époque. La majorité des infections NANB étaient alors identifiées par les tests de l'alanine aminotransférase hépatique (ALT), dont le titre augmente jusqu'à plus de 20 fois sa valeur normale peu après l'infection ; néanmoins, seul un faible nombre de personnes touchées développe des symptômes durant la phase aigue de l'infection (6). Les symptômes sont : fatigue, perte d'appétit, nausées, vomissements, et jaunisse (peau et yeux jaunes) qui disparaît en quelques semaines. Les cliniciens à l'époque étaient conscients que des conséquences plus graves puissent être causées par l'hépatite NANB. En 1988, un groupe de chercheurs de la société Chiron réussirent à identifier l'ARN du virus qui a vite été reconnu comme l'agent responsable de l'infection NANB, celui fut appelé Virus de l'Hépatite C (VHC) (7). Très rapidement après, un test anticorps a été développé (8, 9) et il a démontré que 70% à 90% des cas d'hépatite NANB étaient des infections dues au VHC.

Tableau 1: Estimation de la prévalence de l'infection par le VHC et le nombre d'infectés dans le monde par régions (OMS – 1999)

Région OMS	Population totale (Million)	Taux de prévalence (%)	Population infectée
Afrique	602	5,3	31,9
Amériques	785	1,7	13,1
Est-Méditerranéenne	466	4,6	21,3
Europe	858	1,03	8,9
Asie du Sud-Est	1500	2,15	32,3
Ouest du Pacifique	1600	3,9	62,2
Total	5811	3,1	169,7

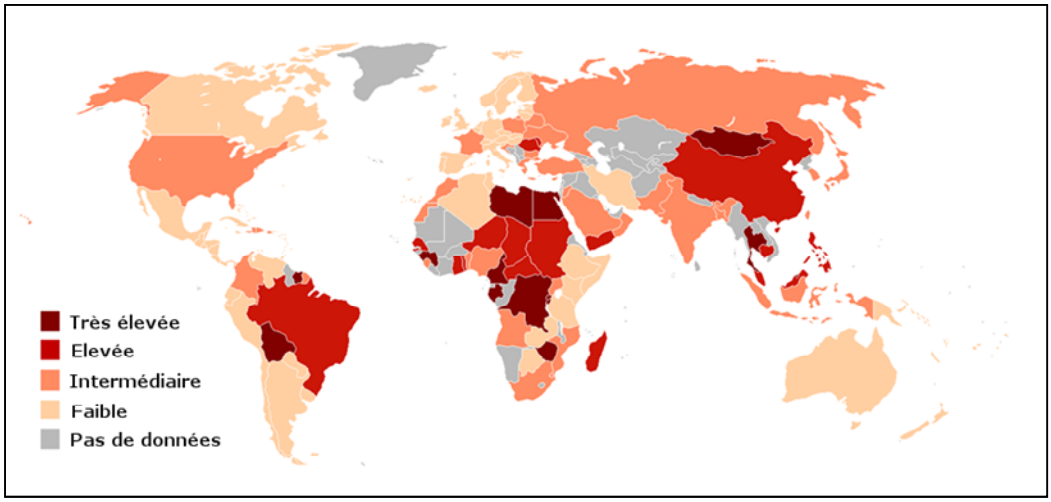


Figure 2 : Prévalence du VHC dans le monde (OMS – 1999).

a. Incidence

L'incidence dans les pays occidentaux est limitée principalement aux infections survenant chez les usagers de drogues intraveineuses, elle est estimée en France dans cette population à environ 10% de la population exposée au risque par an (2 700 à 4 400 personnes par an) (10).

b. Prévalence

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 3% le pourcentage mondial de personnes infectées de façon chronique par le VHC (170 millions à 200 millions d'individus) qui ont un risque de développer une cirrhose et/ou un hépato-carcinome (données de 1999). Toutefois, l'estimation de la prévalence de l'infection par le VHC dans la population générale reste difficile et imprécise et les chiffres donnés doivent sans doute être sous-évaluées ; en effet, ils sont généralement issus de données collectées à partir des donneurs de sang, en effectuant des tests sérologiques, alors que la catégorie des donneurs de sang est une catégorie hautement sélectionnée, donc non représentative. La distribution géographique est variable avec des zones à prévalence très élevée comme en Afrique ou en Asie où la prévalence peut dépasser 10% (ex. Egypte 14,5%, Malaisie et Philippines 2,3%, Inde 1,5% et le Japon 1,2%. En Europe, la prévalence de l'infection au VHC varie entre 0,5% et 2% ; cependant, certains pays sont beaucoup plus touchés que d'autres, tels que l'Italie (prévalence dans certaines régions est d'environ 5%) ou la Roumanie, considérée comme le pays le plus touché en Europe avec une prévalence globale de 4,5% (11) (*cf.* Tableau 1, Figure 2).

En France, la prévalence globale est de 0,84 % (anticorps anti-VHC positifs), soit 367 055 personnes dont 22 386 personnes avec une hépatite C chronique. Seulement 57 % des personnes infectées connaissaient leur statut positif vis-à-vis du virus. La prévalence du VHC chez les femmes est plus élevée que chez les hommes (1,02 % contre 0,84 %) et la tranche des 45-49 ans est la plus touchée avec 2,28 % (contre 0,04 % chez les jeunes de 18 à 24 ans). La prévalence est particulièrement élevée en Ile-de-France (1,10 %) contrairement au quart Nord-Ouest (0,35 %) et est trois fois plus élevée chez les personnes en situation de précarité (2,49 % vs 0,74 %). Plusieurs facteurs de risque ont pu être associés de façon significative à la présence des anticorps anti-VHC : usage de drogues par voie intraveineuse, voie nasale,

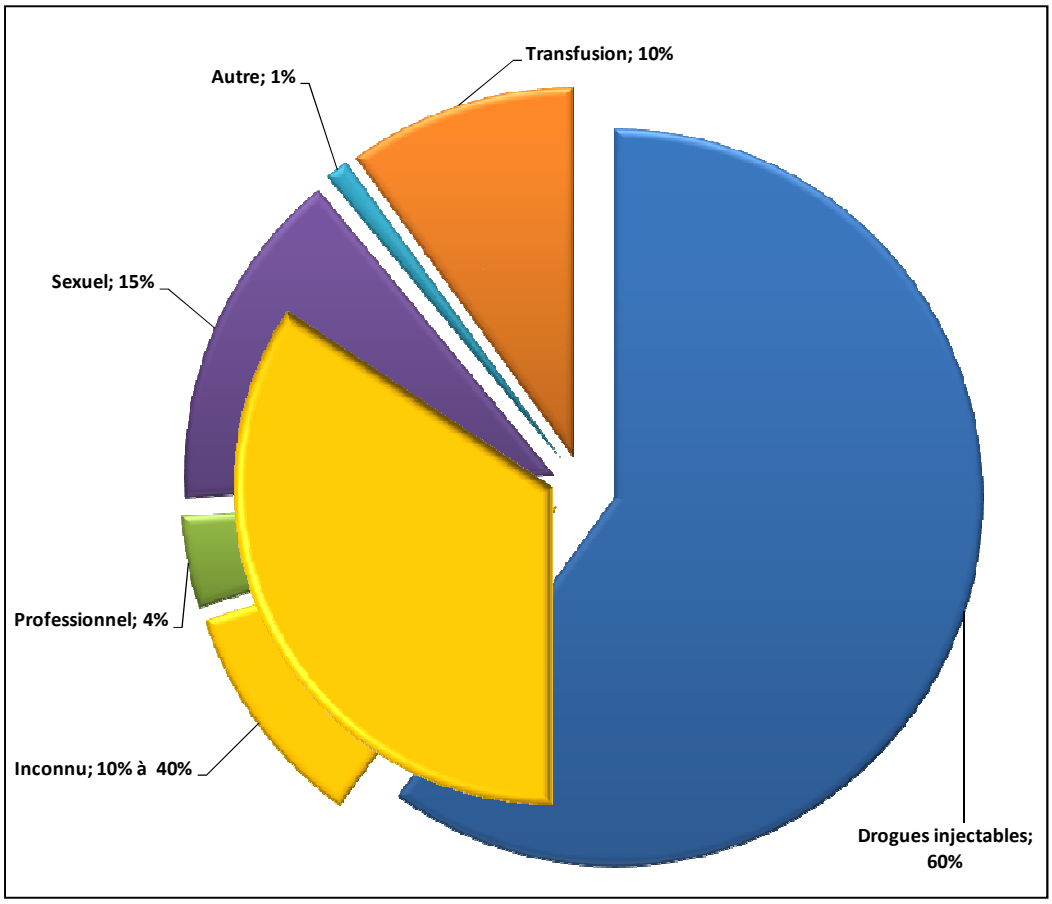


Figure 3 : Modes de contamination par le VHC. Les causes d'infection par le VHC restent inconnues dans 10 à 40% des cas (*cf.* § **Modes de contamination**).

transfusion de sang réalisée avant 1992, tatouage, et enfin, un pays de naissance où la prévalence des anticorps anti-VHC est élevée (Source OMS).

2. Modes de contamination

Cf. Figure 3

a. Transfusions

La mise en application de mesures réglementaires spécifiques telles que le dosage des transaminases et l'éviction des donneurs ayant une valeur supérieure à la normale, l'élimination des donneurs et produits réactifs pour les anti-HBc (anti-capside du VHB), et la mise en place des tests spécifiques anti-HCV, a permis de diminuer considérablement l'incidence de ces hépatites transfusionnelles, qui était historiquement de 7% en moyenne. Suite à l'optimisation des tests de troisième génération et à l'introduction en 2001 du dépistage génomique viral systématique pour toutes les unités transfusées, on estime désormais qu'en France, le risque résiduel de transmission du VHC par la transfusion est voisin de 1 pour 6 millions dons.

b. Toxicomanie par voie intraveineuse

Dans les pays développés tels les Etats Unis d'Amérique et l'Europe occidentale, l'utilisation des drogues injectables constitue le principal moyen de transmission.

c. Transmission sexuelle du VHC

Le virus de l'hépatite C peut être transmis par voie sexuelle (*via* le sang) mais la transmission reste beaucoup plus faible que celles des virus sexuellement transmissibles (MST) tels que le virus de l'hépatite B (VHB) ou le virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIH). Le risque de transmission par cette voie diffère selon le type de la relation sexuelle. Les personnes monogames ont de faibles risques d'acquisition du VHC (0 à 0,6%) par rapport aux personnes ayant des partenaires multiples ou ceux ayant un terrain favorable pour (MST) (0,4% - 1,8% par an). L'infection au VIH semble augmenter le taux d'acquisition du VHC par voie sexuelle (12).

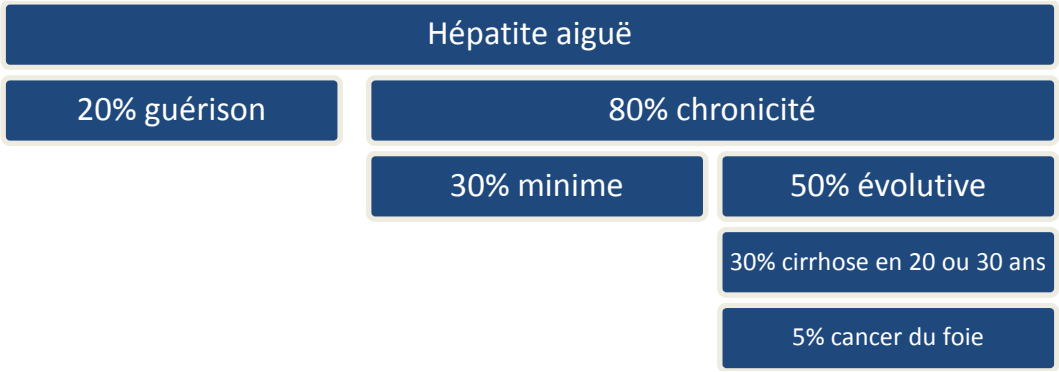


Figure 4 : Stades d'évolution de l'infection par le VHC

d. Transmission dans le contexte professionnel

Estimé à 4% après une exposition à une piqure accidentelle, ce taux est aussi modulé par le taux de virémie. Cependant, les campagnes de sensibilisation ont remarquablement contribué à la réduction de ces fréquences, notamment les précautions promues dans la lutte contre le VIH.

e. Autres modes de transmission

Cette catégorie inclue la transmission causée par injection thérapeutique ou tout autre contact avec des seringues souillées (dans le cas d'une administration de médicaments, soins dentaires) ou du matériel non stérilisé (ex. tatouages, piercing…). La transmission mère-enfant est aussi incluse dans cette catégorie. Elle est estimée à 5%, cependant, le risque de transmission peut atteindre 20% en cas de co-infection par le VIH. La contamination survient au moment de la naissance et peut donc être prévenue par césariennes exsangues. L'allaitement n'apparait pas comme un risque de transmission et n'est donc pas contre-indiqué chez les femmes porteuses du VHC (13-15).

Cependant, les causes d'infection par le VHC restent inconnues dans 10 à 40% (16-18).

3. Evolution de la maladie

On distingue deux phases de la maladie (*cf.* Figure 4) :

a. La phase aiguë : L'hépatite aiguë.

Elle survient quatre à douze semaines après la contamination. Le plus souvent, l'hépatite C aiguë passe inaperçue. Parfois, une fatigue, de la fièvre, une jaunisse ou des difficultés à digérer peuvent apparaître. L'hépatite aiguë peut se compliquer d'une hépatite fulminante. Elle survient de façon très exceptionnelle pour l'hépatite C. Certains pensent même qu'il n'y aurait pas d'hépatite fulminante liée à une infection isolée par le VHC. Une co-infection avec le VHB ou le VHA serait nécessaire (Source : INPES, 2007, p73)

.

b. La phase chronique : L'hépatite chronique.

On parlera de chronicité lorsque l'infection dure plus de six mois après la contamination ; cela signifie qu'après la phase de contamination et d'infection aiguë, l'organisme n'a pas réussi à éliminer le virus. Cette complication majeure de l'hépatite C en fait toute sa gravité. Elle survient dans 80 % des cas après une infection aiguë (symptomatique ou non). Elle se caractérise par la persistance du VHC dans le foie et dans le sang, au-delà de six mois après le contage. L'hépatite C chronique s'accompagne le plus souvent de peu de signes cliniques, en dehors d'une fatigue, souvent invalidante. Cette infection chronique déclenche au fil des années une inflammation et une destruction de certaines régions du foie, lequel se cicatrise en fabriquant un tissu de remplacement fibreux, la fibrose. A long terme, une cirrhose peut survenir au bout de vingt années d'évolution dans environ 30 % des cas. Par la suite, cette cirrhose peut se compliquer d'un cancer du foie, survenant chaque année pour 4 à 5 % des cas de cirrhoses. Certains facteurs accélèrent l'évolution de la maladie : sexe masculin, alcool (consommation quotidienne supérieure à 40-50 g), surpoids, âge adulte au moment de la contamination (40-50 ans), co-infection par VIH ou VHB, tabagisme, polytoxicomanie (Benzodiazépines, ecstasy, médicaments, etc.).

Quand une hépatite C chronique est suspectée, on procède à une ponction biopsique hépatique. Une nouvelle technique d'évaluation du degré de fibrose hépatique est en cours de validation. Il s'agit du Fibrotest©, c'est-à-dire d'un dosage sanguin de cinq marqueurs biochimiques de fibrose (gamma GT, bilirubine, haptoglobine, apolipoprotéine A-1, alpha-2 macroglobulines). Le Fibrotest© permet d'éviter la PBH (ponction biopsique hépatique) une fois sur deux.

Le virus de l'hépatite C peut atteindre d'autres organes et être responsable de manifestations extra-hépatiques. Elles sont très fréquentes et rendent la vie des malades encore plus difficile : (i) Cryoglobulinémies : elles sont caractérisées par la présence dans le sang d'immunoglobulines qui précipitent et s'agglutinent lors d'une baisse de la température. Elles touchent 50 % des patients atteints d'hépatite chronique C. Les manifestations essentielles sont liées à la thrombose (obstruction) de vaisseaux dans la circulation périphérique mais aussi au sein des organes. L'Interféron est efficace dans 50 % des cas de cryoglobulinémies, mais on note un taux élevé d'échappement thérapeutique à long terme. (ii) Manifestations cutanéo-muqueuses (porphyrie cutanée tardive, lichen plan).

(iii) Certaines glomérulonéphrites. (iv) Thyroïdites auto-immunes (10 à 20 % des cas). (v) Thrombopénies auto-immunes (présentes dans 40 % des cas). Lymphomes. (vi) Pseudo-syndromes secs, présents chez un malade sur deux. (vii) Fibromyalgies, asthénie).

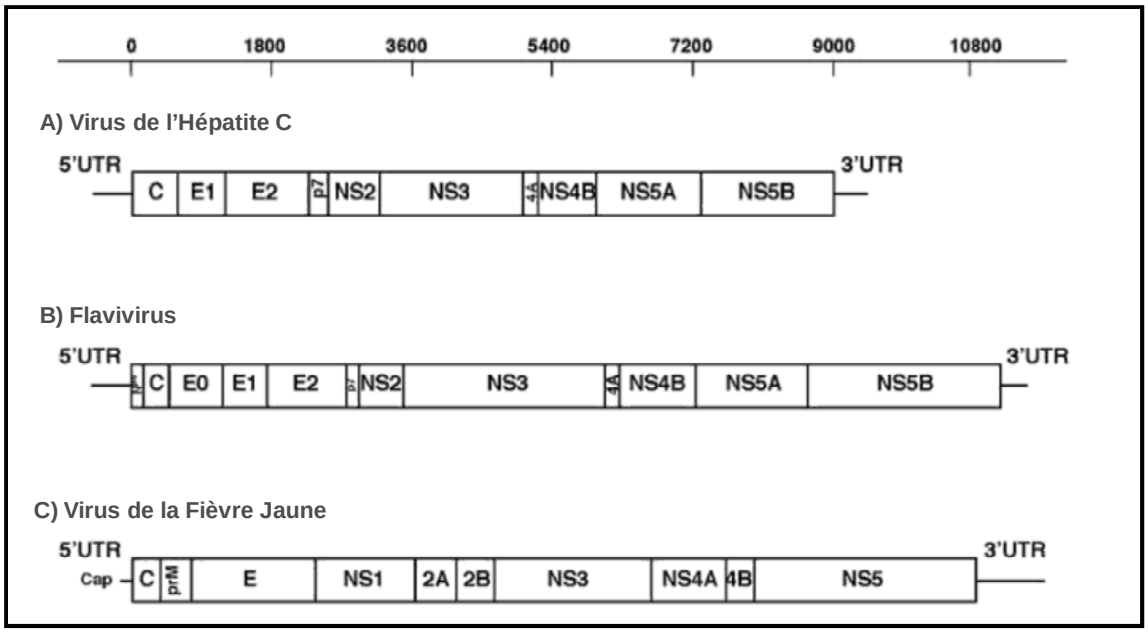


Figure 5 : Organisation des génomes des *Flaviviridae*. La figure montre, du haut vers le bas, les génomes du VHC (genre *Hepacivirus*), *Pestivirus*, *Flavivirus* (virus de la fièvre jaune). NS: Non structurale (19).

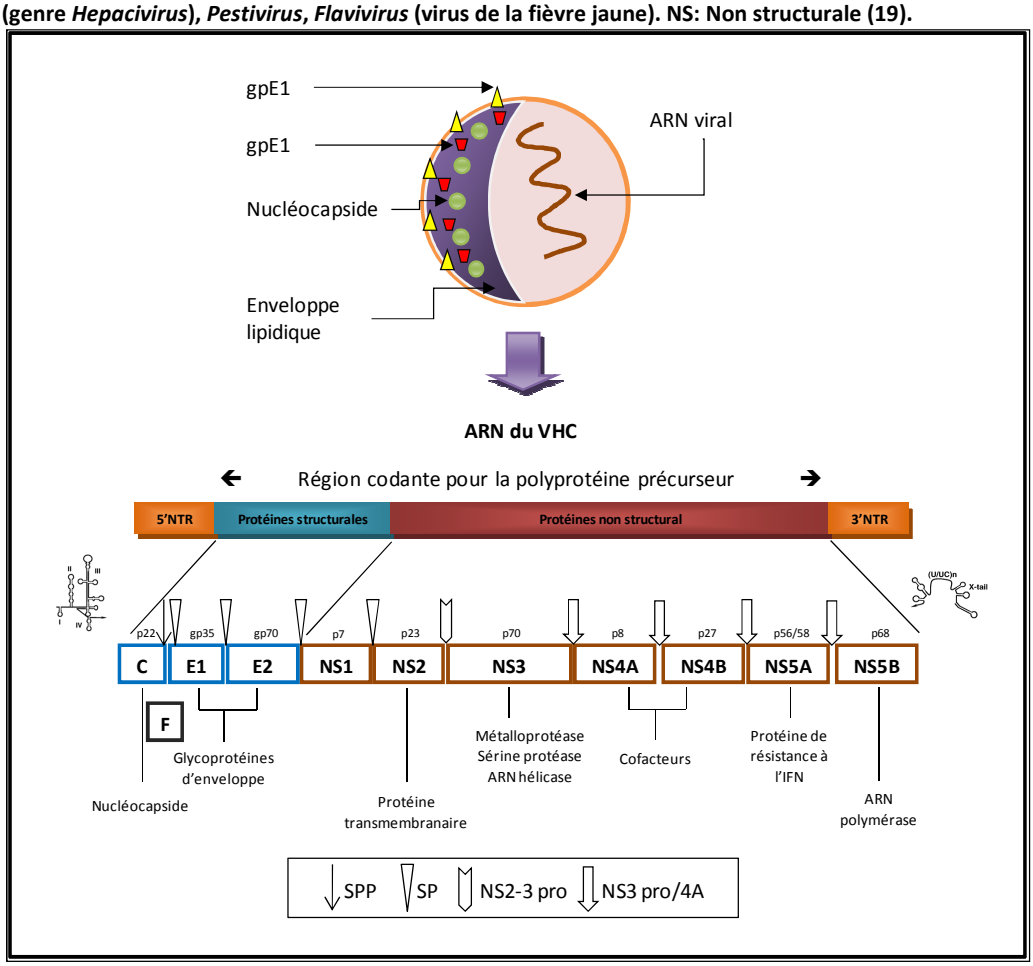


Figure 6 : Organisation génomique du VHC. Les fonctions des protéines structurales et non structurales sont indiquées. 5'NTR : région 5' non codante, 3'NTR : région 3' non codante, SPP : signal peptide peptidase, SP : serine protease, pro : protéase.

4. Biologie moléculaire du VHC

a. Morpho-structure du VHC

i. Structure physico-chimique et morphologique

Le virus de l'hépatite C a été découvert en 1988 grâce aux techniques de biologie moléculaire et a été cloné pour la première fois en 1989 par l'équipe de M Houghton. Le VHC est un petit virus d'environ 35nm de diamètre (le plus petit virus connu à l'heure actuelle est le virus delta (VHD), il mesure environ 10nm, alors que le plus gros virus est le mimivirus qui mesure 400nm). Les particules virales C existent sous différentes formes chez l'hôte infecté, elles peuvent être libres ou associées à d'autres molécules telles que les immunoglobulines ou encore associées aux LDL ou VLDL (les deux formes étant infectieuses) (20, 21).

ii. Structure génétique moléculaire

Le VHC est un virus à ARN monobrin de 9600 nucléotides environ (9,6kb). Il appartient à la famille des *Flaviviridae* et constitue le seul membre de son genre *Hepacivirus*. Le génome viral est de polarité positive, il possède un seul cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame ORF) qui code pour une polyprotéine d'environ 3 000 acides aminés (aa). La partie codante du génome est flanquée de deux parties non codantes en 5' et en 3' appelées respectivement la partie 5' non codante (5' non-translated region ou 5'NTR ou 5'UTR) et la partie 3' non codante (3' non-translated region ou 3'NTR ou 3'UTR). La partie codante du génome code pour deux types de protéines ; les protéines structurales : capside (C), glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2 et p7 ; et les protéines non structurales (F, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (*cf.* Figure 5, Figure 6).

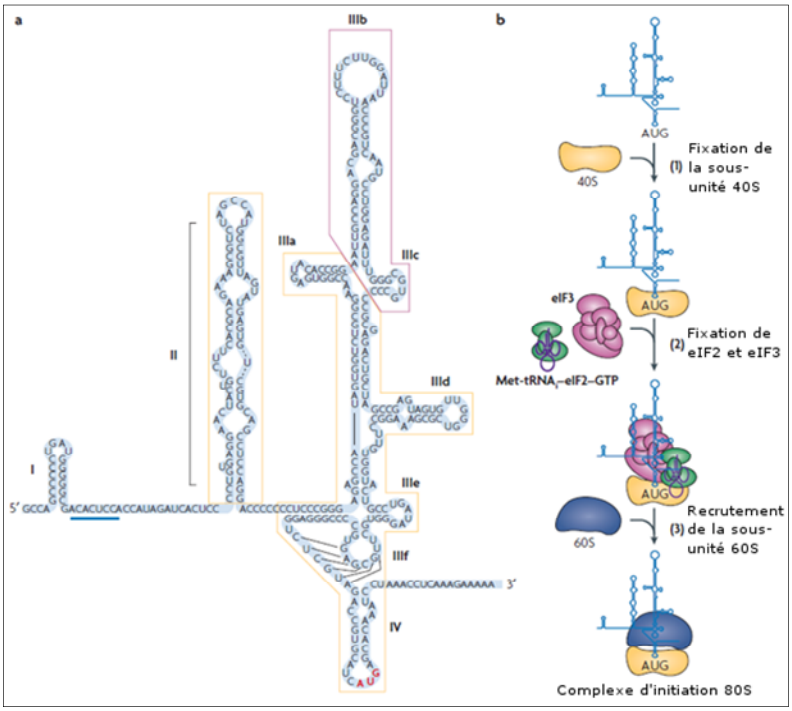


Figure 7 : La structure secondaire de la région 5'NTR du génome du VHC et modèle de formation du complexe d'initiation 80S. a) Structure secondaire de la région 5'NTR du génome du VHC consiste en quatre domaines numérotés de I à IV. L'IRES du VHC comporte trois domaines (II – IV), et les sous-domaines (a – f) du domaine III sont également indiqués. Les domaines importants pour la fixation de la sous-unité 40S sont entourés en jaune, et la position du site de fixation du facteur de traduction eIF3 est entourée en violet. Le codon AUG est coloré en rouge et le site de fixation du mir122 est souligné en bleu. b) l'initiation de la traduction sur l'IRES du VHC commence par le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S directement sur l'IRES sans intervention d'aucun autre facteur d'initiation (1). eIF2-GTP (lié au Met-ARNt) et eIF3 sont alors engagés à la surface de la sous-unité ribosomale 40S (2), puis hydrolyse du GTP qui entraine la fixation de la sous-unité ribosomale 60S pour former le complexe d'initiation 80S (3). VHC : virus de l'hépatite C, IRES : site interne d'entrée du ribosome, UTR: région non codante.

- Les régions non-codantes

5'NTR. Compose les 341 premiers nucléotides du génome viral et contient le site interne d'entrée du ribosome (IRES) qui assure la traduction de la région codante de façon indépendante de la coiffe. La 5'NTR contient 3 à 5 codons AUG non initiateurs de la traduction, 4 domaines riches en structure tiges-boucles (I à IV). Le domaine III contient un pseudonœud et le domaine IV renferme le codant AUG initiateur de la traduction. L'IRES est formé par les domaines II, III, et IV (les plus conservés), il fixe la sous-unité 40S du ribosome et permet l'initiation de la traduction du cadre de lecture ouvert. Les 40 premiers nucléotides en aval du codon d'initiation (appartenant au gène C) semblent participer à la structure et au fonctionnement de l'IRES (22) (*cf.* Figure 7).

3'NTR. 200 – 235 ntd. Cette région est composée de 3 parties. On retrouve de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' : i) une séquence d'environ 40 ntd formant deux structures tiges-boucles (variable stem loop I et II VSLI et VSLII) ; ii) une queue poly U / UCn de 30 à 150 ntd ; iii) une région de 98 ntd formant 3 structures tiges-boucles SLI – SLIII, appelée région X hautement conservée parmi tous les génotypes. La queue poly U / UCn et la région X sont essentielles à la réplication du virus *in vivo*. Le rôle de la région 3'NTR serait double : i) permettre l'initiation de la réplication et ii) réguler la traduction de l'ORF (23-25).

- La partie codante (coding sequences ou CDS)

La polyprotéine est clivée co- et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et virales pour libérer les protéines structurales et non structurales du virus.

Les protéines structurales

Nucléocapside (C)

Sa séquence aminoacide est très conservée entre les différentes souches du virus par rapport à celles des autres protéines. On distingue deux formes, la forme « précurseur » de 23kDa et la forme « mature » de 21kDa. Le domaine N terminal (Nt) de la nucléocapside est hautement basique, alors que le domaine C terminal (Ct) est hydrophobe. La nucléocapside est retrouvée dans le cytoplasme associée au réticulum endoplasmique (RE), aux gouttelettes lipidiques et aux mitochondries. Elle est également présente dans les nouveaux virions confirmant ainsi son rôle structural.

Fonctions : Différentes fonctions ont été attribuées à la nucléocapside. Elle serait impliquée dans le cycle viral (réplication, maturation et pathogénèse) mais aussi dans la régulation de nombreuses voies de signalisation, voies d'expression de gènes cellulaires et viraux, voies de transformation cellulaire, apoptose, et métabolisme lipidique (26-29).

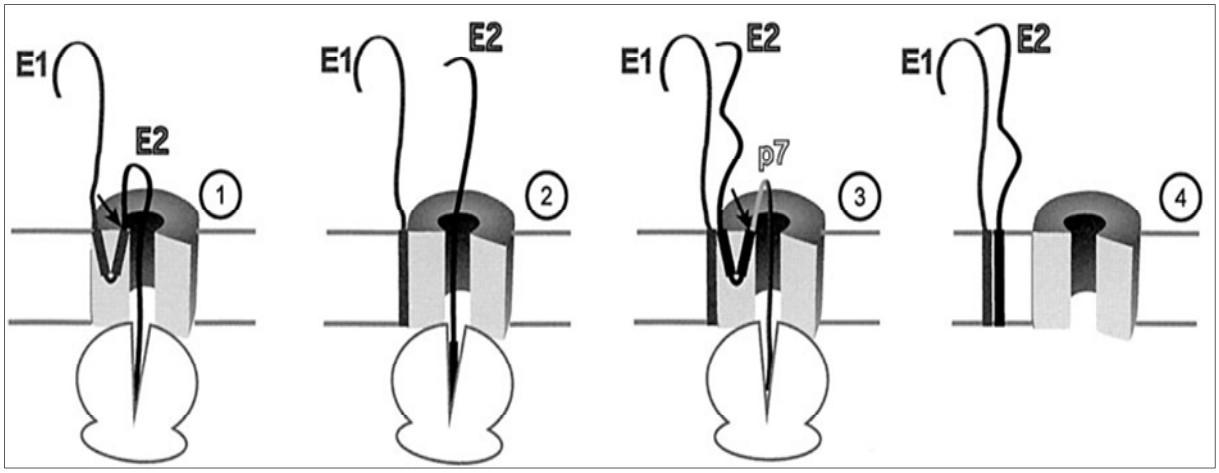


Figure 8 : Modèle de comportement des domaines transmembranaires (TM) des glycoprotéines E1 er E2 du VHC durant les étapes précoces de leur biogénèse. (1) l'extrémité N-terminale (Nt) de E1 est transportée dans le lumen du RE et oriente l'extrémité Nt du E1 du domaine TM vers le lumen du RE. La partie C-terminale (Ct) du domaine TM de E1 est une séquence signal de E2 et a son Ct orienté vers le lumen du RE ce qui permet la translocation de E2. À cette étape et avant le clivage de la séquence signal, le domaine TM de E1 forme une structure en épingle à cheveux qui semble être localisée dans l'environnement du translocon. (2) Après clivage de la séquence signal entre E1 et E2, la séquence signal présente dans la partie Ct du domaine TM de E1 est orientée vers le cytosol et E1 reste probablement très proche du translocon. (3) Comme pour le domaine TM de E1, le domaine TM de E2 adopte transitoirement une structure en épingle à cheveux, ce qui permet la translocation de p7. (4) après clivage de la séquence signal entre E2 et p7, la séquence signal présente dans la partie Ct du domaine de E2 est orientée vers le cytosol, le domaine TM de E1 et E2 interagit et pénètre dans la bicouche lipidique. Pour des raisons d'absence de données concernant sa topologie, p7 n'est pas montrée dans l'étape 4 (30).

Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines E1 et E2 (E1, 31kDa et E2, 70kDa) sont des composants essentiels de l'enveloppe des virions infectieux et sont nécessaires à leur infectiosité. Il semble que les domaines Ct transmembranaires de E1 et E2 forment des structures en épingle à cheveux qui traverse la membrane à deux endroits. Ceci permet la libération dans le cytoplasme d'une partie intermédiaire entre E1 et E2, site de clivage d'une signal-peptidase du lumen du (RE). Les parties Ct se replacent alors dans le cytoplasme adoptant ainsi leur topologie membranaire définitive de type I, et restent liées de manière non-covalente par leurs parties Ct (hétérodimère non-covalent). Ceci aide au maintien du complexe E1~E2 dans le RE. Une autre topologie de E1 a été récemment mise en évidence, dans cette structure, la protéine E1 traverse la membrane du RE deux fois avec formation d'une boucle de 72 aa du côté cytoplasmique (29-32) (*cf.* Figure 8).

Fonctions : il a été montré que la protéine E2 pouvait interférer avec la fonction de la PKR (protéine kinase ARN double brin-dépendante ou « double stranded RNA-dependent protein kinase »). La PKR ayant pour fonction d'induire l'expression de l'interféron, la protéine E2 pourrait jouer un rôle primordial dans l'interférence virale, à savoir dérouter la réponse immune innée à l'infection (29-32).

La protéine p7. C'est une petite protéine de 66aa (7kDa) hydrophobe composée de deux segments intramembranaires séparés par 3 résidus basiques exposés à la surface cytosolique de la membrane. Cette protéine est essentielle à la production de virions infectieux *in vivo* et pourrait jouer le rôle de canal ionique une fois oligomérisée au niveau de la membrane cellulaire (viroporines).

Fonctions : Les viroporines sont connues pour leur effet positif sur l'amélioration de la perméabilité membranaire et la p7 dans ce cas aurait un rôle dans la sécrétion des particules virales. Par ailleurs, différents arguments suggèrent que p7 n'est pas associée aux virions et ne participerait pas à l'entrée du virus dans les cellules hôtes (33, 34).

Les protéines non structurales

NS2. Protéine transmembranaire de 21 – 23 kDa, avec 96 résidus hydrophobes situés du coté N-terminal, formant entre trois et quatre hélices intramembranaires du RE des cellules infectées. Le coté Ct reste vraisemblablement dans le cytosol pour former avec le côté N-

terminal (Nt) de NS3 une autoprotéase NS2/3 zinc-dépendante qui a pour entre autres fonctions la libération de NS2 de NS3. L'efficacité du clivage au niveau de NS2/3 requiert les 130 résidus du coté Ct et les 180 premiers résidus de la NS3. Les tests de mutagénèse dirigée ont montré que les résidus His-952, Glu-972, et Cys-993 contiendraient le site catalytique de l'enzyme (35, 36).

Fonctions : NS2 ne semble pas être impliquée dans le processus de réplication *in cellulo* puisque la polyprotéine tronquée en NS2 se réplique normalement (37), mais elle est indispensable pour le cycle viral *in vivo* et *in vitro* (38, 39). Des travaux récents de cristallographie effectués sur la partie Ct de NS2 suggéraient que le domaine cytoplasmique de NS2 formerait une cystéine-protéase dimérique avec deux sites actifs, dans lesquels His-952 et Glu-972 comprendraient le site actif de l'un des monomères et la Cys-993 formerait le second (40).

NS3. C'est l'une des plus grosses protéines du VHC (70kDa), multifonctionnelle et relativement hydrophobe. L'activité protéase de NS3 réside dans le dernier tiers de l'extrémité N-terminale, alors que l'activité hélicase-NTPase (membre de la superfamille 2 DexH/D-Box hélicase) s'étend sur les deux tiers C-terminaux (41, 42). Les deux enzymes sont bien caractérisées et leurs structures cristallographiques résolues (43).

Fonctions : L'activité sérine-protéase assure le clivage en *cis* du complexe NS3/4A et en *trans* les jonctions NS4B/5A et NS5A/B. L'activité hélicase/NTPase semble intervenir dans les processus de réplication et de traduction. L'hélicase a pour rôle d'ouvrir les structures secondaires et de séparer le brin positif du brin néosynthétisé afin de permettre aux enzymes cellulaires et virales d'accéder au génome (44). La NS3 aurait un rôle dans la pathogénèse puisque sa surexpression induit la transformation des fibroblastes de souris en culture et induit des tumeurs chez des souris immunodéficientes. Il a été démontré, d'autre part, que cette protéine, de par son activité protéasique, joue un rôle pour permettre au virus de déjouer les réponses cellulaires en clivant les facteurs cellulaires Cardif et TRIF nécessaires pour la mise en place de la réponse interféron (45, 46).

NS4A. C'est une petite protéine transmembranaire de 54aa (8kDa). La partie centrale du polypeptide forme un complexe avec la NS3 et la partie Nt maintient le complexe NS3/4A ancré à la membrane (47).

Fonctions : Joue le rôle de cofacteur de la NS3. Des travaux récents suggèrent qu'elle pourrait inhiber la synthèse protéique cellulaire favorisant ainsi la traduction des protéines virales (48).

NS4B. Protéine transmembranaire intégrale de 260aa (27kDa), sa structure révèle la présence d'au moins quatre domaines transmembranaires et une hélice amphipathique du coté Nt responsable de l'association à la membrane du RE (49).

Fonctions : NS4B est capable d'induire la formation de compartiments membranaires spécialisés appelés réseau membranaire (*membranous web)* qui constitue le site de réplication du VHC (50, 51). D'autre part, comme NS4A, NS4B a un effet inhibiteur sur la synthèse de certaines protéines cellulaires (52).

NS5A. Phosphoprotéine de 446aa ancrée dans la membrane. On distingue selon le niveau de phosphorylation deux formes ; faiblement phosphorylée (56kDa) et hautement phosphorylée (58kDa). La phosphorylation est assurée par des sérine-thréonine kinases cellulaires (ex. AKT, MEK1, MKK6, kinase A dépendante de l'AMPc, caséine kinase II, etc.). Des études basées sur l'analyse de séquences révèlent la présence de 3 domaines aa 1 – 213, 250 – 342 et 356 – 447 (53). La phosphorylation de NS5A semble nécessaire à son activité et les différences de phosphorylation, qui dépendent principalement du génotype viral, l'influencent probablement.

Fonctions : Le rôle de NS5A dans le cycle viral n'est pas complètement élucidé, néanmoins, elle serait importante dans la réplication du virus. Les mutations adaptatives identifiées sur le gène de la protéine NS5A en culture cellulaire aboutissent à une augmentation de l'efficacité de la réplication (54-56). De plus, plusieurs protéines cellulaires interagissent avec NS5A aboutissant à l'assemblage du complexe de réplication et/ou la régulation de la réplication de l'ARN viral (57-59). Enfin, comme E2, NS5A serait capable d'interférer avec la fonction de PKR inhibant ainsi la réponse interféron endogène et serait aussi responsable de la mauvaise réponse au traitement par des interférons exogènes (60).

NS5B. Protéine cytosolique de 592aa (68kDa) ancrée dans la membrane du RE par sa partie Ct. NS5B constitue le centre catalytique de la machinerie de réplication du génome du VHC grâce à son activité ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). La queue transmembranaire de NS5B n'est pas indispensable à son activité *in vitro* mais est responsable de l'adressage post-traductionnel vers la membrane du RE (61, 62). L'analyse de structure tridimensionnelle de NS5B du VHC par cristallographie aux rayons X révèlent une structure en main droite avec des sous-domaines « doigts », « paume » et « pouce » caractéristiques similaires à d'autres polymérases matrice-dépendantes (63-65). La RdRp du VHC possède aussi une structure inhabituelle d'une tige-boucle au niveau du site actif ce qui aide au bon positionnement de la partie 3'-terminale de la matrice d'ARN favorisant ainsi l'initiation de la synthèse d'ARN et inhibant la synthèse à partir d'amorces (66). Il faudra noter qu'*in vitro*, l'enzyme favorise la synthèse d'ARN à partir d'une amorce soit par élongation soit à partir de l'extrémité 3'OH d'une matrice hybridée sur elle-même. De plus, NS5B a la possibilité de synthétiser l'ARN de *novo* et il semble que cela a lieu aussi *in vivo* (67, 68). Les brins positif et négatif du génome du VHC commencent par une Adénine et une Guanine respectivement. Le fait que le *ratio* de synthèse du brin positif par rapport au négatif soit de 5/10 pourrait être la conséquence d'une synthèse *de novo* plus efficace à partir du brin positif, et/ou une conformation plus favorable de l'extrémité 3'-terminale du brin négatif (37, 69).

L'analyse de séquence a montré la présence du motif protéique GDD commun et très conservé dans les RdRp des virus à ARN positif. Les analyses de séquences de la NS5B du VHC et d'autres polymérases virales et cellulaires ont permis l'identification de motifs d'aminoacides hautement conservés cruciaux pour l'activité catalytique de l'enzyme (70). Quatre motifs ont été identifiés : motif A (DXXXXD) probablement impliqué dans la fixation des NTP et la catalyse, motif B (GXXXTXXXN) portant un résidu glycine invariable qui intervient dans le positionnement de la matrice et/ou l'amorce, motif C (GDD) caractéristique de la plupart des polymérases, impliqué dans la fixation des NTP et la catalyse, et le motif D (AMTRY) probablement impliqué dans la fixation des NTP et la catalyse également. L'importance de ces motifs a été démontrée par de nombreux tests de mutagénèse. A l'exception de l'arginine dans le motif D, toute mutation au niveau de l'un des résidus de ces motifs conservés est délétère pour la polymérase (71-74). Il est

intéressant de noter que toutes les reverses transcriptases, ainsi que la majorité des RdRp virales, portent une lysine à cette position, alors qu'un résidu arginine occupe cette position dans tous les isolats connus du VHC. Ceci est d'autant plus curieux car la substitution du résidu d'arginine par une lysine augmente l'activité de la RdRp ainsi que l'efficacité de la réplication *in vitro* (71, 75).

Fonctions : NS5B constitue le centre catalytique de la machinerie de réplication du génome du VHC grâce à son activité RdRp.

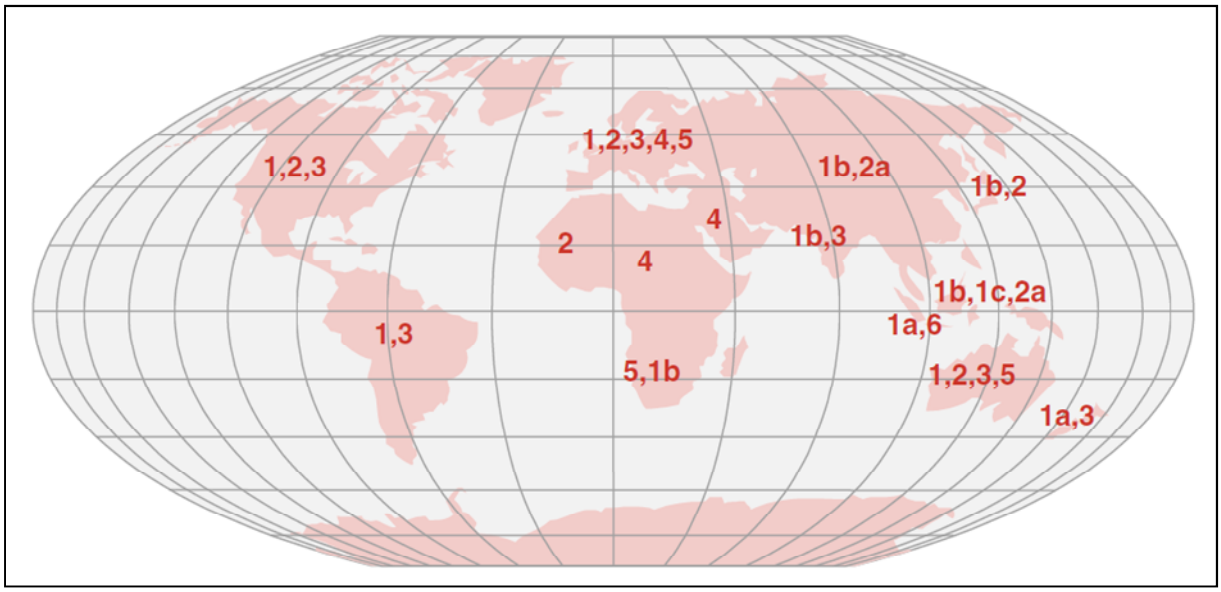


Figure 9 : Répartition géographique des principaux génotypes et sous-types du VHC.

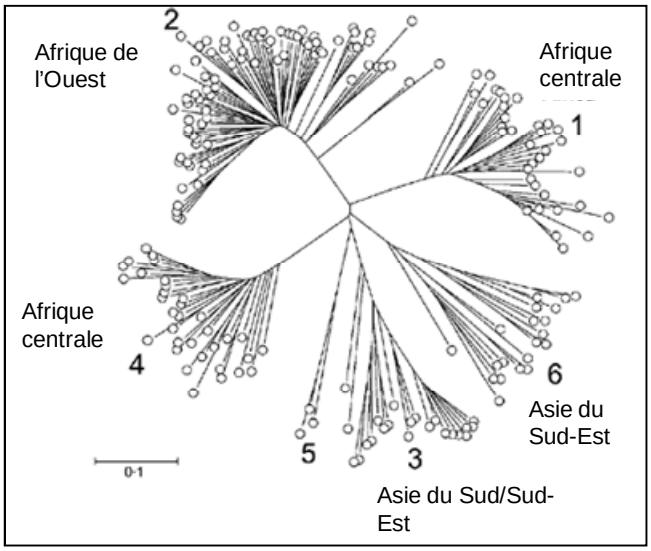


Figure 10 : Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du HCV et leur répartition dans le monde (19).

b. Phylogénie et variation génomique

i. Génotypes et notions de quasi-espèces

L'infection à VHC est un processus hautement dynamique avec une demi-vie du virus de l'ordre de quelques heures seulement produisant environ 10^{12} particules virales par jour chez un individu donné (76). Le haut niveau de réplication combiné au manque de fidélité de la polymérase virale ARN-dépendante (absence d'activité de relecture ou *Proof-Reading activity*) est à l'origine de la variabilité génétique extraordinaire de ce virus. Le VHC peut être divisé en génotypes et sous-types, la base de la classification étant la variabilité génomique. Une variabilité génomique de l'ordre de 30-35% définit les génotypes, ils sont au nombre de 6 (1, 2, 3…), alors qu'une variabilité génomique entre 20-25% définit les sous-types (a, b, c…). Le terme de quasi-espèce définit l'hétérogénéité de la population circulant chez un individu infecté donné (77) (*cf.* Figure 9, Figure 10).

ii. Phylogénie : origine et évolution taxonomique

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae* et constitue le seul membre du genre des *Hepacivirus*. Les autres genres étant le genre *Flavivirus* (comportant des virus tels que le virus de la fièvre jaune, le virus de dengue) et le genre *Pestivirus* (comportant les virus animaux tels que le virus de la diarrhée bovine ou BVDV). La famille des *Flaviviridae* comporte aussi des virus qui n'ont pas été classés tels que les virus de l'hépatite G (GB virus A et B et C) (78) (*cf.* Figure 11, Figure 12).

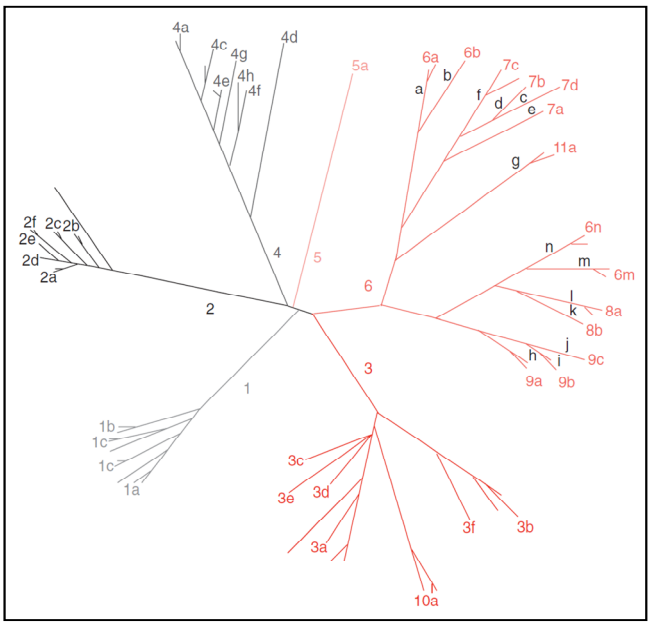


Figure 11 : Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du VHC (dérivés de l'analyse des séquences d'une partie de la région NS5B). La longueur des branches est proportionnelle à la distance génétique. Les amplicons sont issus de sérums de patients donneurs de sang chroniquement infectés par le VHC de provenances géographiques diverses. Les six groupes numérotés de 1 à 6 correspondent à la classification actuelle. Chaque génotype, à l'exception du génotype 5, est subdivisé en de nombreux sous-types indiqués en lettres minuscules. Certaines souches sont numérotées de 7 à 11 : elles ont été classées lors de leur découverte comme de nouveaux génotypes mais ont été regroupées par la suite avec les génotypes 3 et 6 (79).

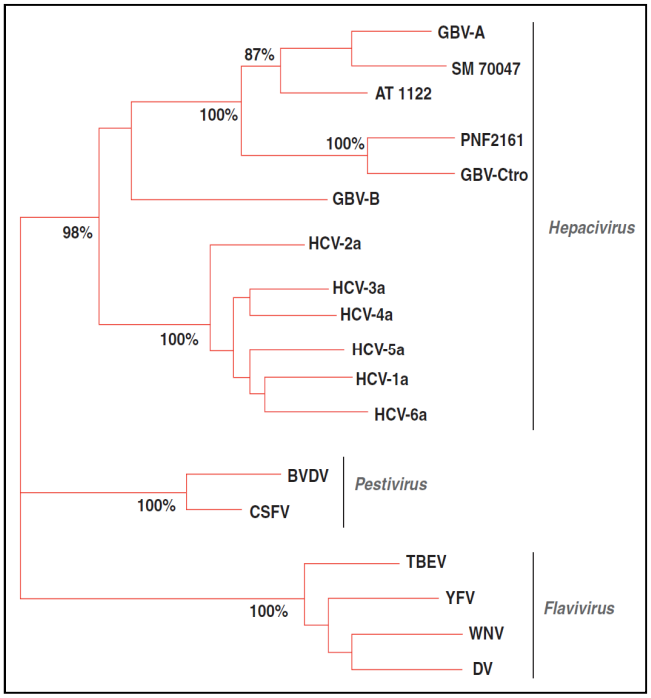


Figure 12 : Comparaison par analyse phylogénétique des séquences de l'ARN polymérase des variants du VHC, des virus GB, des *Pestivirus et des Flavivirus.* La longueur des branches est proportionnelle à la distance génétique entre les différents virus cités. Le genre *Flavivirus* regroupe les variants du HCV (génotypes 1 à 6), le virus GB (GBV-B et GBV-A) des primates du Nouveau Monde, le virus GBV-C des chimpanzés et les virus GBV-C humains. Le BVDV (virus de la diarrhée bovine) et le CSFV (virus du choléra des porcs) appartiennent au genre Pestivirus. Les virus TBEV (virus de l'encéphalite à tiques), YFV (virus de la fièvre jaune), WNV (virus West Nile) et DV (virus de la dengue) sont regroupés dans le genre Flavivirus. Les valeurs de rééchantillonnage (bootstrap) sont indiquées en pourcentage sur les branches (79).

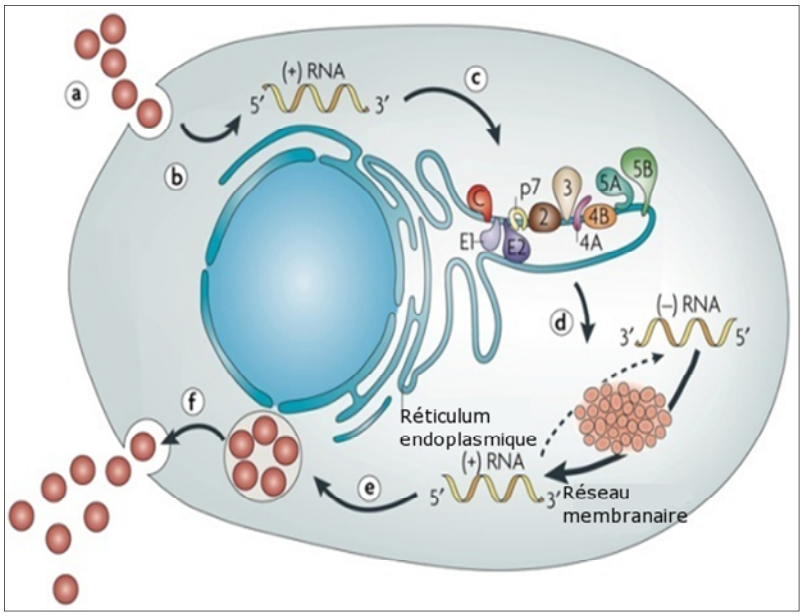


Figure 13 : **Cycle cellulaire du VHC.** Fixation et internalisation du virus (a); Libération dans le cytoplasme et déshabillage (b); Traduction IRES-dépendante et clivage de la polyprotéine (c); Réplication de l'ARN (d), Assemblage et empaquetage (e), Maturation du virion et libération. La topologie des protéines structurales et non-structurales dans la membrane du RE est schématique. La réplication de l'ARN du VHC a lieu dans des structures particulières de membranes altérées (réseau membranaire ou membranous web). Afin de simplifier le schéma, la traduction et le clivage de la polyprotéine sont illustrés comme des étapes séparées alors qu'en réalité elles peuvent être étroitement liées. IRES : Internal Ribosome Entry Site (80).

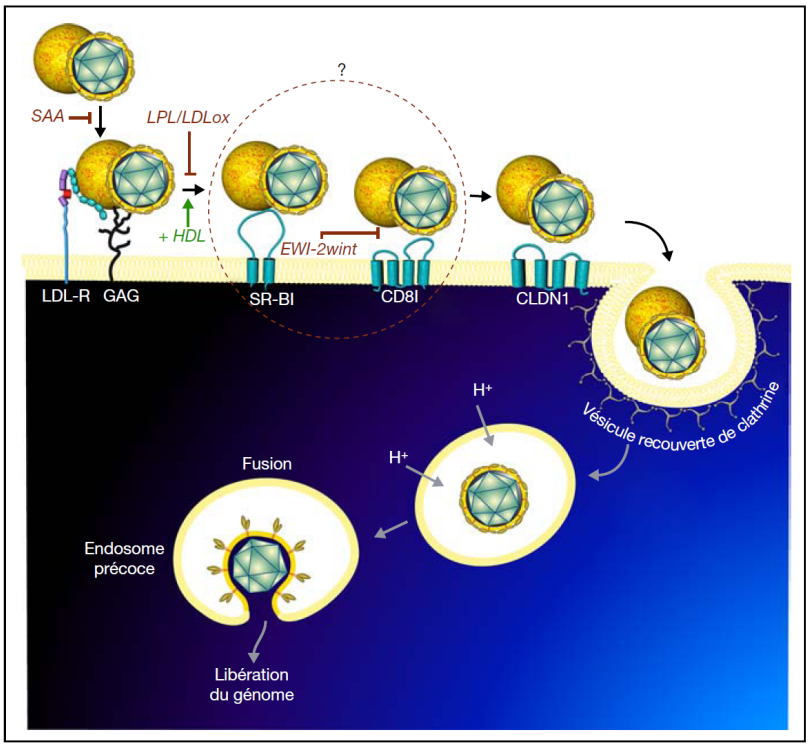


Figure 14 : **Les principaux acteurs impliqués dans l'entrée du VHC dans les cellules hôtes.** Les GAG et le LDL-R pourraient faciliter l'attachement initial des particules virales sur les cellules, par une interaction directe avec les protéines E1E2 ou par l'intermédiaire des lipoprotéines (représentées par une sphère jaune) associées aux particules virales. Après cette étape initiale de liaison, la particule interagit probablement avec SR-BI et CD81. Les données actuelles suggèrent qu'un premier contact avec SR-BI soit un pré-requis à l'interaction de la particule avec CD81. L'interaction avec SR-BI peut être directe ou indirecte par l'intermédiaire des lipoprotéines associées. Il est à noter que ces étapes précoces de l'entrée du VHC peuvent être modulées par différentes molécules présentes dans le sérum des patients, pouvant faciliter (HDL) ou inhiber (LDL oxydées, LPL et SAA) l'entrée du VHC dans les cellules cibles. CLDN1 agit à une étape tardive du processus d'entrée, après l'attachement, l'interaction avec CD81 et probablement après une migration latérale des complexes virus-récepteurs jusqu'aux jonctions serrées. Le VHC entre alors dans les cellules par endocytose dépendante de la clathrine jusqu'aux endosomes précoces où la fusion des membranes se produit. Il est important de noter que le processus d'entrée du VHC est peut-être encore plus complexe qu'on ne le pense. En effet, certaines cellules exprimant à la fois CD81, SR-BI et CLDN restent résistantes à l'infection par le VHC, suggérant qu'un ou plusieurs facteurs d'entrée restent à identifier. Dans le sens de cette observation, l'identification d'EWI-2wint comme un nouveau partenaire de CD81 capable de bloquer l'interaction E2-CD81 fournit une preuve supplémentaire de la complexité du processus d'entrée du VHC. La découverte de CLDN comme facteur d'entrée suggère que la polarisation cellulaire pourrait jouer également un rôle dans l'entrée virale. De plus, les jonctions serrées semblent bloquer physiquement l'accès des particules virales aux facteurs cellulaires présents aux pôles latéral et basolatéral. Finalement, la possibilité d'une transmission de cellule à cellule a été évoquée ouvrant ainsi une voie supplémentaire à la propagation virale. Néanmoins, le mécanisme de transmission de cellule à cellule n'a pas encore été caractérisé et l'importance de ce mode de transmission dans le foie n'a pas encore été déterminée (81). LPL : lipoprotéines lipase, SAA : apolipoprotéine sérum amyloïde A.

c. Cycle viral du VHC et interaction virus – hôte

Les virus ont besoin de cellules-hôtes pour pouvoir se reproduire et assurer leur persistance. Il existe différents mécanismes pour les virus pour utiliser la machinerie cellulaire en leur faveur, ce qui n'est d'ailleurs pas sans danger pour la cellule hôte qui les héberge. Pour qu'il puisse infecter une cellule, le virus a besoin de pouvoir y pénétrer. Le spectre d'hôte d'un virus, définissant le(s) type(s) de cellule(s) qu'il a la possibilité d'infecter, est conditionné par les interactions qui ont lieu à la surface des cellules hôtes. Ces interactions peuvent être spécifiques ou non-spécifiques et constituent la clé de ce tropisme. Le modèle du cycle viral du VHC est basé essentiellement sur celui des *Flavivirus*. Après liaison à la surface des cellules, le virus est endocyté par une voie clathrine-dépendante, la membrane virale fusionne ensuite avec celle des endosomes précoces cellulaires conduisant à la libération de l'ARN du VHC dans le cytoplasme. L'étape suivante concerne les brins d'ARN positifs libérés. Une partie de ces ARN sera traduite en protéines, l'autre partie servira de matrice pour la synthèse d'autres ARN. Enfin, les protéines de structure vont s'assembler pour former de nouveaux virions qui seront exportés hors de la cellule. Comme pour les autres virus enveloppés, l'étape d'entrée du VHC dans les cellules peut être subdivisée en plusieurs sous-étapes : i) attachement du virus à la surface des cellules, ii) interaction avec le(s) récepteur(s) spécifique(s) et finalement iii) la fusion des deux enveloppes lipidiques conduisant à l'introduction du génome viral à l'intérieur de la cellule. Ces étapes du cycle viral impliquent des acteurs des deux cotés : les protéines d'enveloppe à la surface du virus et les récepteurs et corécepteurs à la surface des cellules hôtes (*cf.* Figure 13).

i. Attachement et interaction

L'étape d'interaction fait intervenir des molécules cellulaires et d'autres virales. Les glycoprotéines E1 et E2 sont les partenaires les plus logiques du côté du virus pour interagir avec leur(s) récepteur(s) du côté de la cellule du fait de leur présence à la surface des particules C et qu'en leur absence l'infection ne peut pas avoir lieu. La cellule hôte offre un panel de molécules qui pourraient être impliquées dans cette interaction, la liste des candidats de cette interaction n'est encore aujourd'hui pas arrêtée, et le rôle individuel, et *a fortiori*, collectif des molécules décrites demande à être élucidé (*cf.* Figure 14).

La molécule CD81. (Cluster of differentiation 81)

Elle appartient à la famille des tétraspanines. Ces molécules sont impliquées dans des fonctions diverses et variées telles que la morphologie cellulaire, la mobilité, la fusion membranaire ainsi que les voies de signalisation. Une caractéristique majeure de ces molécules est leur capacité à interagir entre elles et avec d'autres protéines transmembranaires, formant ainsi des réseaux membranaires multimoléculaires connus sous le nom de réseau des tétraspanines (82-85). CD81 est la première molécule identifiée à être impliquée dans l'entrée du VHC dans les cellules hôtes. Cette identification était rendue possible grâce à une technique utilisant des fractions solubles de E2, comme sondes (sE2) (86). Différentes études ont ensuite confirmé cette implication. L'utilisation des HCVpp a montré un tropisme étroit pour les lignées hépatocytaires humaines exprimant CD81 (87, 88). Des anticorps anti-CD81, ou encore l'utilisation de certaines fractions solubles de CD81, notamment la large boucle extracellulaire (Large Extracellular Loop (LEL) identifiée comme étant la région responsable de l'interaction avec E2) inhibe l'entrée des HCVpp et des HCVcc dans les lignées cellulaires d'hépatomes (88-93). De plus, l'inhibition de l'expression de CD81 sur la surface cellulaire *via* les ARN d'interférence (siRNA pour « small interfering RNA ») réduit significativement l'entrée des HCVpp dans les cellules Huh-7 (88). D'autre part, l'expression ectopique de CD81 dans des cellules hépatocytaires non-permissives telles que HepG2 rend ces dernières infectables par des particules HCVpp et HCVcc (87, 88, 93-95) (voir tableau réf (96)). Cependant, même si la cible majeure du VHC reste les hépatocytes, son tropisme pour d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T et B (97, 98), les cellules présentant les antigènes (99) ou encore des compartiments tels que le cerveau, a été rapporté. Cet élargissement du tropisme a par ailleurs été attribué à l'expression ubiquitaire de CD81 (86).

Le récepteur SR-B1 (Scavenger Receptor class B type I)

C'est un autre récepteur putatif du VHC. Il s'agit d'une glycoprotéine de surface exprimée dans différents types cellulaires dont les hépatocytes où elle particulièrement élevée. SR-BI a un rôle clé, notamment dans la voie de transport inverse du cholestérol (récupération du cholestérol des lipoprotéines de hautes densité ou HDL) (100). Son implication dans l'étape d'entrée a été suggérée par les tests utilisant sE2 qui montrent une spécificité de liaison SR-BI–sE2. Des études très récentes, employant des tests de complémentation fonctionnelle au

niveau des récepteurs SR-BI, ont apporté la preuve de son rôle positif dans l'entrée de HCVpp et HCVcc dans les cellules permissives (101).

Les lectines L-SIGN et DC-SIGN.

Ce sont des lectines de type C impliquées dans les interactions entre cellules. L'interaction des lectines de type C avec les glycoprotéines de surface a été démontrée pour plusieurs virus (102). Dans le cas du VHC, leur intervention a été suggérée par les essais employant les sE2 qui ont montré des interactions spécifiques. Il faut noter que ces deux molécules ne sont pas exprimées à la surface des cellules hépatiques ; L-SIGN sont essentiellement exprimées dans les cellules endothéliales sinusoïdales du foie et les nœuds lymphatiques, DC-SIGN, quant à elles, sont exprimées dans les cellules dendritiques (103). Il est donc clair que ces molécules ne puissent pas être impliquées dans l'entrée du VHC dans les hépatocytes, leur action serait liée à la capture et la présentation du VHC aux cellules hépatiques (104). Dans la même famille des lectines de type C, les asialoglycoprotéines, exprimées dans les hépatocytes, ont été désignés par l'emploi des HCV-LP comme candidats ayant un rôle dans les étapes précoces du cycle viral (105).

Le récepteur des LDL (rLDL)

Il a été déterminé par centrifugation sur gradient de sucrose suivi par des tests d'immunoprécipitation que les particules de VHC circulantes sont liées à des lipoprotéines de basse et très basse densité (Low et Very Low Density Lipoprotein pour LDL et VLDL) (106). Ceci a confirmé leur implication dans l'entrée du VHC dans les cellules cibles comme l'avait démontré une autre étude auparavant (107).

Les glycoaminoglycanes (GAG).

Ils sont portés par des protéines de surface appelées glycoprotéines. Ils sont connus pour servir de sites d'ancrage pour de nombreux virus pour leur cellules cibles (108). La charge négative qui règne au niveau des GAG suggère une interaction avec les résidus positifs de la partie Nt de gpE2. Des études utilisant les HCV-LP et gpE2 recombinées ont montré que les héparane-sulfate (HSGP pour Heparan Sulfate Glycoproteins) servent de médiateurs dans l'interaction avec les cellules cibles. L'introduction de HSPG solubles inhibe de façon dose-dépendante la fixation des HCV-LP et gpE2 recombinées sur la surface cellulaire. Le traitement à l'héparinase des surfaces des cellules cibles réduit également cette fixation (109). L'utilisation des HCVpp n'a cependant pas pu démontrer cette interaction (110).

La Claudin-1 et l'occludine :

Ce sont les dernières molécules ayant rejoint la liste des corécepteurs potentiels du VHC. Elles forment le complexe composant les jonctions serrées intercellulaires (*Zonula Occludens*). La protéine claudin-1 (Clau-1) est fortement exprimée dans les hépatocytes. Son rôle est de réguler les flux des molécules dans l'espace intercellulaire. Clau-1 a été identifiée dans le contexte de l'interaction VHC – cellule cible grâce à une approche itérative d'expression des protéines dans laquelle des librairies de cDNA ont été criblées pour les facteurs rendant des cellules non-permissives permissives. A l'aide d'anticorps anti-Clau-1 à utilisés à différents temps, il a été démontré que Clau-1 intervenait dans les étapes tardives d'entrée du virus, après l'interaction avec CD81 (111). L'occludine a été identifiée en utilisant la même approche. Son rôle serait essentiel et aurait également lieu dans les étapes tardives d'entrée du virus dans les cellules cibles (112). L'expression d'occludine dans des cellules murines non-permissives rend ces cellules permissives pour HCVpp, il en est de même pour les cellules humaines non-infectables. D'autre part, le « silencing » de l'occludine dans les cellules humaines permissives les rend non-permissives aussi bien pour HCVpp que HCVcc.

Cependant, tous les récepteurs sus-décrits ne sont, ni individuellement ni collectivement, suffisants pour assurer l'entrée du VHC dans une cellule puisque leur expression ectopique dans une cellule non-permissive ne confère pas à cette dernière la susceptibilité de le devenir. L'interaction du VHC avec ses cellules cibles est un processus lent, complexe et se passe en plusieurs étapes nécessitant encore un ou d'autres facteurs agissant en *cis* ou en *trans* pour assurer l'internalisation du VHC dans la cellule.

ii. Endocytose et fusion

Après adsorption sur la surface cellulaire, les particules C sont internalisées *via* une endocytose clathrine-dépendante avec une étape de fusion avec les endosomes précoces. La pénétration par endocytose a été démontrée par des études utilisant le HCVcc qui a révélé que le phénomène était pH-dépendant. En effet, des inhibiteurs d'acidification des endosomes tels que la concanamycine A, le chlorure d'ammonium, la bafilomycine ou encore la chloroquine, bloquent l'endocytose des HCVcc dans les cellules Huh-7 (113-115). Par ailleurs, l'utilisation des siRNA ciblant la clathrine a permis de montrer que l'endocytose

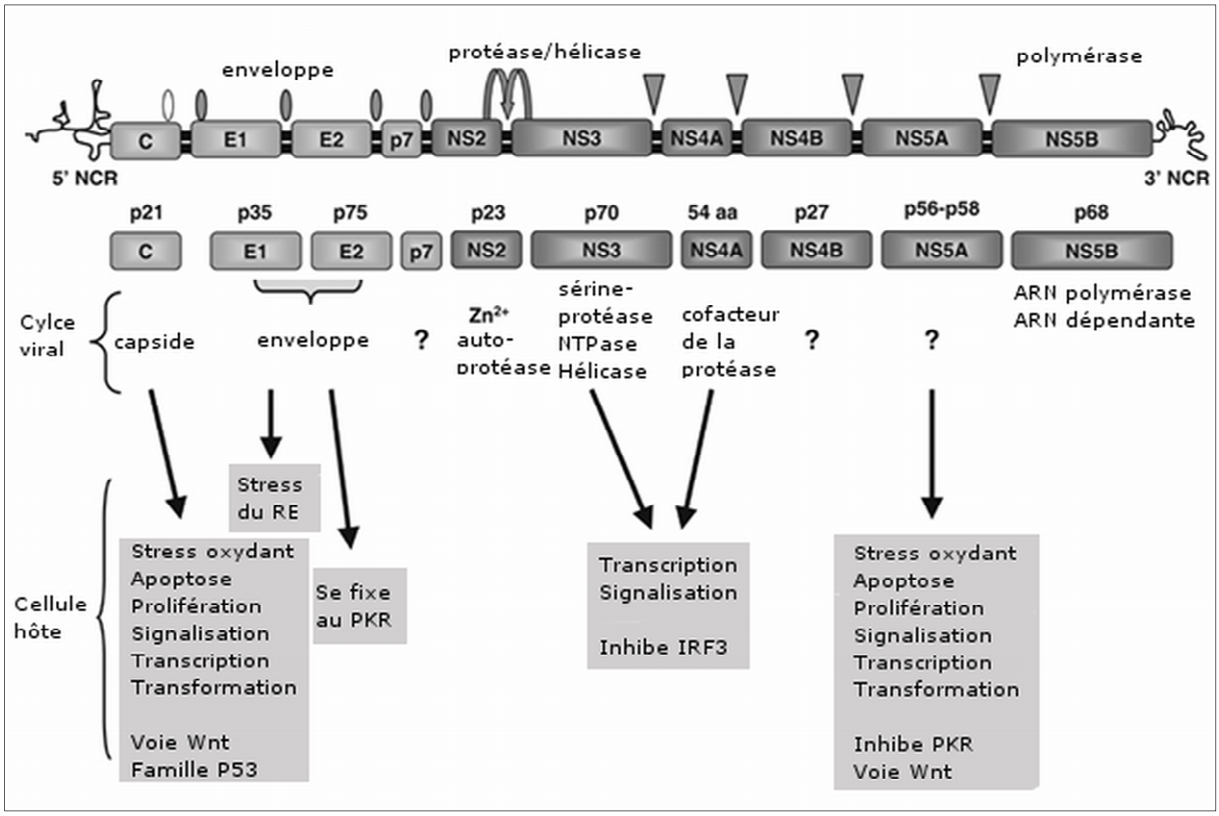


Figure 15 : Protéines du VHC. Organisation génétique et clivage de la polyprotéine. L'ARN simple brin positif de 9,6kb est composé de régions non-codantes (NCR), un long cadre de lecture ouvert codant une polyprotéine précurseur de 3000 acides aminés et une 3' NCR. La polyprotéine est clivée en protéines structurales et non structurales par des enzymes cellulaires et virales. Les cercles pleins désignent les sites de clivage par la signal peptidase du RE. Les cercles vides désignent le site de clivage supplémentaire de la protéine de la capside par la signal peptidase. Les têtes de flèches désignent les clivages par les protéases NS2-3 et NS3. En plus de leur rôle dans le cycle viral, les protéines du VHC interagissent plusieurs facteurs cellulaires et affectent de nombreuses activités cellulaires, comprenant la les voies de signalisation, la modulation de la transcription, transformation, apoptose, réarrangements membranaires, transport vésiculaire et la régulation de la traduction (116).

était dépendante de la clathrine (115, 117). Enfin, une approche utilisant des mutants dominants négatifs de protéines intervenant dans l'endocytose a suggéré que la fusion du virus se faisait avec les endosomes précoces et non les endosomes tardifs (117).

iii. Traduction du génome viral et production de la polyprotéine

Une fois dans le cytoplasme, l'ARN viral est directement traduit en une seule polyprotéine d'environ 3000 (3010 – 3033) aminoacides. La traduction, indépendante de la coiffe, est initiée grâce à l'IRES qui forme un complexe binaire avec la sous-unité 40S du ribosome. Ensuite, il se forme un premier complexe au niveau du codon d'initiation AUG en position 342 après association du facteur eucaryote d'initiation de la traduction 3 (eIF3) et un second après le recrutement de eIF2 (eIF2•Met-tRNAi•GTP). Enfin, l'association GTP-dépendante de la sous-unité 60S pour former le complexe 80S (118). L'activité de l'IRES est modulée par plusieurs facteurs, notamment la région X très conservée de la 3'NTR du virus. Des protéines cellulaires seraient également impliquées telles que la PTB (polypyrimidine tract binding protein) et l'autoantigène « La » qui protégerait les ARN viraux de la dégradation (119). Cependant, les mécanismes d'action des différents facteurs impliqués sont encore mal connus.

iv. Clivage de la polyprotéine

La polyprotéine est clivée pour donner 10 protéines virales, 4 structurales (Capside C, glycoprotéine de l'enveloppe E1, glycoprotéine de l'enveloppe E2 et la petite protéine p7) et 6 non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Les enzymes responsables du clivage sont d'origine cellulaire (la signal-peptidase du RE pour les protéines structurales) et virale (les protéases NS2-3 et NS3-4 pour les protéines non structurales). Ces enzymes agissent de manière co- et post-traductionnelle, ce qui permet une régulation temporelle de l'expression des différentes protéines. Une onzième protéine issue du décalage du cadre de lecture dans le gène de la capside peut être produite elle est appelée F ou ARFP (pour Alternative Reading Frameshift Protein) mais on ne connait pas encore sa fonction (*cf.* Figure 15).

v. Réplication du génome viral

Une caractéristique des virus à ARN positif est la formation de complexes de réplication associés aux membranes (*cf.* plus haut). Ces complexes sont composés de protéines virales, d'ARN en cours de réplication et de structures de membranaires altérées dont le type dépend du virus impliqué (RE, Golgi, mitochondries, lysosomes). Différents rôles ont été attribués à ces structures : elles pourraient servir de support physique pour le complexe de réplication (120), concentration locale des éléments nécessaires à la réplication (121), provision des constituants lipidiques nécessaires pour la réplication, ancrage de l'ARN viral lors de son déroulement, protection de l'ARN viral contre les défenses cellulaires (80). L'observation par microscopie électronique du site de réplication dans le foie de chimpanzé infecté par le VHC révèle la formation d'inclusions spongiformes au niveau des sites de réplication de l'ARN. Des structures similaires ont été observées dans les cellules Huh-7 infectées par le réplicon subgénomique. Ces structures seraient originaires du RE et seraient induites par NS4B, elles forment le réseau membranaire (50, 122, 123). Il existe plusieurs facteurs qui moduleraient la réplication du VHC. Ainsi, il a été montré qu'*in vitro* la réplication du VHC était stimulée par les acides gras saturés et mono-insaturés, alors qu'elle était inhibée par les acides gras poly-insaturés et la synthèse des acides gras. La réplication est également inhibée par cyclosporine A (CsA) qui a comme substrat la cyclophiline B (CsB) qui elle stimule l'activité de la NS5B en favorisant sa fixation sur l'ARN (124). Il a été montré d'autre part, le rôle d'autres protéines, notamment la FKBP8 (membre de la famille des « FK506-binding proteins ») et la Hsp90 (protéine du choc thermique) (125).

vi. Assemblage et sécrétion des particules virales

Les connaissances relatives aux étapes tardives du cycle viral sont très limitées à cause du retard dans le développement d'un système permettant la production de particules virales C. Les nouveaux virions seraient issus du bourgeonnement des membranes du RE ou des compartiments dérivées du RE, et quitteraient la cellule en empruntant la voie de sécrétion.

Comme il a été précédemment décrit (*cf.* § rLDL ci-dessus), les particules infectieuses C circulant dans le sérum sont étroitement liées aux (V)LDL qui seraient même une partie intégrale du virus (126). La production et la sécrétion des particules virales C par les cellules Huh-7 dépend de bon fonctionnement du processus d'assemblage et de sécrétion des VLDL puisque le blocage de ce processus bloque également la sécrétion des particules du VHC

(127). De plus la densité des particules virales intracellulaires produites *in vitro* est beaucoup plus élevée que celle des HCVcc sécrétées (128, 129). Ces données expliquent l'origine de la très faible densité des particules C infectieuses sériques et le rôle des lipoprotéines dans l'entrée du virus dans les cellules.

d. Modèles d'études du VHC

i. Les modèles *in vivo*

L'unique modèle animal permettant l'étude du virus de l'hépatite C est le chimpanzé. Mais pour des raisons éthiques, de disponibilités mais aussi de coût, l'utilisation de tels modèles reste très limitée. La nécessité de trouver un petit animal modèle pour l'étude de l'infection au VHC ainsi que les complications liées à cette infection reste une priorité absolue. Actuellement, le tupaïa (*Tupaia belangeri chinensis*) est le seul petit-animal modèle qui, après une sévère immunosuppression, a pu être infecté avec succès par du VHC (130). Ceci a permis de ne comprendre que certains aspects de l'infection par le VHC car l'infection ne persiste jamais. Des souris immunodéficientes ou encore transgéniques ont pu être créées, elles offrent la possibilité d'étudier l'infection dans des hépatocytes *in vivo* et cela permet également d'étudier l'interaction virus-cellules hôtes, l'effet de l'expression de certains gènes du VHC *in vivo* etc. (131-133).

ii. Les modèles *in vitro*

Différents modèles d'études *in vitro* ont été mis au point pour l'étude du cycle de réplication du VHC. Cependant, ils ne permettent pour la plupart l'étude que de parties isolées du cycle viral.

Les *Flavivirus* ainsi que les *Pestivirus* infectent une variété de lignées cellulaires mais qui se sont révélées non compétentes pour la réplication du VHC. De ce fait, le choix des lignées cellulaires à utiliser s'est limité aux types de cellules qui sont connues être infectées *in vivo* par le VHC notamment les hépatocytes et certaines lignées des lymphocytes B et T.

On connait deux modes d'infection *in vitro*, l'infection par du matériel positif au VHC (ex. sérums de patients positifs au VHC) et l'infection par des clones moléculaires du génome du VHC.

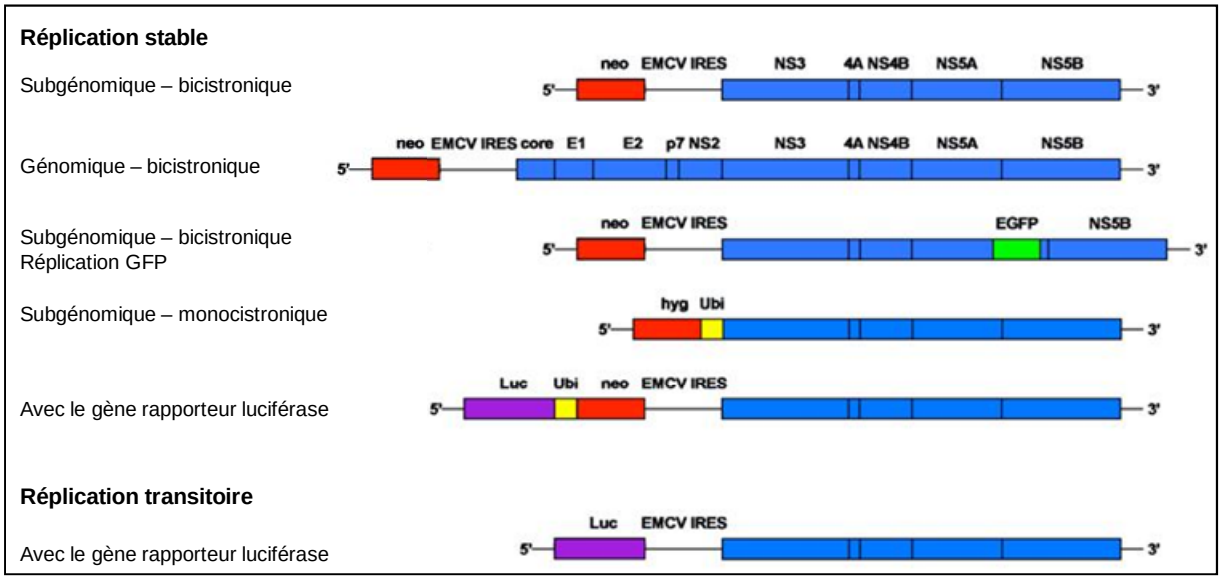


Figure 16 : Comparaison des différents systèmes de réplicons: représentation schématique de différentes constructions de réplicons mono / bicistroniques, subgénomiques / génomiques du VHC. Les systèmes de réplication stables sont équipés, entre autres, de gènes de résistance aux antibiotiques pour la sélection des clones positifs. Les systèmes transitoires de transfection portent un gène marqueur (en général, luciférase) qui permet la quantification du virus 48h après la transfection transitoire. Les réplicons monocistroniques contiennent un seul IRES (celui du VHC). Le gène de résistance est libéré après clivage *via* une séquence ubiquitine (Ubi) (134).

- HCV-LP et HCVpp

Les premiers outils développés pour l'étude du cycle viral sont les HCV-LP (HCV like particles) et les HCVpp (HCV pseudoparticles) : Les HCVpp sont des particules issues de l'assemblage de E1 et gpE2 du VHC sur les protéines de capside de lentivirus ou rétrovirus [rétrovirus murin MLV]. Les particules générées sont infectieuses et la présence de la GFP (Green Fluorescent Protein) permet de suivre l'infectivité de façon rapide et fiable (135). Les deux systèmes ont permis de comprendre certains aspects du cycle viral : identification des protéines nécessaires pour la constitution de l'enveloppe virale, mécanismes d'assemblage des particules virales, étude de l'encapsidation, rôle de E1 et gpE2 dans l'infectivité, ainsi que d'autres mécanismes d'interaction du virus avec la cellule hôte (135, 136).

- Les réplicons

Le réplicon subgénomique prototype est issu d'un clone du VHC de génotype 1b nommé Con1. Dans ce système, la partie codant pour les protéines structurales est remplacée par un gène de résistance à un antibiotique (G418 – Généticine) qui inhibe l'étape d'élongation de la chaine peptidique chez les procaryotes et les eucaryotes. L'expression des protéines non structurales est rendue possible grâce à l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). Après transfection des cellules Huh-7, les colonies résistantes à la G418 contiendront l'ARN auto-réplicatif du VHC. Cependant, l'efficacité d'un tel système est basée sur la sélection des mutations adaptatives qui augmentent de façon considérable l'initiation de la réplication (54, 56). Ainsi, le système réplicon a permis l'étude de la réplication *in vitro* du VHC, certaines bases structurales des complexes de réplication, les interactions virus – cellule hôte et l'effet de certains antiviraux (137). Cependant, ce système ne permettait pas d'étudier les étapes relatives à l'entrée du virus ni la formation et la libération des nouveaux virions (*cf.* Figure 16) (134). En réponse à cette lacune, Wakita *et al.* ont réussi à générer un réplicon génomique appelé JFH-1 (pour *Japanese Fulminant Hepatitis*) (138). Les particules générées par ce systèmes appelées HCVcc (pour HCV cell – culture – grown) sont capables de se répliquer dans différents types cellulaires et sont de surcroit infectieuses pouvant être passées d'une culture cellulaire à une autre. Le HCVcc constitue la dernière découverte dans le domaine des modèles *in vitro* permettant la réplication du VHC et donc la possibilité d'étudier les différentes étapes du cycle viral. Différentes mutations ont été ensuite apportées pour améliorer l'infectivité et l'efficacité de réplication des HCVcc

(90, 95, 139, 140). Le système HCVcc présente cependant certaines limitations : (i) étude du génotype 2a seulement (80), (ii) avec un seul type cellulaire et ses dérivés (80), (iii) HCVcc ne répond pas de la même façon que VHC authentique, en effet, le HCVcc montre que le génotype 2 est plus résistant que le génotype 1, contrairement à ce qui est observé cliniquement (141). La recherche d'un nouveau modèle reste une priorité.

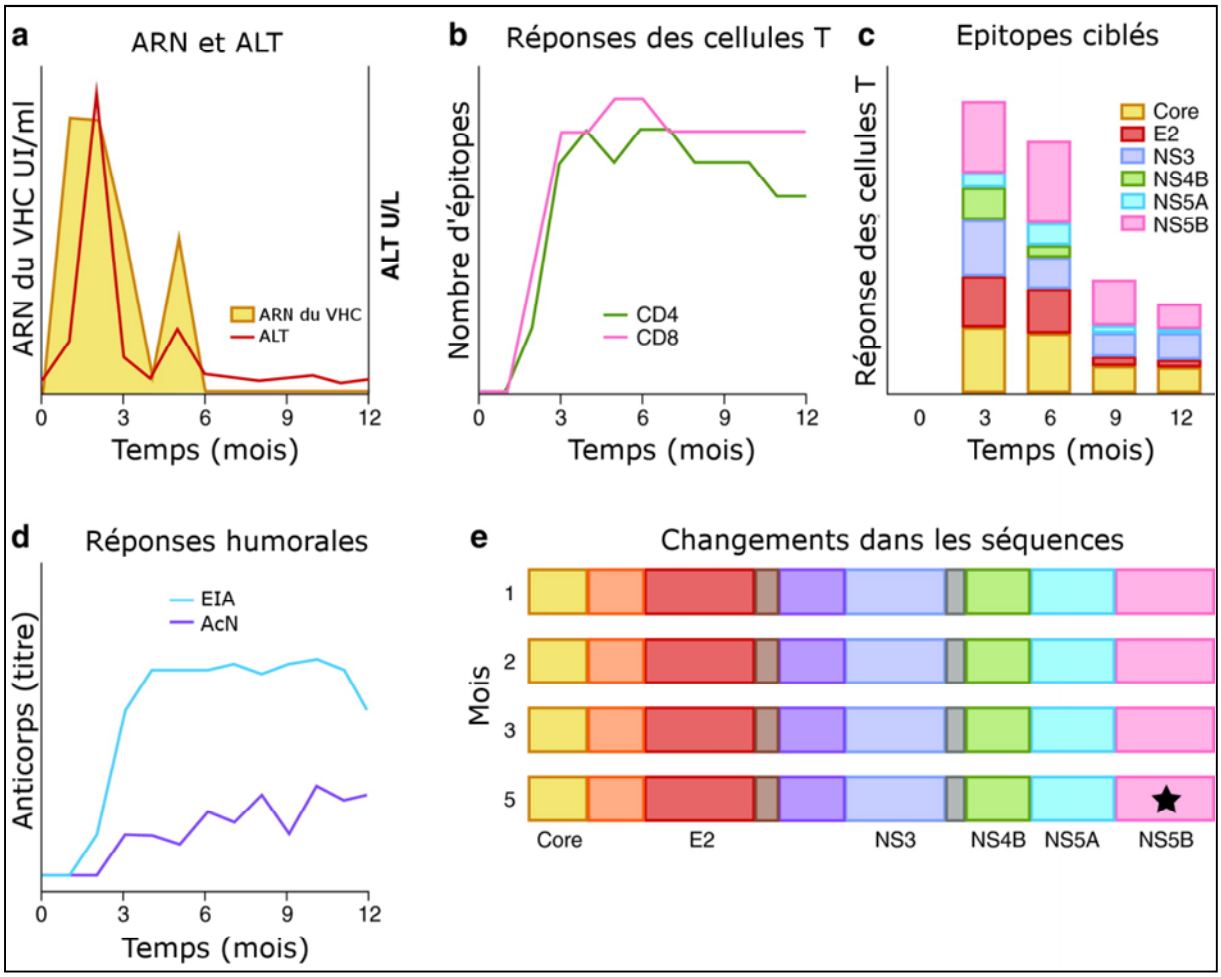


Figure 17 : Caractéristiques virologiques et immunologiques d'une infection à VHC à résolution spontanée. (a) Profils de l'ARN viral et de l'ALT (alanine transaminase) libérée par les hépatocytes infectés/morts. Le niveau de l'ALT est élevé lors du premier contrôle immunologique de l'infection provoquant la chute du titre de l'ARN viral. (b) Profils des réponses des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$. Les cellules T reconnaissent un certain nombre d'épitopes du virus et apparaissent dans le foie et le sang périphérique. Les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ restent très actives pendant et même après la résolution de la virémie. (c) Les infections sont étroitement associées aux réponses cellulaires T ciblant de multiples protéines virale. Le nombre des cellules T répondant à l'infection peut diminuer après la résolution de l'infection. (d) Les réponses humorales (EIA: enzyme immunoassay) ciblant les protéines du VHC sont détectées après le début de la réponse cellulaire et les lésions du foie. La réponse par les anticorps neutralisants (AcN) peut être faible dans le cas d'une infection à résolution spontanée. (e) Les changements dans les séquences des protéines virales au cours de l'infection sont indiqués par une étoile. L'évolution du virus est typiquement limitée au cours de l'infection à résolution spontanée; les mutations d'évasion au niveau des épitopes peuvent être associées à la résurgence de l'ARN viral (142).

5. Réponse de l'hôte à l'infection virale

L'infection au VHC est caractérisée par un large panel de manifestations cliniques incluant le portage chronique asymptomatique, les hépatites aigüe et chronique ainsi que leurs complications (cirrhose et carcinome hépatocellulaire), les pathologies extra-hépatiques et les manifestations immunopathologiques. L'infection est également caractérisée par des signes cliniques extra-hépatiques qui d'ailleurs représentent les premiers signes de la maladie. Contrairement à une infection au virus de l'hépatite B, dans la majorité des cas (60% - 80%), l'infection par une hépatite C évolue vers la chronicité, et une fois la chronicité installée, il n'y a plus d'élimination spontanée du virus (143, 144). Les Caractéristiques virologiques et immunologiques d'une infection au VHC sont différentes selon qu'il s'agisse d'une infection à résolution spontanée ou persistante, elles sont rappelées dans les figures ci-dessous (*cf.* Figure 17, Figure 18 et Figure 19).

Les défenses de l'hôte contre les pathogènes sont deux types : immunité naturelle et immunité acquise. L'immunité naturelle constitue la première ligne de défense, assurant une réponse rapide. L'immunité adaptative est plus lente, mais plus spécifique ; elle est assurée par les cellules B et T qui confèrent une protection de longue durée contre l'infection. Le VHC interagit avec les différents acteurs impliqués dans ces réponses aussi bien dans sa forme particulaire que ses formes réplicative et traductionnelle. Les mécanismes d'interaction du VHC avec son hôte peuvent être divisés en deux types : i) défensifs et offensifs. Les mécanismes défensifs consistent en différentes stratégies d'évasion dites « passives » (échappement par mutations au niveau des protéines structurales et non structurales). Les stratégies « offensives » se définissent, quant à elles, par le rôle qu'ont certaines protéines virales à réduire, voire inhiber certains mécanismes fondamentaux de défense de l'hôte aussi bien de type cellulaire qu'humorale. La défense de l'hôte vis-à-vis de cette agression est de deux formes : naturelle, non spécifique et acquise spécifique.

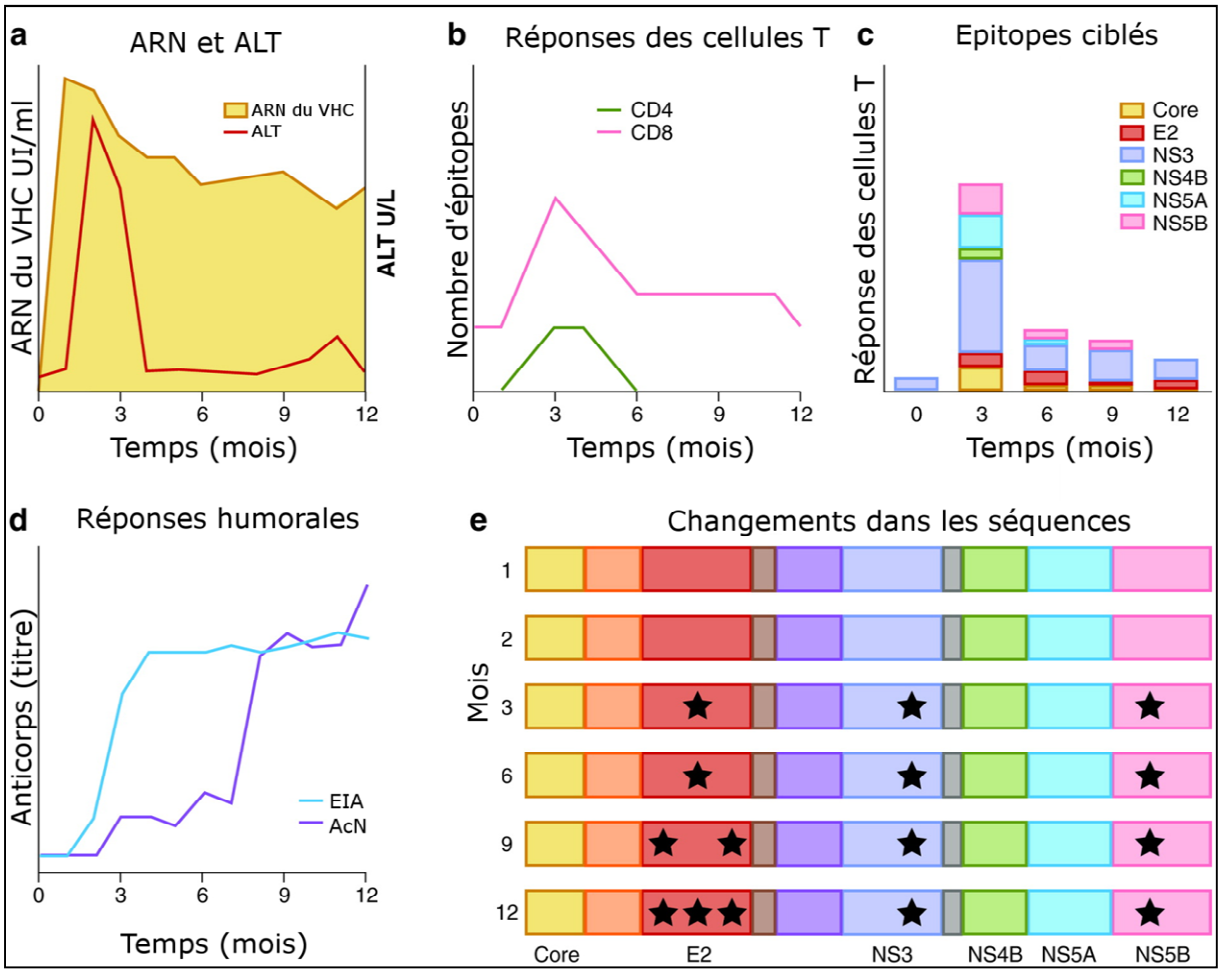


Figure 18 : Caractéristiques virologiques et immunologiques d'une infection persistante. (a) Profils de l'ARN viral et de l'ALT. A ce stade le niveau de l'ALT est élevé, le contrôle immunologique précoce provoque la chute du titre de l'ARN viral. L'ARN viral sérique peut diminuer, voire parfois disparaître, mais ce contrôle immunologique n'est pas complètement efficace. (b) profils des réponses des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ intra-hépatiques et du sang périphériques. Le nombre d'épitopes ciblés par les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ peut au départ être similaire à une infection à résolution spontanée, mais les réponses ne sont pas soutenues. Les réponses par les cellules T $CD4^+$ peut diminuer jusqu'à devenir indétectables. (c) Dans les infections persistantes, le nombre d'épitopes ciblés et l'intensité de la réponse peuvent diminuer avec le temps. (d) Les réponses humorales (EIA: enzyme immunoassay) ciblant les protéines du VHC sont détectées après le début de la réponse cellulaire et les lésions du foie. La réponse par les anticorps neutralisants (AcN) est retardée par les réponses humorales mais sont facilement détectables dans une infection chronique. (e) Les changements dans les séquences des protéines virales au cours de l'infection sont indiqués par une étoile. Les mutations d'évasion au niveau des épitopes ciblés par les cellules T surviennent au cours des premiers mois de l'infection. Les mutations d'évasion au niveau des épitopes ciblés par les AcN continuent à s'accumuler au cours de l'infection chronique (142).

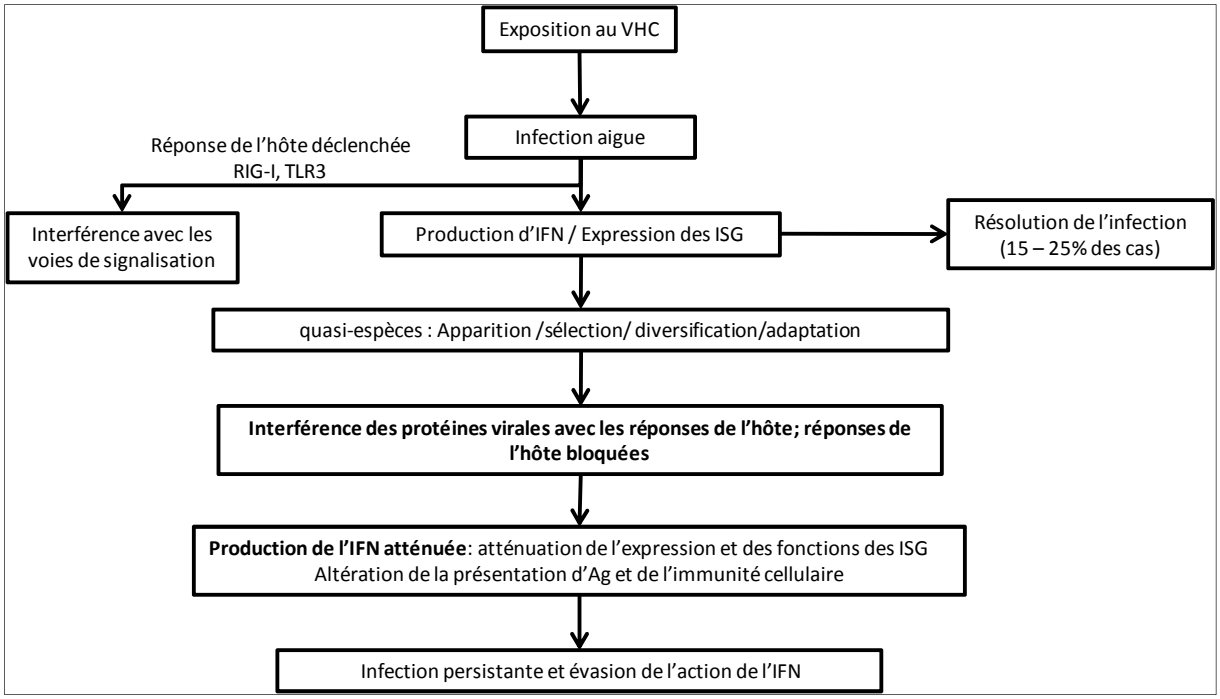


Figure 19 : Diagramme montrant comment les interactions VHC – cellule-hôte peuvent définir l'évolution de l'infection à partir de la phase aigue. D'après (145).

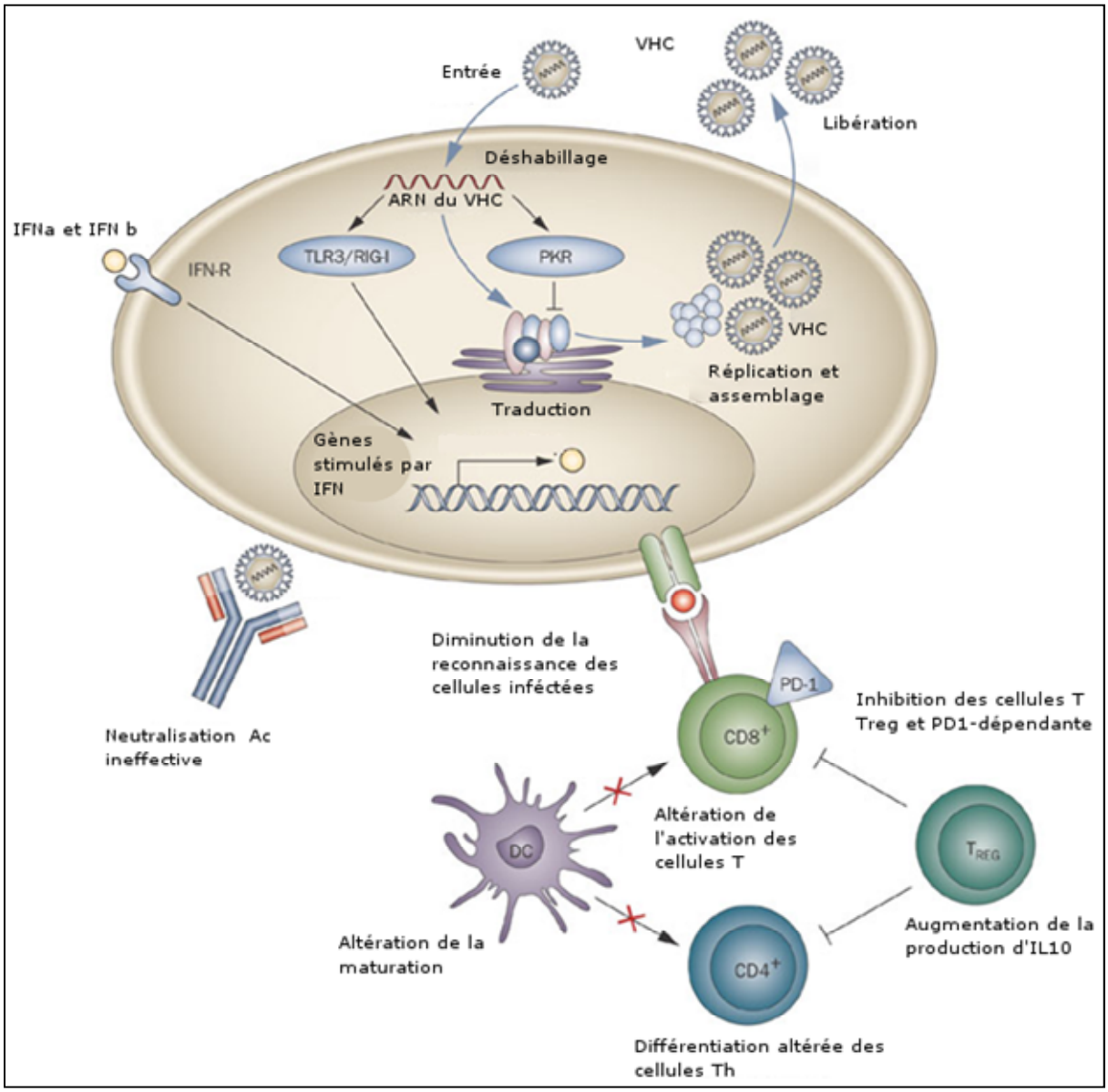


Figure 20 : Le cycle viral et les principales voies de défense cellulaire. Le cycle viral (flèches bleues) commence par l'entrée dans la cellule hôte, suivi par le déshabillage de la particule du VHC. La présence de l'ARN viral double brin dans le cytoplasme induit différents mécanismes antiviraux incluant l'activation de PKR, TLR3 et RIG-I, qui mène éventuellement à la libération de l'IFN (flèches noires). Les protéines non-structurales et structurales générées par la traduction du brin positif sont critiques pour la réplication et l'assemblage respectivement. Sont schématisés également les composants de la réponse immunitaire adaptative et les altérations des voies cellulaires associées à l'infection au VHC. Le VHC altère la fonction des cellules dendritiques, et limite leur capacité à stimuler une réponse immunitaire spécifique dans les cellules CD4+ et CD8+. Une régulation positive de PD-1 et une augmentation de la production d'IL-10 altèrent la fonction des cellules T ce qui facilite l'évasion immunitaire du VHC. DC: cellules dendritiques; IFN : interféron; IL-10 : interleukine 10 ; PKR : double stranded RNA-activated protein kinase ; T_{REG} : cellules T régulatrices (146).

a. Les réponses innées

i. La réponse antivirale intracellulaire

Dans la cellule, le VHC se trouve confronté à la défense antivirale cellulaire avec laquelle il interagit de manière très complexe. Les premières évènements suivant l'infection consisteraient à l'activation des voies de signalisation qui aboutissent à la synthèse des interférons de type I ainsi que d'autres produits des gènes stimulés par l'interféron (ISG pour « Interferon Stimulated Genes ») à forte activité antivirale, ces voies sont tout de suite bloquées du fait de l'accumulation des protéines virales notamment NS3A/4 sérine protéase dans la cellule (145, 147). En cas d'infection, le facteur de transcription régulateur de l'interféron (IRF-3) est activé (phosphorylation + dimérisation) puis exporté vers le noyau. Dans le noyau, l'IRF-3 induit, en coordination avec d'autres facteurs de transcription, NF-kB et ATF-2/c-Jun, la transcription et la synthèse de l'INF-β. Ce dernier active à son tour la voie de signalisation JAK-STAT qui induit la synthèse la l'IFN-α et des dizaines d'autres ISG (148).

La phosphorylation induisant l'activation de l'IRF-3 en réponse à la détection d'ARN doubles brin dans la cellule se passe par deux voies distinctes, toutes les deux activées par les récepteurs de PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) : (i) la voie TLR-3 (toll-like receptor 3) et (ii) la voie RIG-I (cellular RNA helicase, retinoic acid-inducible gene). La protéase NS3/4A bloque les deux voies de phosphorylation par protéolyse spécifique des protéines intervenant dans la transduction du signal (146, 149) (*cf.* Figure 20).

ii. La réponse cellulaire innée

Le foie est très riche en cellules NK (Natural Killer) et en lymphocytes T NK qui jouent un rôle important dans le contrôle de la réplication du VHC, la régulation de la réponse spécifique *via* la maturation des cellules dendritiques (CD) et l'évolution du foie vers l'inflammation et la fibrose (150-152). Une infection chronique par le VHC semble aboutir à une altération complète des cellules NK et ce, par différents mécanismes : altération des signaux d'activation provenant des CD, augmentation des niveaux des ligands inhibiteurs de HLA iii) silencing fonctionnel des cellules NK $CD81^+$ par ligation à E2 du VHC (153-156). Le rôle des TNK reste cependant à élucider aussi bien pour la phase aigue que chronique de l'infection.

Les CD myéloïdes et plasmacytoïdes sont les principales usines à interféron et agissent dans l'interface des réponses innée et adaptative pouvant ainsi réguler le tempo et la force des

deux réponses à l'infection. La protéine C du VHC agit en réduisant le nombre des CD ainsi que la quantité d'interféron produite par ces cellules (157-159).

b. Les réponses immunitaires adaptatives

Il est clair que le VHC induit chez l'hôte une réponse immunitaire spécifique puisque des anticorps sont générés chez certaines personnes infectées, et qui peuvent bloquer l'infectivité chez le chimpanzé et en culture cellulaire. Le rôle protecteur des anticorps reste cependant incertain. En effet, il a été démontré que la guérison peut avoir lieu chez des patients ayant des titres très faibles, voire indétectables, d'anticorps, et que ces anticorps ne pouvaient pas assurer systématiquement la protection en cas d'une seconde infection. Par ailleurs, le rôle de la réponse cellulaire adaptative n'est pas discutable dans le devenir d'une infection au VHC, mais ce qui n'est pas encore élucidé sont les mécanismes d'évasion du VHC des cellules T ce qui facilite la persistance chez la plupart des patients et les chimpanzés, mais aussi la contribution de la réponse cellulaire à la progression de l'infection du foie (149).

i. Les réponses humorales

L'intervalle entre le premier contact avec le VHC et la séroconversion chez le sujet contaminé varie entre une et deux semaines en moyenne, lorsque l'infection se fait par transfusion, hémodialyse ou blessure par piqûre, elle d'environ six semaines en cas d'infection par utilisation de drogue intraveineuses. Le titre des anticorps au cours de la phase aigue sont généralement faibles, indépendamment de l'évolution de l'infection, et augmentent souvent chez les patients qui évoluent vers la chronicité. Cependant, la guérison est souvent associée à une baisse de titre des anticorps qui peut finir par disparaître.

Différents travaux ont été effectués dans le but d'étudier la possibilité de neutraliser le VHC par des anticorps et les résultats sont discordants du fait de l'absence d'un modèle permettant la réplication des particules virales authentiques. Le VHC semble être sensible à la neutralisation par anticorps, d'après des expériences effectuées chez les chimpanzés par des stratégies de neutralisation réalisées *in vivo* et *in vitro* (160, 161), et en utilisant des pseudoparticules. Il a été noté une production d'anticorps neutralisants chez certains individus qui réussissent à guérir de l'infection aigue C, tandis que chez d'autres patients une absence de réponse humorale a pu être notée, ce qui ne permettait pas d'argumenter pour leur contribution certaine dans le devenir de l'infection. De plus, l'infection ne confère

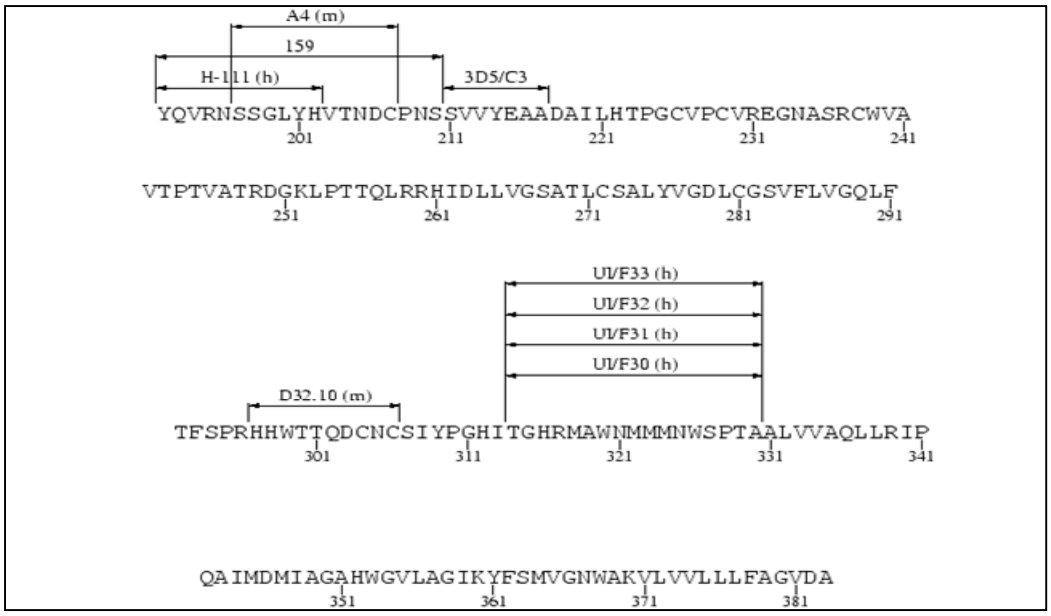


Figure 21 : Carte de la séquence de E1 reconnue par l'anticorps D32.10. Les noms des anticorps monoclonaux (Acm) et les positions des sites de fixation des 21 aminoacides ou moins sont indiqués relativement à la séquence protéique du clone H77. Cette carte fournit la position relative des épitopes sur une protéine donnée. Au-dessus de chaque site linéaire de fixation, le nom de l'Acm est donné, suivi de l'espèce concernée en lettre entre parenthèses. L'humain est représenté par 'h', non humain par 'p', murin par 'm' et les autres par 'o' (162).

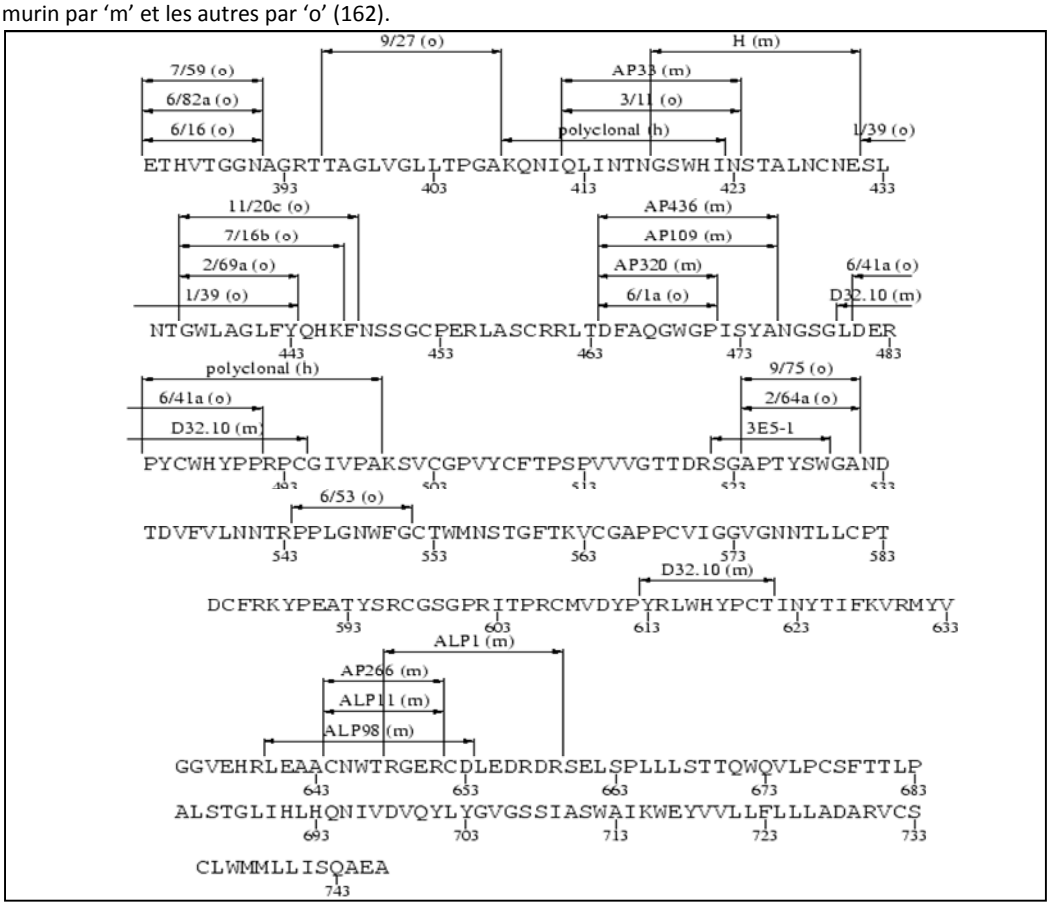


Figure 22 : Carte de la séquence de E2 reconnue par l'anticorps D32.10. Les noms des anticorps monoclonaux (Acm) et les positions des sites de fixation des 21 aminoacides ou moins sont indiqués relativement à la séquence protéique du clone H77. Cette carte fournit la position relative des épitopes sur une protéine donnée. Au-dessus de chaque site linéaire de fixation, le nom de l'Acm est donné, suivi de l'espèce concernée en lettre entre parenthèses. L'humain est représenté par 'h', murin par 'm' et les autres par 'o' (162).

pas une immunité protectrice stérilisante chez les personnes ayant guéri en cas de réinfection (163, 164).

ii. Les épitopes neutralisants

Les épitopes neutralisants n'ont pas été trouvés dans E1 mais de multiples épitopes impliqués dans l'infectivité *in vivo* et *in vitro* ont été identifiés sur gpE2. Les premiers travaux se focalisaient sur la région HVR1 dans l'idée qu'elle serait assujettie à la pression de sélection par les anticorps (165). Un sérum hyper-immun contre ce domaine de E2 neutralisait l'infectivité chez le chimpanzé (160) et en culture cellulaire (166), et la guérison d'une infection C aigue chez l'homme était corrélée une réponse anticorps vis-à-vis de ce domaine avec/sans une diversification limitée des épitopes (165). Cependant, cette corrélation avec l'évolution de l'infection n'a pu être faite chez le chimpanzé, et les anticorps anti-HVR coexistaient souvent avec une réplication persistante du VHC (165). A l'aide d'anticorps monoclonaux, issus soit d'hybridomes (167, 168) soit de librairies combinatoires de fragments Fab humains (169) et reconnaissant des épitopes conformationnels situés à l'extérieur de HVR1, certains auteurs ont rapporté un pouvoir neutralisant/bloquant très puissant, même si on ignore encore si ces anticorps sont liés à la guérison ou sont produits également chez les patients qui évoluent à la chronicité.

Un anticorps particulièrement intéressant a été développé et caractérisé, il reconnait un déterminant discontinu hautement conservé sur E1 et E2 (E1 : 297-306, E2 : 480-494 and E2 : 613-621) exprimé à la surface des particules du VHC sériques (HCVsp) des génotypes 1a, 1b, 2a et 3a (162). Cet anticorps monoclonal, dénommé D32.10, semble intervenir dans les interactions entre HCVsp et les sites de fixation/interaction avec la cellule (170-172), et pourrait, de ce fait, servir d'anticorps neutralisant ou protecteur de l'infection au VHC (173). (*cf.* Figure 21 et Figure 22).

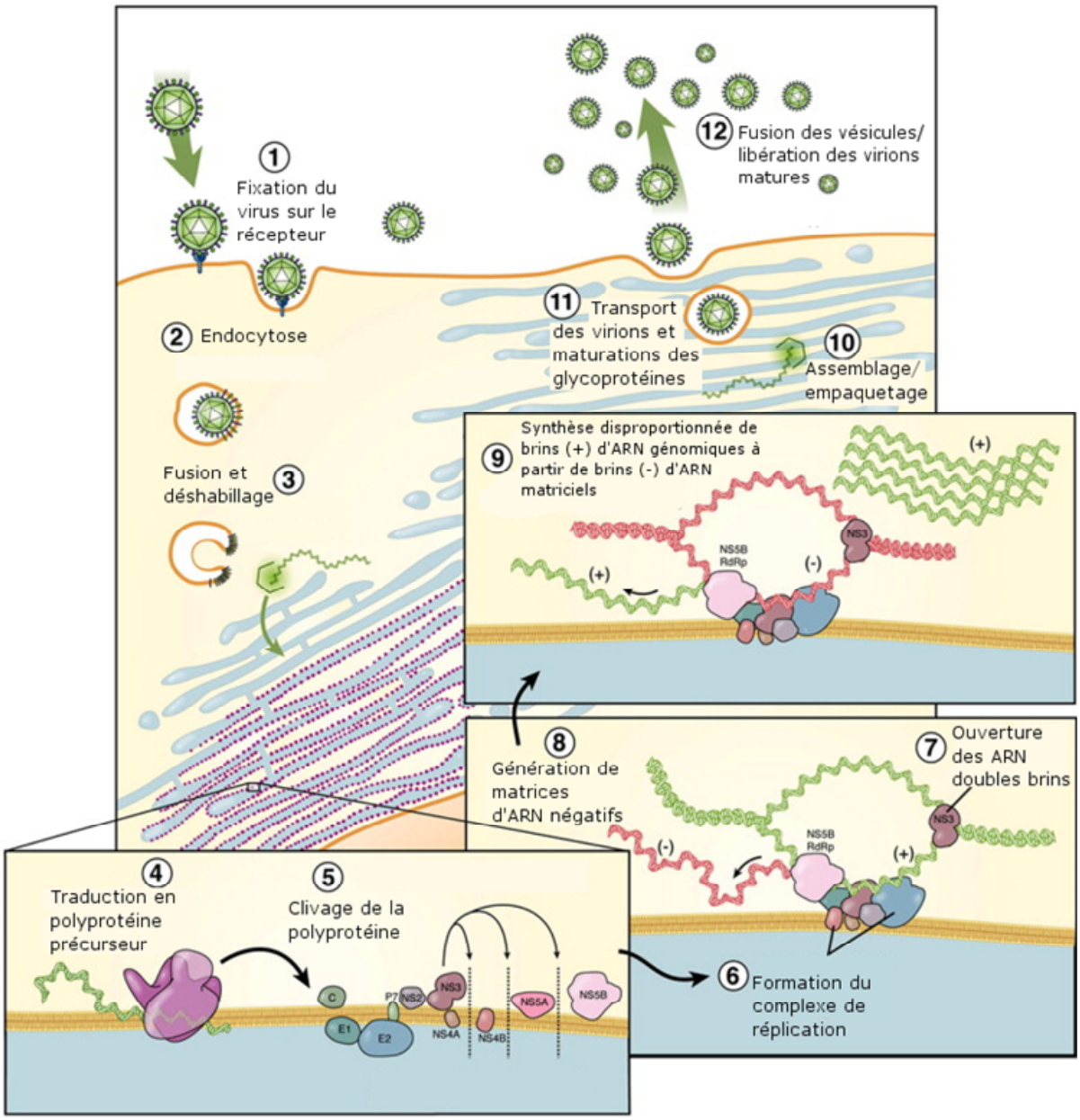


Figure 23 : Représentation schématique du cycle du VHC. Chaque étape du cycle viral offre une variété de cibles potentielles pour de nouvelles classes de médicaments (174).

6. Traitement et antiviraux

Le traitement standard contre le virus de l'hépatite C (combinaison de l'interféron-α et la ribavirine) est d'une efficacité limitée, une faible tolérance, et un coût élevé. De nouvelles options plus efficaces et moins toxiques sont très attendues. Les traitements qui vont apparaître ne semblent pas substituer l'interféron-α pégylé et la ribavirine mais sont plutôt prévus être utilisés en combinaison. Ni l'interféron alpha ni la ribaviron n'ont été développés spécifiquement contre l'infection due au VHC et leurs mécanisme d'action ne sont complètement élucidés et semblent faire intervenir des mécanismes immunomédulateurs et effets antiviraux (175). La majorité des programmes de développement de molécules antivirales ont comme cible les différentes étapes du cycle de réplication du VHC (stratégie STAT-C : « Specifically Targeted Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C »), notamment l'initiation de la traduction (par oligonucléotides antisens ou ribozymes synthétiques), le clivage (inhibiteurs de la sérine protéase), et la synthèse de l'ARN viral (RdRp) ; mais les avancées dans ce domaine sont encore aujourd'hui entravées à cause de l'absence d'un système de réplication *in vivo* efficace. Le marché mondial du traitement anti-HCV est estimé aujourd'hui à environ 8 milliards de dollars et devrait dépasser les 9 milliards de dollars (estimation du « European AIDS Treatment Group EATG » http://www.eatg.org/) (*cf.* les cibles potentielles pour de nouvelles classes de drogues sont indiquées dans la Figure 23).

L'évolution de l'hépatite C chronique n'est pas uniforme d'un patient à un autre ni en terme de rapidité ni en terme d'intensité, cette différence est d'autant plus importante si on prend en compte la consommation de l'alcool, la surcharge pondérale, le diabète, l'âge qui jouent un rôle important dans l'évolution de la lésion. C'est pourquoi le traitement doit être au cas par cas. Le principal objectif du traitement du VHC est la réduction de la morbidité et la mortalité liée à la fibrose hépatique qui peut évoluer en cirrhose puis en carcinome hépatocellulaire. Il doit avoir une action multiple, faire régresser ou au mieux prévenir l'installation d'une fibrose/cirrhose, prévenir le carcinome hépatocellulaire et éviter l'indication de transplantation hépatique.

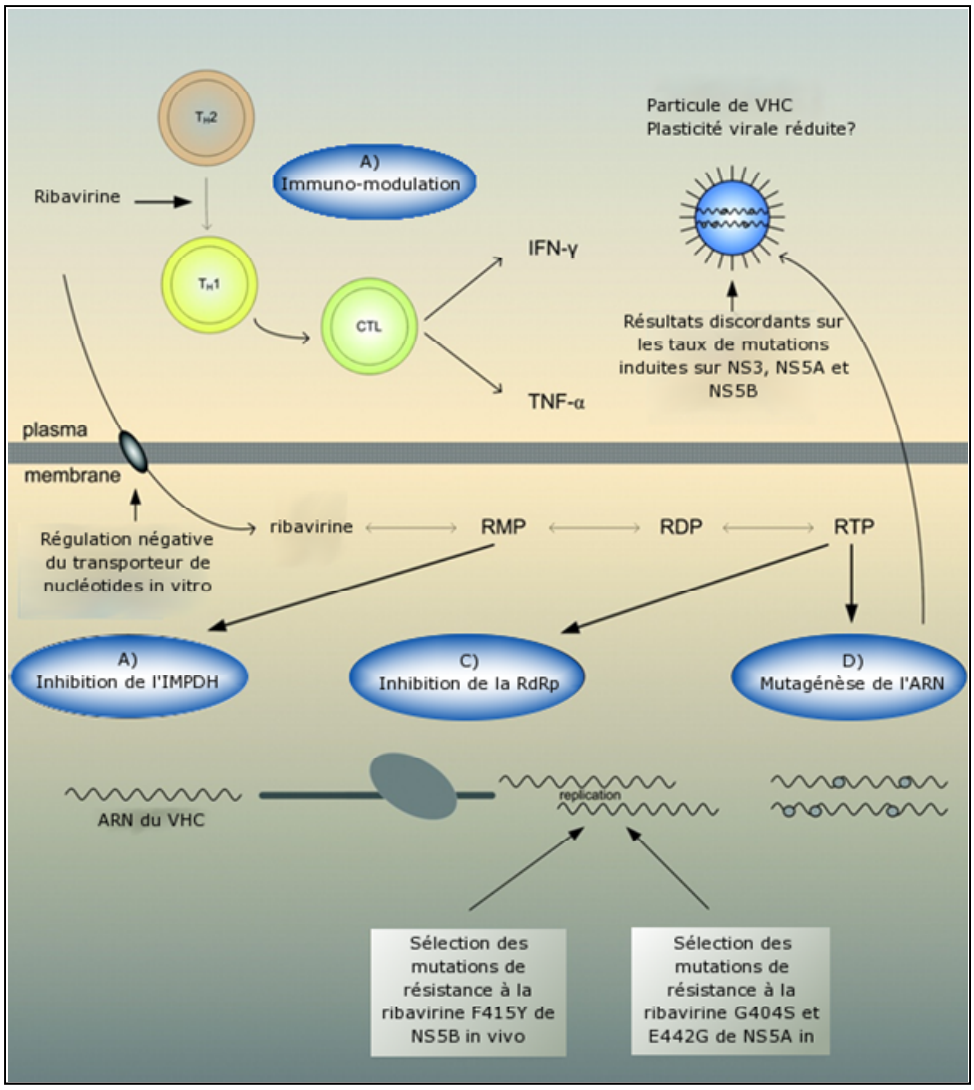


Figure 24 : Les différents mécanismes proposés pour l'action antivirale de la ribavirine. A) Augmentation de la réponse immunitaire adaptative antivirale. La ribavirine module l'équilibre des réponses de T-helper 1 (T_H1) et T_H2 en augmentant T_H1 et inhibant la production des cytokines. B) inhibition de l'IMPDH cellulaire. La ribavirine est convertie par les kinases cellulaires en ribavirine monophosphate (RMP) puis ribavirine diphosphate (RDP), et enfin, en ribavirine triphosphate (RTP). La RMP, inhibiteur compétitif de l'IMPDH, entraîne la déplétion du pool intracellulaire de GTP nécessaire à la synthèse de l'ARN viral. C) Inhibition directe de la RdRp du VHC. La forme RTP de la ribavirine se fixe au site de fixation des nucléotides de la polymérase, inhibant ainsi la réplication virale (inhibition compétitive). De plus, la ribavirine est utilisée et incorporée par les polymérases virales, dont la RdRp du VHC, ce qui aboutit au blocage de l'élongation de l'ARN. D) Mutagénèse de l'ARN viral : la ribavirine agit comme un agent mutagène sur l'ARN viral, ceci entraine une augmentation de la fréquence de mutations qui dépasse le seuil de plasticité virale et conduit les ARN viraux à des mutagénèses létales. CTL: Lymphocytes T cytotoxiques, TNF- α: facteur nécrosant des tumeurs (176).

Le but ultime du traitement dans le cas d'une infection au VHC est de réussir à avoir une réponse virologique prolongée actuellement définie comme le niveau auquel l'ARN du VHC n'est pas détectable par les méthodes d'amplification très sensibles (PCR) dans le sang périphérique 24 semaines après la fin du traitement (177). Cependant, il arrive souvent que le virus réussisse à échapper le système immunitaire, le but du traitement diminue d'exigence et se recentre alors sur l'arrêt de la progression de la fibrose par exemple puis empêcher l'installation de la cirrhose, puis prévenir les complications de la cirrhose et ainsi de suite. Le traitement actuel est une bithérapie associant l'interféron α pégylé (PegIFN-α) dont le mécanisme d'action est encore mal connu dans le cas de la Ribavirine. A l'origine le traitement du VHC était limité à l'interféron α en monothérapie. Dans le cas d'une monothérapie à l'interféron-α, on arrivait à réduire sensiblement la quantité d'ARN du VHC, d'un autre coté, les transaminases se normalisaient dans 40 à 60% des cas. Cependant, la majorité des patients rechutaient après arrêt du traitement et la majorité d'entre eux établissaient une réponse virologique durable. D'autre part, les études cliniques suggéraient que le traitement par l'interféron-α diminuait le risque de carcinome hépatocellulaire et le taux de mortalité liée à la maladie hépatique. Sous cette forme, le traitement nécessitait des posologies fortes qui améliorent les taux de réponse virologique, mais généralement mal tolérées par les patients, avec un bénéfice virologique transitoire. Afin de pallier ces problèmes, des résidus chimiquement inertes ont été conjugués à la molécule d'interféron-α, il s'agit du polyéthylène glycol (PEG). Cette nouvelle forme d'interféron-α pégylé (PegIFN-α) a une clairance systémique diminuée, une demi-vie prolongée et une antigénicité réduite par rapport aux interféron-α conventionnels. De ce fait, ils peuvent être utilisés en une seule injection sous-cutanée par semaine.

La Ribavirine, une molécule très connues par ses propriétés antivirales *vis-à-vis* de nombreux virus *in vitro* a été rajoutée dans le traitement de l'infection au VHC chronique. La particularité de la Ribavirine réside dans une synergie d'action majeure en association avec l'interféron-α (bithérapie). Le rôle précis de la Ribavirine en association avec l'interféron-α n'est pas très clair (*cf.* Figure 24), il pourrait s'agir : i) d'une stimulation des fonctions antivirales des lymphocytes Th1 par augmentation de la production d'interféron gamma ; ii) une induction de mutations virales létales pour le VHC ; d'une inhibition de l'IMP déshydrogénase régulant les stocks cellulaires du GTP indispensable à la réplication virale. En

terme clinique, la synergie d'action entre interféron-α et Ribavirine apparaît plus dans la prévention de la rechute virologique que dans la phase initiale de décroissance de la réplication virale (178).

Enfin, l'efficacité du traitement dépend du génotype ainsi que de la charge virale. Dans le cas d'infections à VHC génotypes 2 et 3, le traitement éradique le virus dans 75-90% des cas. Cependant, ce taux diminue jusqu'à 45-52% pour les infections à VHC génotypes 1 et 4, avec dans tous les cas de nombreux et souvent très sévères effets secondaires (177).

Une étude très récente montre l'intérêt d'une autre molécule, le Telaprevir (inhibiteur de la sérine protéase du VHC), dans le traitement de l'infection chronique au VHC. Il s'agit d'une combinaison associant le Telaprevir au PEG-IFNα-Rib (12 semaines de Telaprevir combiné à 24 semaines de PEG-IFNα-Rib) qui augmente sensiblement la réponse au traitement du VHC comparé au traitement obtenu lors d'une bithérapie classique (179).

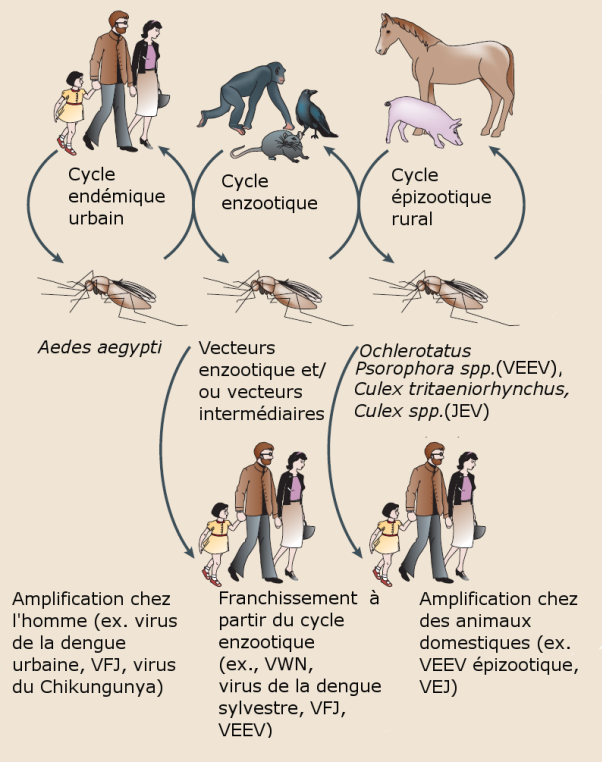


Figure 25 : La plupart des arboviroses sont zoonotiques et leur cycle implique des oiseaux, des rongeurs ou des primates non-humains comme hôtes réservoirs. Les cycles zoonotiques de certains virus, tels que le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV) et le virus de la fièvre jaune (VFJ) ont lieu dans des habitats forestiers, alors que le cycle enzootique du virus du West Nile (VWN) peut avoir lieu aussi dans des habitats urbains. L'infection de l'homme et les épidémies peuvent surgir à partir de franchissements stochastiques directs de ces cycles enzootiques lorsque les niveaux d'amplification résultent en une transmission à l'homme (ex. VWN), ou lorsque les gens entrent dans les entrent dans les habitats enzootiques forestiers (ex. VEEV en Amérique latine). Des vecteurs enzootiques ou intermédiaires pourraient être impliqués dans la transmission.

Certaines arboviroses telles que VEEV et VEJ réalisent de nouvelles amplifications causant des maladies chez l'homme en exploitant des animaux domestiques ayant un cycle épizootique rural, tels que les équidés et les porcs, augmentant ainsi la fréquence de débordement (franchissement) et causant des épidémies en zones rurales. L'adaptation du VEEV à l'amplification chez les hôtes domestiques (équins) nécessite des mutations dans le gène E2 codant pour la glycoprotéine d'enveloppe. Ces mutations augmentent le niveau de virémie de l'hôte, et ont eu lieu à trois reprises au moins au cours du siècle passé. Ce changement est accompagné d'une modification du sérotype du VEEV en sérotype IAB ou IC. L'apparition de certains VEEV semble aussi accompagner l'adaptation aux épizooties de moustiques. Les virus de la dengue sont apparus comme les plus importants arbovirus pathogènes pour l'homme, par modification de leur spectre d'hôtes (des réservoirs enzootiques des primates non-humain aux réservoirs humains) dans un cycle de transmission endémique urbaine évoluant de façon indépendante. Les quatre sérotypes du virus de la dengue sont tous apparus indépendamment comme des agents pathogènes pour l'homme des centaines de milliers d'années auparavant, lorsque les populations humaines ont atteint une densité suffisante pour permettre la transmission horizontale continue, sans doute complétée par la transmission verticale chez les moustiques (180).

Tableau 2 : Les principaux virus enregistrés associés à des arthropodes

Famille	Genre
Togaviridae	*Alphavirus* (28 virus, dont les *virus Chikungunya, O'Nyong Nyong, Ross River, Sindbis, Mayaro, Babanki*)
Flaviviridae	*Flavivirus* (68 virus, dont le virus de la fièvre jaune, des dengues, de l'encéphalite japonaise, le *virus West Nile*, les virus *Wesselbron, Banzi, Zinka, Rocio,* les virus des encéphalites à tiques d'Eurasie tempérée, les virus de la maladie de la forêt de Kyasianur et de la fièvre hémorragique d'Omsk)
Bunyaviridae	*Bunyavirus* (138 virus, dont les *virus Bunyamwera, Ilesha*) *Phlebovirus* (43 virus, dont le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift) *Nairovirus* (24 virus, dont le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo) + 41 virus non classés
Reoviridae	*Orbivirus* (69 virus) *Coltivirus* (2 virus) + 6 virus non classés
Rhabdoviridae	*Vesiculovirus* (18 virus) *Lyssavirus* (16 virus) + 36 virus non classés

7. Transmission des virus par les arthropodes : Notion d'arbovirus et d'arboviroses

a. Définitions

Les arbovirus sont des virus habituellement transmis, dans les conditions naturelles, de vertébré à vertébré, par un arthropode hématophage, qui en constitue le vecteur biologique. Ainsi, les arboviroses sont des maladies infectieuses d'origine virale, essentiellement tropicales, transmises par des arthropodes hématophages. Elles regroupent des maladies différentes quant à leur symptomatologie et surtout leur épidémiologie. Leur fréquence et, pour certaines, leur gravité sont réelles. La première description d'une telle transmission a été faite en 1881 par Carlos Finlay qui réalise à Cuba la transmission du virus de la fièvre jaune par un moustique *Aedes aegypti* (*cf.* Figure 25).

i. Classification des arthropodes

L'embranchement des Arthropoda inclut la classe des insecta (3 paires de pattes), la classe des Arachnida (les araignées, 4 paires de pattes à l'âge adulte, les acariens, les tiques, les scorpions), les Myriapoda (les centipèdes, mille-pattes) sous-embranchement des crustacés (crabes, crevettes, langoustes) et d'autres organismes. Les arthropodes sont des invertébrés, caractérisés par leur corps segmentés et articulés, les appendices jumelés (ex. les pattes et les antennes), un exosquelette, et une symétrie bilatérale. Les arthropodes sont d'une étonnante diversité et abondance. Ils représentent plus de 85% de toutes les espèces animales connues et sont présents sur tous les continents (181).

ii. Classification des arboviroses

Tous les arbovirus connus appartiennent à cinq familles de virus (*cf.* Tableau 2).

Cent dix virus environ sont pathogènes pour l'homme, une quarantaine d'entre eux est cause de maladies animales identifiées.

iii. Physiopathologie des arboviroses

A la suite de l'injection de salive lors de la piqûre d'un arthropode infectant, le vertébré réceptif va développer une infection arbovirale. Le virus va se répliquer à proximité du point d'inoculation, puis dans les ganglions lymphatiques correspondants : c'est la phase de virémie. Puis, le virus va se disséminer dans l'organisme jusqu'aux organes cibles. L'infection entraîne une réponse immune à la fois humorale et cellulaire.

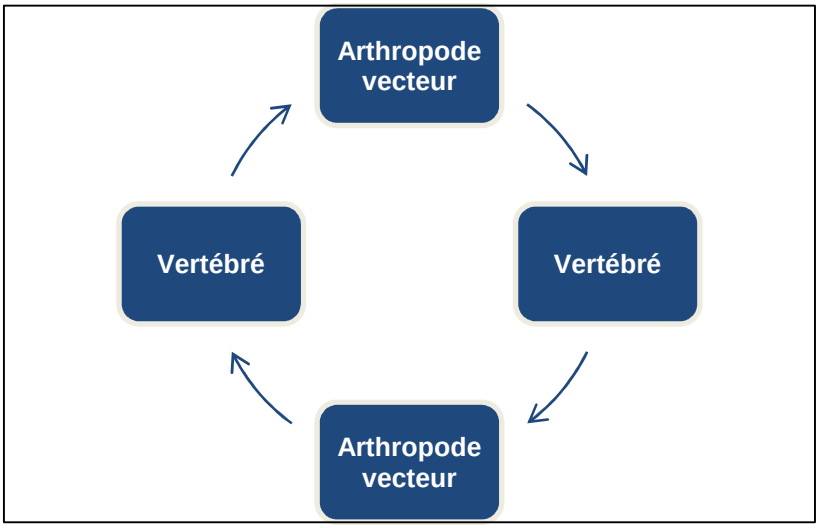


Figure 26 : les arbovirus alternent au moins deux hôtes : un vertébré et un arthropode

iv. Principaux aspects cliniques des arboviroses humaines

Le tropisme des virus explique les principaux aspects cliniques observés. Tous les arbovirus présentent un certain neurotropisme. Trois grands tableaux cliniques sont observés: (i) **Syndromes aigus fébriles (dengue-like)** : *Alphavirus* (Chikungunya, O'Nyong Nyong, Ross River, Sindbis, Mayaro, Babanki), *Flavivirus* : (Les virus de la Dengue, le Virus West Nile), Bunyavirus (Bwamba, Bunyamwera, Tataguine, Ilesha), Phlebovirus : virus de la Vallée du Rift, (ii) **Syndromes encéphalitiques** : *Alphavirus (*virus des encéphalites équines américaines), *Flavivirus* : virus de l'encéphalite japonaise, West Nile, virus des encéphalites à tiques d'Eurasie tempérée, (iii) **Syndrômes hémorragiques** : *Flavivirus* : virus des dengues, de la Fièvre Jaune, de la forêt de Kyasanur, d'Omsk, *Phlebovirus* : virus de Vallée du Rift, *Nairovirus* : virus Crimée-Congo.

v. Epidémiologie des arboviroses

Les arbovirus infectent alternativement un vertébré, au moins, et un arthropode (*cf.* Figure 26) :

Dans certains cas, une transmission verticale d'une génération à la suivante est possible chez l'arthropode. Le cycle de base est alors modifié. Les arthropodes vecteurs sont le plus souvent des moustiques, des phlébotomes, des culicoïdes, des tiques… L'arthropode demeure infestant toute sa vie. Tout changement climatique est susceptible d'entraîner d'importantes répercussions sur le fonctionnement d'un foyer d'arbovirose. Ainsi, les récentes modifications climatiques, démographiques et économiques au Brésil entraînent une nouvelle expansion des arboviroses : réchauffement de la planète et phénomène *El Niño*, croissance démographique notamment en milieu urbain, réseau d'adduction d'eau insuffisant, intrusions en forêt amazonienne avec la déforestation (182-184).

b. La transmission de maladies

La transmission d'une maladie est le principal effet indirect des arthropodes sur la santé humaine. La piqûre en elle-même ne cause pas de problèmes de santé, en revanche, c'est l'agent étiologique transmis et la réponse inflammatoire de l'hôte vis-à-vis de l'agent infectieux, qui sont à l'origine de la pathologie. Selon la période d'incubation, le développement de la maladie peut être plus ou moins long. La transmission des maladies par les arthropodes implique l'interaction de nombreux facteurs, tels que la présence de l'hôte, la compétence de l'arthropode vecteur et l'interaction hôte / pathogène (184).

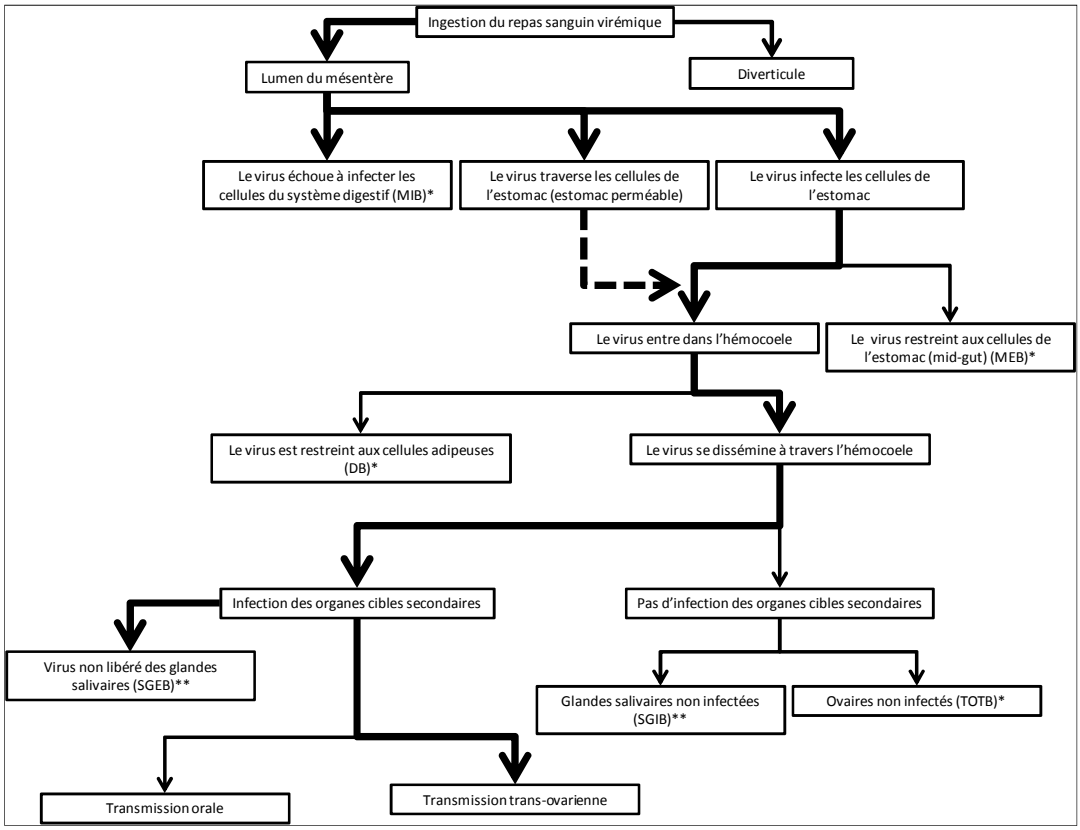


Figure 27 : Barrières supposées dans une infection par un arbovirus. * barrières connues dans le système AHSV/BTV-*Culicoides variipennis*. ** barrières pas encore connues dans le système AHSV/BTV-*Culicoides variipennis*; MIB: barrière mésentérale à l'infection; MEB: barrière à l'évasion mésentérale; DB: barrière de dissémination; TOTB: barrière à la transmission trans-ovarienne; SGIB: barrière à l'infection des glandes salivaires; SGEB: barrière à l'évasion des glandes salivaires (185).

c. Dynamique des maladies transmises par les arthropodes

i. La transmission mécanique et la transmission biologique

La transmission d'agents étiologiques par les arthropodes vecteurs, est un phénomène complexe. Le fait qu'un arthropode se nourrisse d'un hôte infecté n'implique pas son infection ni la survie et le développement de l'agent pathogène en question. Dans le cas d'une transmission, il faut faire la distinction entre deux modes différents : i) transmission mécanique, ii) transmission biologique (184).

La transmission mécanique d'un agent infectieux a lieu quand l'arthropode transporte physiquement le pathogène d'une place ou un hôte à un autre, souvent *via* des parties de son corps qui auraient touché une matière infectée (184).

Dans une **transmission biologique**, il y a obligatoirement multiplication et/ou développement du pathogène au sein de l'arthropode. On distingue alors, selon le cas, trois types de transmissions biologiques : (i) cyclo-développementale (transmission d'un pathogène après qu'il ait eu une période de développement au sein du vecteur, ex. les helminthes causant la filariose de Bancroft), (ii) propagatrice, dans lequel cas il n'y a pas de stade de développement, mais le pathogène doit se multiplier avant d'être transmis (ex. transmission de la bactérie de la peste - *Yersinia pestis* - par les puces), (iii) cyclo-propagatrice, dont le principe est que le pathogène subisse à la fois un stade de développement suivi d'une période de multiplication (ex. transmission de l'agent de la malaria - *Plasmodium* - par les moustiques du genre *Anopheles*) (184, 186).

ii. Compétence vectorielle

La compétence vectorielle fait référence à la capacité des arthropodes à acquérir, maintenir et transmettre l'agent infectieux. Comme décrit plus haut, tous les arthropodes ne sont pas des vecteurs de maladies. Même s'ils piquent et sucent du sang infecté, le pathogène absorbé ne parvient pas systématiquement à être transmis ; en effet, il existe des obstacles à différents niveaux pour que cela puisse avoir lieu (*cf.* Figure 27). Dans la majorité des cas, la barrière intestinale doit être traversée, le pathogène doit pouvoir survivre voire se développer/multiplier dans les tissus de l'arthropode, tels que l'hémolymphe, muscles ou le système de reproduction et doivent finalement pénétrer dans les glandes salivaires pour

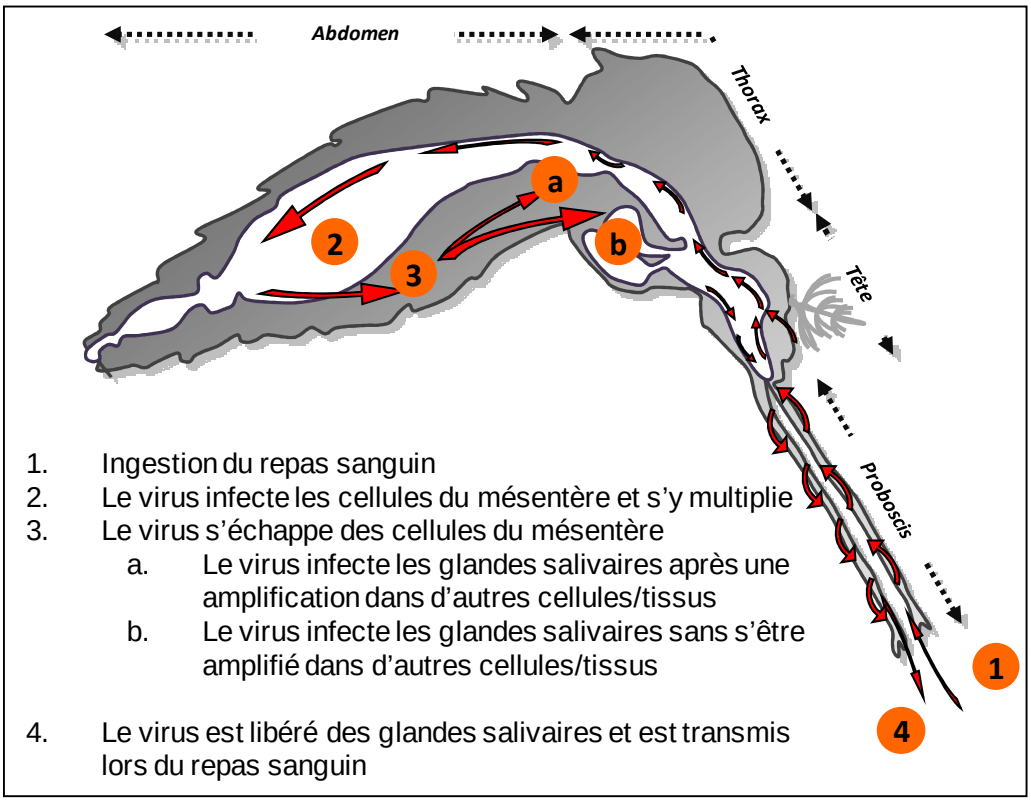


Figure 28 : Les étapes nécessaires à l'infection et la transmission d'un Flavivirus par le moustique (19).

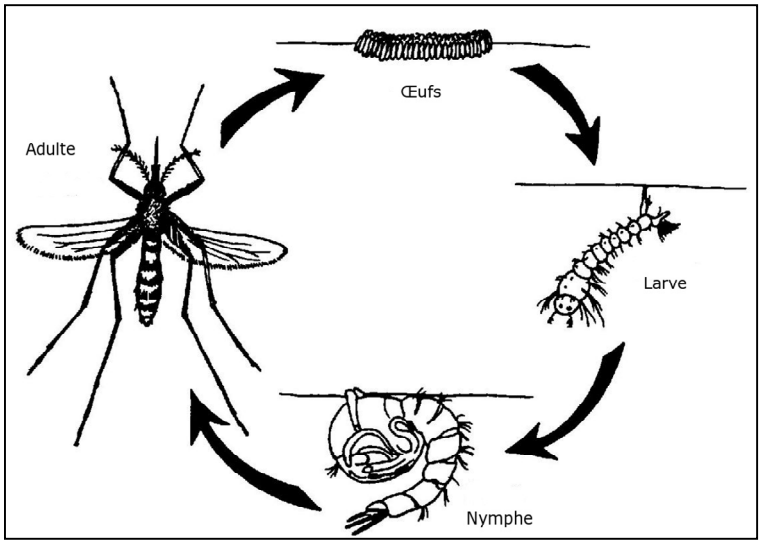


Figure 29 : Cycle de vie du moustique.

être injectés à un nouvel hôte ou proliférer dans les intestins et être transmis *via* les fèces (184, 187) (*cf.* Figure 28).

d. Les moustiques, en tant qu'arthropodes vecteurs

La plupart des arboviroses sont des pathologies virales transmises par les tiques et moustiques. Les moustiques (*Culicidae*) font partie de la classe des Insectes (Insecta , 3 paires de pattes) et de la superfamille des *Culicoidea*. Comme les autres insectes volants, ils subissent une métamorphose complète, pondent des œufs, passent à l'état larvaire puis évoluent en nymphes avant de donner enfin des adultes (*cf.* Figure 29) (184). Le cycle de vie du moustique peut être divisé en phase aquatique et phase aérienne :

i. La phase aquatique

- Les œufs

La femelle est fécondée par le mâle une seule fois dans sa vie. Les femelles de la plupart des espèces ont besoin de se nourrir d'un repas sanguin provenant d'oiseaux, de mammifères ou d'autres vertébrés pour le développement des œufs et peuvent alors absorber l'équivalent de leur poids. Trois à quatre jours environ après le repas sanguin, les femelles pondent entre 100 et 400 œufs, le lieu propice pour cela dépend de l'espèce de moustique. En effet, certaines espèces préfèrent les eaux stagnantes (ex. *Anopheles* et certaines espèces de *Culex*), d'autres préfèrent les terres humides inondées à répétition (ex. *Aedes vexans*), et le troisième groupe sont les moustiques qui pondent dans les eaux retenues dans des contenants naturels tels que les cavités d'arbres, les coquilles, etc. ou dans des réceptacles artificiels (ex. *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*). En fonction des conditions environnantes ainsi que de l'espèce, les œufs peuvent éclore au bout de 2 à 4 jours. En dehors de la nécessité du repas sanguin pour le développement de la progéniture, les moustiques mâle et femelle se nourrissent de nectar de plantes.

- La larve

C'est la phase de croissance durant laquelle le moustique se nourrit et vient respirer à la surface de l'eau à travers un tube. Cette phase dure 6 à 8 jours.

- La nymphe

Durant cette phase, le moustique ne se nourrit plus mais subit les transformations radicales qui lui permettent de passer de l'état aquatique à l'état terrestre. Cette phase de métamorphose dure 1 à 2 jours.

ii. La phase aérienne

- L'adulte

Le stade adulte est atteint lorsque la nymphe se libère de son enveloppe. L'adulte est prêt à voler dès que ses ailes ont séché (184).

e. Principales arboviroses transmises par les moustiques (182-184)

Les principales arboviroses (liste non exhaustive) traitées ci-dessous sont celles qui impliquent les moustiques : la fièvre jaune, les dengues, l'infection à virus Chikungunya, l'Encéphalite japonaise, l'infection à virus West Nile.

i. Arboviroses à *Alphavirus*

Les plus connus sont les infections par les virus Chikungunya et O'Nyong Nyong. Ce sont classiquement des syndromes comparables à ceux de la dengue avec rash et arthralgies, durant 5 à 7 jours. (i) **Le *Virus Chikungunya*** a été isolé pour la première fois en Tanzanie en 1953. Il circule principalement en Afrique de l'Est (Kenya, Tanzanie, Mozambique) et progresse actuellement en Europe du Sud (Italie). Les réservoirs sont des primates, des oiseaux ; les vecteurs des moustiques du genre *Aedes*. (ii) **Le *Virus O'Nyong Nyong*** sévit en Afrique subsaharienne. Première épidémie en Afrique de l'Est (1959-1963 : 2 000 000 de personnes atteintes), dernière épidémie en Ouganda et en Tanzanie en 1996-1997. Réservoir : Homme, vecteur : *Anopheles.*

ii. Infections par le *virus Sindbis* et des virus proches

Ils se caractérisent par des syndromes comparables à ceux de la dengue avec arthralgies rapportés en Europe, Afrique, Asie, Australie, sous forme de cas sporadiques ou d'épidémies. Réservoir : oiseaux, mammifères ; vecteur : *Aedes aegypti, Ae. albopictus, Ae. triseriatus, Culex pipiens, Armigeres subalbatus* et *Anopheles gambiae*.

iii. Encéphalites équines américaines

Ce sont des syndromes encéphalitiques observés chez l'homme et chez les équidés (Encéphalite vénézuélienne dans toute l'Amérique tropicale et Trinidad : syndromes fébriles

algiques, encéphalites surtout chez l'enfant. Réservoir : équidés ; vecteur *: Culex, Aedes, Mansonia)*.

iv. Fièvre due au *virus Mayaro*

Elle sévit dans les zones forestières des Caraïbes, d'Amérique centrale et du sud (Amazonie). Des cas ont été rapportés en Guyane française en 2001, prés de Kourou. Syndromes comparables à ceux de la dengue avec arthralgies ou arthrites fugaces. Réservoir : singe hurleur (*Alaouatta seniculus*); vecteur : moustique *Haemagogus* (famille des *Aedes.)*

v. Polyarthrite épidémique due au *Barmah Forest Virus* et au *Ross River Virus.*

Elle provoque des syndromes dengue-like avec arthralgies ou arthrites fugaces (Australie, Nouvelle-Guinée, archipels du Pacifique,…).

vi. Arboviroses à *Flavivirus*

(*cf.* Tableau 3, Figure 28 et Figure 30)

- Fièvre jaune (FJ)

La FJ est une fièvre hémorragique virale, due au virus amaril, transmise par des moustiques du genre *Aedes*. Elle se présente sous des formes variées, de la simple fièvre à l'ictère associé à des hémorragies diffuses avec une proportion de décès parmi les cas graves allant de 20 à 50%. La FJ est présente dans les zones tropicales et subtropicales d'Afrique Noire et d'Amérique intertropicale où elle demeure une endémie redoutable et une menace constante. Elle ne sévit ni en Asie, ni en Océanie, ni dans l'Océan Indien. Dans les zones d'endémie, l'hôte naturel du virus amaril vit dans les régions forestières. A la faveur d'une conjonction de facteurs, le virus échappe à son cycle sylvestre et se transmet aux communautés humaines. Des épidémies dévastatrices, notamment dans les zones urbaines, se produisent lorsqu'il existe une forte densité de population humaine non protégée associée à une forte densité de moustiques vecteurs infestés. Le réservoir est constitué par les singes en phase virémique et les vecteurs par les moustiques, ces derniers conservant toute leur vie le virus dans leur organisme. Certains peuvent même conférer l'infection à leur descendance. En Afrique, la FJ est endémique en zones de forêt grâce à un cycle enzootique sauvage : les singes (cercopithèques, colobes…), hôtes primaires du virus, développant des infections inapparentes et les moustiques : *Aedes primatophiles* des canopées comme *Aedes africanus*. En limite des massifs forestiers, les mosaïques forêt-savane, les galeries forestières, les savanes humides constituent les zones d'émergence, les

Tableau 3 : Les principales maladies transmissibles par les moustiques dues aux Flavivirus et Alphavirus

Virus	Maladie causée	Hôtes réservoirs	Principal vecteur enzootique/endémique	Hôte secondaire	Vecteur épidémique
Alphavirus					
Encéphalite équine de l'Est	Maladie fébrile, encéphalites	Oiseaux	*Culiseta melanura, Culex (Melanoconion) spp.* (Amérique latine)	Aucun	*Aedes, Ochlerotatus et Coquilletidia spp.*
Encéphalite équine du Venezuela	Maladie fébrile, encéphalites	Rongeurs	*Culex (Melanoconion) spp.*	Equines	*Ochlerotatus et Psorophora spp.*
Encéphalite équine de l'Ouest	Maladie fébrile, encéphalites	Oiseaux	*Culex tarsalis, Culex quinquefasciatus* (Amérique du nord)		
Chikungunya	Arthralgie/irritation	Primates	*Aedes spp.*	Humains	*Aedes aegypti*
O'nyong-nyong	Arthralgie/irritation	Inconnus	Inconnus	Humains	*Anopheles funestus Anopheles gambiae*
Virus de la rivière Ross	Arthralgie/irritation	Marsupiaux	*Culex annulirostris, Oculerotatis vigilax*	Humains ?	
Flavivirus					
Dengue 1,2,4 (génotypes sylvatiques)	Maladie fébrile, syndrome hémorragique	Primates	*Arboreal Aedes spp.*		
Dengue 1-4 (génotypes endémiques)	Maladie fébrile, syndrome hémorragique	Humains	*Aedes aegypti, Aedes albopictus*		
Encéphalite japonaise	Maladie fébrile, encéphalites	Oiseaux	*Culex tritaeniorhynchus, Culex spp.*	Porcs	*Culex tritaeniorhynchus, Culex spp.*
Encéphalite de St Louis	Encéphalites	Oiseaux	*Culex quinquefasciatus*		
West Nile	Maladie fébrile, encéphalites	Oiseaux	*Culex spp.*		
Fièvre jaune	Hépatite, maladie hémorragique	Primates	*Aedes, Sabethes and Haemagogus spp.*	Humains	*Aedes aegypti*

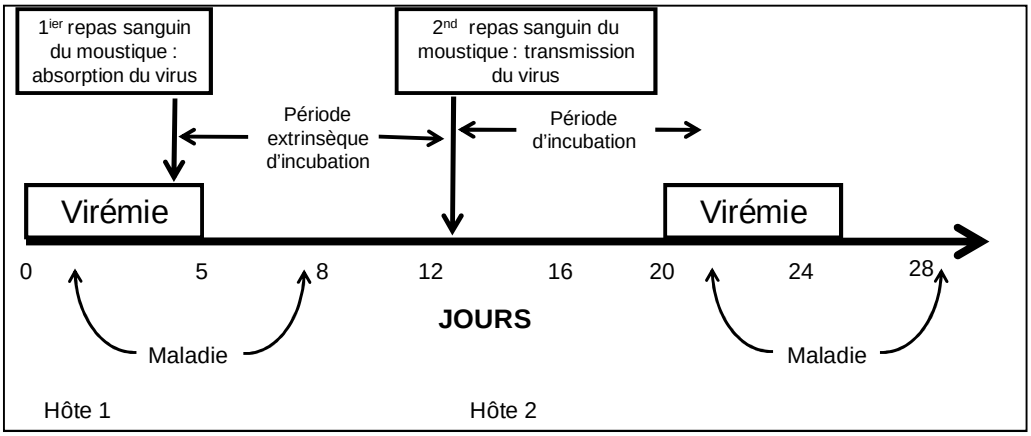


Figure 30 : Cycle d'absorption et de transmission des Flavivirus transmis par les moustiques. La virémie survient habituellement à des niveaux pouvant infecter le moustique en 2 à 6 jours. Après que le moustique ait ingéré le virus avec le repas sanguin, le ce dernier a besoin de 8 à 14 jours pour qu'il infecte les glandes salivaires, à partir de ce moment là le moustique devient infectant et peut alors transmettre le virus à un autre hôte vertébré. Ceci est appelé la période extrinsèque d'incubation. La période d'incubation se réfère à la période entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes. (D'après the Centers for Disease Control and Prevention).

vecteurs y atteignant des densités élevées dans les canopées et aussi au niveau du sol. Il s'agit de moustiques à forte longévité, capables de se disperser sur de longues distances. Les troupes de singes abondent dans ces écosystèmes et font de fréquentes incursions dans les plantations. Quant aux régions dotées de longues saisons sèches au cours desquelles les populations de vecteurs se raréfient, elles représentent des zones d'épidémies particulièrement dangereuses. Les hommes s'y déplacent facilement ;il y a des vecteurs domestiques, comme *Aedes aegypti*. On observe dans ces zones des épidémies rurales. Dans les zones urbaines, *Aedes aegypti*, vecteur exclusif, assure une transmission épidémique strictement interhumaine. En Amérique intertropicale, les singes américains sont sensibles au virus amaril et c'est leur raréfaction qui est à l'origine des vagues épizootiques.

Les moustiques vecteurs sont des *Haemagogus*. En cas d'interventions sur ces écosystèmes (ex. déforestations, créations de chantiers …), les *Haemagogus* peuvent devenir actifs au niveau du sol et venir agresser l'homme au niveau des campements. C'est l'origine des cas sporadiques de FJ dans les pays d'Amérique latine.

- Dengues

Les dengues sont répandues dans toutes les zones tropicales et subtropicales du monde. C'est le premier problème de Santé Publique posé par les arboviroses. Il y a quatre sérotypes viraux dénommés « DEN 1, 2, 3, 4 », n'entraînant pas de protection croisée. La dengue est en pleine expansion. Chaque année, d'importantes épidémies surviennent dans les Caraïbes, en Asie, en Amérique latine... La principale complication est la dengue hémorragique (DH), mais la mortalité est essentiellement due à la survenue d'un syndrôme de choc (DSC). L'homme est le principal réservoire naturel (des singes ont été trouvés infectés en Asie et en Afrique) et le disséminateur de virus ; les vecteurs sont des moustiques du genre *Aedes* : *Aedes aegypti* est le vecteur majeur, *Aedes albopictus* joue un rôle important en zone rurale et péri urbaine et supporte bien les climats tempérés. On distingue schématiquement : (i) des zones endémiques où les quatre sérotypes circulent en permanence : le sud-est asiatique où l'on observe les DH et DSC, actuellement Amérique tropicale et Caraïbes. La Guadeloupe et la Martinique ont connu une importante épidémie en 2007 (7à 8% de la population a été touchée) due au virus DEN-2 avec une grande fréquence des formes graves en milieu hospitalier,(ii) des zones épidémiques où un type donné de virus se dissémine de proche en proche, grâce aux déplacements des populations : Océanie, toutes les îles de l'océan indien,

côte orientale d'Afrique…L'Afrique de l'Ouest représente une situation mal expliquée : circulation du virus parmi les singes, isolement sporadique de souches, cas humains rares. L'Afrique centrale demeure apparemment indemne. Le bassin méditerranéen est de nouveau menacé par l'introduction d'*Aedes albopictus*. Actuellement, la dengue «déferle» sur le monde : de l'Inde au Brésil, du Venezuela à la Chine. La dengue concerne actuellement plus de 100 pays, il y a 50 millions de cas par an, dont 400 000 DH/DSC et 30 000 décès. L'augmentation du nombre de cas de dengues peut être expliquée par la croissance démographique incontrôlée de certaines régions du globe, une urbanisation sauvage et l'absence de politique adéquate de gestion de l'eau mais aussi par la propagation des virus de la dengue par le biais des voyageurs et des échanges commerciaux, ainsi quel'essoufflement des programmes de lutte anti-vectorielle. Les plus récentes épidémies de dengue dans l'océan Indien concernent les Comores en 1993, les Seychelles et La Réunion en 2004 (déjà atteintes en 1977 avec 200 000 cas). Le virus responsable de l'épidémie de 2004 est le virus DEN 1 (200 cas). Aucune forme sévère n'a été observée. Les signes cliniques les plus fréquents ont été : fièvre, céphalées, myalgies. Quelques formes hémorragiques mineures ont été signalées (gingivorragies). Le vecteur est *Aedes albopictus*. Madagascar a été atteint pour la première fois en 2006 par le virus DEN-1 (Nosy-Be, Ambanja, Toamasina). Une épidémie due au virus DEN-4, qui n'a pas circulé dans la zone depuis 1980, sévit actuellement dans le Pacifique. Des cas de dengue nosocomiale (piqûre, projection de sang dans les yeux, le nez, la bouche) ont été rapportés en 2004.

- Encéphalite japonaise (EJ)

L'EJ est l'encéphalite la plus importante en Asie : au moins 50 000 cas cliniques avec 10 000 décès par an, principalement chez les enfants de moins de 10 ans et 15 000 cas de séquelles neuropsychiatriques. Elle est transmise à l'homme par des moustiques du genre *Culex*, contaminés par le virus de l'EJ en piquant des animaux virémiques, généralement des porcs domestiques ou des oiseaux d'eau. Sur 250 à 500 individus contaminés, seul un en moyenne manifeste des signes cliniques de la maladie. Il n'y a pas de traitement spécifique. L'incidence de l'EJ recule depuis plusieurs décennies au Japon, en Corée du Nord, en Chine par suite de la vaccination à grande échelle. Elle progresse au contraire vers l'Ouest : Inde, Pakistan, vers le sud : îles du détroit de Torres au large de l'Australie et aussi dans les pays d'Asie du sud-est (Vietnam, Cambodge).

- Encéphalite de la Valley Murray et infections par le *virus Kunjin*

Elles sévissent en Nouvelle-Guinée, en Australie avec des infections asymptomatiques et des encéphalites. Le réservoir : les oiseaux, les vecteurs : les *Culex.*

- Infections par le virus West Nile

Le virus West Nile, *Flavivirus* isolé pour la première fois dans la province du Nil en Ouganda en 1937, a commencé à faire parler de lui à partir des années 1950, lorsqu'il fut retrouvé en Egypte et en Israël au cours de petites épidémies. Des études faites en Egypte ont permis d'identifier le cycle du virus WN qui comporte un vecteur (un mous*ti*que du genre *Culex*), un réservoir (les oiseaux), *les* hommes et les grands mammifères (chevaux) représentant des impasses épidémiologiques. Sa répartition géographique intéressait alors l'Afrique, une partie de l'Europe centrale et méridionale, le Moyen-Orient, l'Inde. Classiquement cause d'un syndrome fébrile pseudo grippal ou syndrome dengue-like, le virus WN a été reconnu responsable de méningo-encéphalites et d'hépatites mortelles. A partir de 1994, le virus WN a commencé à se réveiller et a frappé sous forme d'épizooties équines ou d'épidémies les pays de Maghreb, l'Europe centrale, la Russie. Les épidémies les plus graves furent celles de Roumanie (Bucarest, 1996) et de Russie (Volvograd 1999), plus de 800 cas d'encéphalites avec envi*ro*n 60 décès. En 1999, le virus WN a débarqué aux Etats-Unis d'Amérique, à New York. Le virus a été la cause d'août à octobre 1999, de 37 encéphalites avec 4 décès. Depuis début 2000, le virus WN s'est étendu à tous les Etats-Unis, a atteint la Californie en 2003, puis a gagné plusieurs provinces du Canada et a diffusé en Amérique du sud, jusqu'en Argentine. Aux Etats-Unis, entre 1999 et 2006, il y a eu 23 974 infections humaines dont 9 849 formes graves et 962 décès. Il est difficile d'expliquer l'apparition de l'encéphalite à virus WN dans le nouveau monde, (oiseaux migrateurs ou voie aérienne à partir du Moyen-Orient ?) et la rapidité de son extension, sachant que la niche écologique était occupée par le virus de l'encéphalite de Saint-Louis (même réservoir : les oiseaux ; même vecteur : des moustiques du genre *Culex*). Le virus WN a continué à se manifester dans le reste du monde. Deux cas d'encéphalites sont survenus à Madagascar en 2001-2002 (diagnostic par ELISA IgM-antivirus West Nile + PCR). Le virus WN a resurgi en France, après 35 ans de silence, en Camargue en 2000 avec 76 cas et en 2004 avec 31 cas chez les chevaux; en 2003, dans le département du Var, avec 7 cas humains.

- Encéphalite de Saint-Louis

Elle sévit sur le continent américain (du Canada à l'Argentine). Formes asymptomatiques, encéphalites mortelles (décès : 2 à 30%). Première cause d'encéphalite virale aux Etats-Unis. Réservoir : oiseaux ; vecteurs : *Culex.*

- Infections par les virus Wesselbron, Banzi et Zika

Elles sont observées en Afrique subsaharienne. Syndromes dengue-like. Réservoir : mammifères sauvages et domestiques ; vecteurs : *Aedes*, *Culex*.

- Encéphalite due au virus Roccio

Elle sévit au sud du Brésil, dans l'Etat de Sao Paulo : épidémies en 1975-1977 : syndrôme fébrile aigu avec réaction méningée ou troubles neurologiques. Décès après phase de coma. Séquelles dans 20% des cas. Réservoir : oiseaux (passereaux) ; vecteurs : *Psorophora ferox, Aedes scapularis, et Aedes serratus.*

- Arboviroses à *Bunyavirus*

Fièvres dues aux Bunyavirus

Bunyamwera, Ilesha, Bwamba, Tataguine : Afrique subsaharienne. Syndromes comparables à ceux de la Dengue. Réservoir : Inconnu; vecteurs : moustiques.

Infections par les virus du groupe C et Guama : Amérique Centrale et du Sud. Syndromes comparables à ceux de la dengue. Réservoir : rongeurs ; vecteur : *Culex*

Arboviroses dues aux bunyavirus du groupe *California*

Surtout connues en Amérique du Nord : enc*éphal*ite de Californie. Réservoir : rongeurs ou cervidés ; vecteur *: Aedes.*

- Arboviroses à *Phlebovirus*

Fièvre de la vallée du Rift (FVR) : Une épidémie de FVR a atteint le Kenya début décembre 2006, puis la Somalie, la Tanzanie et le Soudan. Le cas d'un enfant comorien malade depuis le mois de mai 2007, évacué à Mayotte, a été confirmé le 7 septembre 2007 par le CNR des arboviroses. Puis, Madagascar a rapporté 418 cas suspects de FVR en avril 2008. Le virus responsable de la FVR appartient au genre *Phlebovirus*, de la famille des *Bunyaviridae*. Il a été isolé pour la première fois en 1930 au cours d'une enquête touchant les moutons dans une ferme de la Vallée du Rift au Kenya. Considérée comme une maladie "émergente", la

FVR s'est étendue pour la première fois hors d'Afrique, en Arabie saoudite et au Yémen en 2000. La maladie se propage chez l'animal par l'intermédiaire de piqûres de moustiques infectés. Plusieurs espèces de moustiques peuvent jouer le rôle de vecteurs : *Aedes, Anopheles, Culex, Mansonia*... Les *Aedes* sont capables de transmission trans-ovarienne, ce qui permet au virus de se maintenir durablement dans la nature, les œufs pouvant survivre plusieurs années dans des conditions de sécheresse. Ainsi, au moment de la saison des pluies, les œufs éclosent, les moustiques se multiplient et transmettent la maladie aux animaux. Les animaux réservoirs de virus sont les bovins, les moutons, les chameaux et les chèvres. Une épizootie de FVR se manifeste d'abord, en général, par une vague d'avortements dans le bétail, signe annonciateur de l'épidémie. Au cours des épizooties, la contagion se produit chez l'homme par contact avec le sang, les sécrétions, le lait cru ou la viande d'animaux infestés. Le virus pénètre alors chez l'homme par inoculation (blessure avec un couteau souillé), par inhalation (contamination de laboratoire) ou par ingestion (lait ou viande crus). Les piqûres par des moustiques infestés constituent le deuxième mode de contamination de l'homme.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Tableau 4 : Travaux expérimentaux réalisés pour tester la compétence des moustiques pour le VHC

Références	Espèces de moustiques	Génotype du VHC	Méthode de détection du génome viral	Titre du virus dans le repas sanguin	PEI
(188)	*Ae. aegypti* *Ae. albopictus* *Anopheles stephensi*	1b	RT-PCR (5'UTR)	60 x 10^5 génome équivalent / ml	NP
(189)	*Ae. albopictus*	NP	Nested RT-PCR qRT-PCR (5'UTR)	5 x 10^5 copies/ml	NP
(190)	*Cx. quinquefasciatus*	1b	RT-PCR (5'UTR, core, E1/E2, NS3 and NS5)	7,908 Meq/ml	NP
(191)	AP61 cell line	1b	RT-PCR (5'UTR)	0,5 x 10^6 copies / ml	21 jours
(192)	*Culex pipiens*	NP	RT-PCR (5'UTR) qRT-PCR (5'UTR)	NP	7 - 8 jours

PEI : période extrinsèque d'incubation ; NP : non précisé.

III. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les cas de transmission « inconnue » du VHC ont longtemps intrigué les épidémiologistes et les virologues. Depuis une dizaine d'années, la transmission par des insectes a été suggérée.

Bien que des analyses évolutionnaires aient indiqué que le VHC ne pouvait pas se répliquer dans les arthropodes, en se basant sur le fait de la libre évolution des gènes de l'enveloppe virale qui correspondrait plus à une réplication au sein d'un seule espèce d'hôte (193), une étude épidémiologique plus récente a fortement suggéré l'implication d'un agent vecteur (moustique ou tique). Cette étude publiée par une équipe de biomathématiciens de l'Université d'Oxford explique le maintien et la dissémination du VHC à travers le temps (depuis 500 à 2000 ans) et les continents (3). Le Tableau 4 résume les différents travaux expérimentaux effectués.

L'objectif de la présente thèse est de mener, aussi loin que possible, une série d'infections expérimentales par le VHC, chez des moustiques des genres *Aedes* et *Culex* en commençant d'abord par définir un protocole général permettant de réaliser cette étude, puis de mettre au point plus spécifiquement les conditions qui permettent la détection du génome du VHC et finalement, présenter, à travers les résultats expérimentaux, les arguments en la faveur de la réplication du VHC chez les moustiques notamment *Ae*. *vexans*.

MATERIELS ET METHODES

IV. MATERIELS ET METHODES

1. Détection de l'ARN viral

Différentes régions situées sur le long du génome du VHC ont été amplifiées par RT-PCR. Les amorces utilisées sont les suivantes (*cf.* Tableau 22) : La détermination des couples d'amorces a été faite à l'aide d'un logiciel de bioinformatique (FastPCR), nous avons limité les essais aux séquences de moins de 1500pb (*cf.* Tableau 22).

a. Mises au point de la détection et détermination du seuil de sensibilité

La mise au point de la détection de l'ARN du VHC pour les expériences *in vivo* a été réalisée sur le sérum VHC 1b positif, sur le sérum VHC positif additionné d'un extrait d'ARN totaux du moustique et des extraits d'ARN totaux de moustiques sacrifiés après avoir gorgé du repas sanguin virémique.

i. Obtention des ARN totaux

Afin d'obtenir les ARN totaux, plusieurs méthodes d'extraction ont été effectuées, selon qu'il s'agisse d'un échantillon fluide (sérum, repas sanguin, cellules en suspension infectées…) ou solide (moustiques complet, têtes de moustiques, corps de moustiques).

- Extraction des ARN totaux des échantillons fluides

Nous avons utilisé le kit « QIAamp Viral RNA Mini Kit» (Qiagen – Courtaboeuf) selon les recommandations du fournisseur en éluant dans un volume final de 50µl.

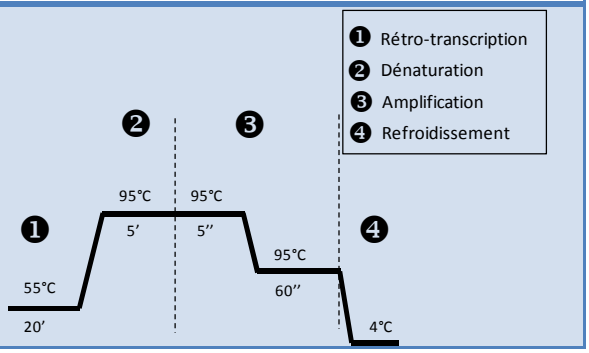
- Extraction des ARN totaux des échantillons solides

Il n'existe pas de kit spécial pour extraire l'ARN des tissus d'insectes. Néanmoins, et quelque soit le kit d'extraction, une étape de broyage est nécessaire. Nous avons utilisé deux procédés de broyage, broyage à sec dans l'azote liquide en utilisant un piston (un échantillon à la fois), et le broyage automatique dans du tampon de lyse à base de Guanidine-Thiocyanate (tampon RLT). Le thiocyanate de guanidine est un agent chaotropique très puissant, il a pour rôle de lyser les membranes cellulaires et les membranes virales, dénaturer les protéines et protéger de ce fait l'ARN de l'action des nucléases.

Le protocole de broyage automatique nécessite l'utilisation de billes en verres. Chaque moustique, ou partie d'un moustique, est mis dans un tube contenant des billes en verres et

Tableau 5: Protocole d'amplification par (q)RT-PCR One-step ou (q)PCR. A) composition du « mix » réactionnel. B) conditions des cycles.

A		B
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	**1X**	
Amorce anti-sens	**2 µM**	
Amorce sens	**2 µM**	
Sonde TaqMan*	**0,312 µM**	
H_2O	**qsp 18µl**	
Rnase OUT	**1,5U**	
QuantiTect RT Mix	**0,2µl**	
Volume total Master Mix	**18µl**	
Volume matrice	**2µl**	
Volume final	**20µl**	



*A rajouter seulement s'il s'agit d'une q(RT)-PCR.

Tableau 6: Protocole d'amplification par RT-PCR en deux étapes. A) composition du « mix » réactionnel. Etape 1 : Rétro-transcription. B) conditions des cycles

A		B
Amorce anti-sens	**2µM**	
dNTP	**1mM**	
H_2O	**qsp 10µl**	
Volume final	**10µl**	

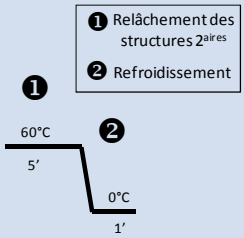
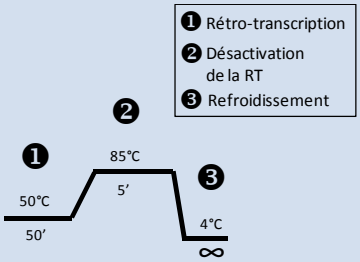


Tableau 7 : Protocole d'amplification par RT-PCR en deux étapes. A) Composition du « mix » réactionnel. Etape 2 : Amplification de l'ADNc. B) Conditions des cycles

A		B
RT Buffer	**1X**	
MgCl2	**5mM**	
DDT	**0,01M**	
Rnase OUT (40U/µl)	**1,5U**	
SuperScript III (200U/µl)	**1µl**	
Volume total Master Mix	**10**	
Volume Matrice	**10**	
Volume final	**20**	



du tampon RLT. Ces tubes sont ensuite disposés dans un appareil, FastPrep-24 (MP Biomedicals), qui par des mouvements de vibration, déchiquète les tissus de moustiques par frottement avec les billes présentes dans le tube. La quantité de tampon de lyse doit être suffisante (≥300µl), pour pouvoir récupérer au moins 200µl de broyat, car les billes retiennent environ 100µl de volume (volume mort). Nous avons fait des essais avec deux kits du commerce qui ont donné des résultats satisfaisants lors d'expériences précédentes (High Pure RNA isolation kit – Roche, RNeasy Mini kit – Qiagen, Nucleospin RNA XS – Macherey Nagel). Nous avons retenu (i) le kit « RNeasy Mini Kit » pour éluer dans des volumes de 30µl – 100µl et (ii) Nucleospin RNA XS pour éluer dans des volumes 5µl – 15µl. Les deux kits peuvent être utilisés pour extraire les ARN totaux à partir de différentes matrices solides (tissus de plantes, levures, moisissures…) et nous avons adapté le protocole pour les matrices rigides chitineuses.

ii. Méthodes de détection de l'ARN du VHC : Nous avons utilisé différentes méthodes pour la détection de l'ARN viral

- qRT-PCR One-step

La qRT-PCR permet la détection et la quantification de l'ARN viral en une seule étape ; nous avons testé différents kits et nous avons opté pour le kit QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen). Les thermocycleurs utilissés pour l'amplification étaient soit le LightCycler 2.0™ (Roche) (max. 32 échantillons), soit le LightCycler 480™ (Roche) (max. 96 échantillons). La détection en temps réel était rendue possible en utilisant une sonde spécifique de dégradation type TaqMan™. Les amorces utilisées sont 1TS (5'-gcg acc caa cac tac tcg gct), 2CH (5'-aac tac tgt ctt cac gca gaa) et la sonde TM 416 (5'FAM-aac ccg ctc aat gcc tgg aaa ccc gct caa tgc ctg ga-TAMRA) (*cf.* Tableau 5).

- RT + qPCR :

Ici l'amplification est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, les ARN présents dans l'extraits sont rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) par l'action d'une transcriptase inreverse (RT), puis amplification de l'ADNc par une ADN polymérase (Pol). Différentes combinaisons de RT et Pol ont été testées, nous avons retenu la combinaison RT/Pol : Superscript III (Invitrogen)/HotStartTaq™ DNA Polymerase. (Qiagen) (*cf.* Tableau 6, Tableau 7).

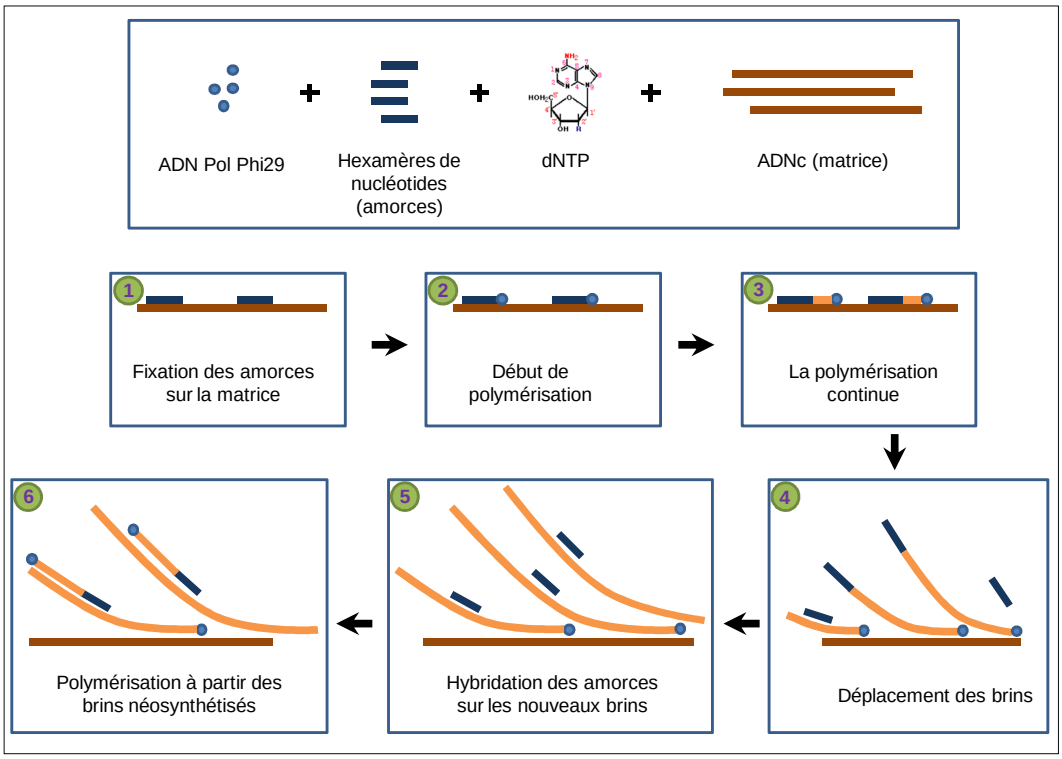


Figure 31 : Principe de la technique WTA.

Tableau 8: Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 1ière étape : relâchement des structures secondaires. A) Composition du « mix » réactionnel. B) Conditions des cycles

A		B
Hexamères / mix des 17 amorces anti-sens	**10µM**	❶ Relâchement des structures 2aires ❷ Refroidissement ❶ 75°C 5' ❷ 0°C 1'
dNTP	**1mM**	
H_2O	**qsp 10µl**	
Volume final	**10µl**	

Tableau 9 : Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 2ième étape : rétro-transcription. A) Composition du « mix » réactionnel. B) Conditions des cycles

A		B
RT Buffer	**1X**	❶ Rétro-transcription ❷ Désactivation de la RT ❸ Refroidissement ❶ 45°C 90' ❷ 95°C 5' ❸ 4°C ∞
MgCl2	**10mM**	
DTT	**0,04M**	
RNase Out	**40 U**	
RT SuperScript III	**200 U**	
DMSO	**0,5µl**	
Volume final	**10**	

- WTA (Whole Transcriptome Amplification)

L'amplification du transcriptome total était réalisée par le kit QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen). Cette technique associe la WGA à une étape préalable de RT. La WGA (whole genome amplification) permet l'amplification de l'ADN total présent dans le milieu en utilisant des amorces non spécifiques (hexamères) par l'action d'une ADN polymérase, phi29, ADN polymérase ADN-dépendante du phage Φ29 de *Bacillus subtilis*. La phi29 possède une activité 3'-5' lui permettant de corriger les erreurs (proof reading activity), elle exerce de très fortes activités de déplacement de brins et de synthèse; enfin, elle a la particularité de ne pouvoir amplifier que des fragments dont la taille est supérieure à 2kb (194, 195). Lors de la synthèse du brin complémentaire du long fragment d'ADN, la Pol phi29 va rencontrer un autre brin en cours de synthèse, son activité de déplacement de brin lui permet dans cette situation d'écarter ce nouveau brin qui se trouve sur son chemin et de continuer sa synthèse (la phi29 ne quitte pas sa matrice et peut ainsi générer des séquences allant jusqu'à 100kb). Au fur et mesure du déroulement de la réaction, il se forme de plus en plus de brins déplacés (branches) qui servent alors eux-mêmes de matrices à d'autres éléments de phi29 et ainsi de suite (*cf.* Figure 31).

Afin de pouvoir amplifier des matrices d'ARN par la phi29, ces dernières doivent être rétro-transcrites en ADNc par une transcriptase inverse (SuperScript III – Invitrogen). Mais étant donné que la phi29 ne peut amplifier que des fragments ayant des tailles supérieures à 2kb, les ADNc générés doivent d'abord être ligués. L'étape de ligation consiste en la concaténation des ADNc les uns avec les autres de façon aléatoire. L'association de la RT et la ligation à la WGA est appelée WTA (196). L'activité de déplacement de brin avec l'utilisation d'amorces non-spécifiques rend l'amplification par la phi29 très puissante, en effet, elle permet de générer jusqu'à 40µg d'ADN à partir de quantités aussi faibles que 0,1ng d'ARN de départ (*cf.* Tableau 8, Tableau 9, Tableau 11)

Tableau 10 : Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 3ième étape : ligation des fragments d'ADNc. A) Composition du « mix » réactionnel. Amplification de l'ADNc. B) Conditions des cycles

A		B
Ligation buffer	**6,00**	❶ ❶ Ligation ❷ Refroidissement 22°C 120' ❷ 4°C ∞
Ligation reagent	**2,00**	
Ligation enzyme 1	**1,00**	
Ligation enzyme 2	**1,00**	
Volume final	**10,00**	

Tableau 11 : Protocole d'amplification par la WTA/HCV-GA. 4ième étape : Amplification des ADNc. A) Composition du « mix » réactionnel. B) Conditions des cycles

A		B
REPLI-g Midi Reaction Buffer	**6,00**	❶ Amplification ❷ Dénaturation de la phi29 ❸ Refroidissement ❷ ❶ 90°C 5' ❸ 22°C 480' 4°C ∞
REPLI-g Midi DNA Polymerase	**2,00**	
Volume final	**1,00**	

Note : les produits de RT seule et les produits de WTA/HCV-GA peuvent être amplifiés par PCR classique (point final) ou qPCR. La composition des mix réactionnels et les conditions d'amplification sont les mêmes que pour une qRT-PCR One-Step.

Tableau 12: Amorces spécifiques sélectionnées pour l'amplification par HCV-GA

Désignation	Position	Séquence
5e	6880	5'-aggggtcggtragcatgg
1d	1356	5'-acrgcttgtgggatccgg
3a	3077	5'-gagcgcgyacraagtacgg
4d	5322	5'-ccaggtgctvgtgacgacc
3c	3727	5'-ccaartaaaggtccgagctgcc
7b	8537	5'-cttygcagctcgacaggc
6e	8143	5'-taragggccatyttctcgc
4e	5534	5'-tctgcttgaaytgctcgg
4a	4378	5'-cacgacragccgcgctcc
3b	3419	5'-atgggcgcraggagtcgc
1c	1162	5'-agatcccccacgtacatrgc
7a	8297	5'-ccgttgagtcaaarcagcg
5a	5657	5'-tcccgctgatgaarttcc
6b	7355	5'-accgtcctcttyctccgtgg
5d	6678	5'-gggcaytttacgttgtcrgtgg
2a	1805	5'-gaggygcgtagtgccagc
2b	2096	5'-tgcttccggaagcartccg

- HCV-GA (HCV Genome amplification)

C'est une variante de la technique de WTA que nous avons développé, et qui consiste à générer des ADNc spécifiques du VHC avant de les amplifier par WGA. Pour ce faire, au lieu d'utiliser des hexamères non-spécifiques (random), cette technique est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques du VHC (197).

Le choix de ces amorces a été fait de sorte à ce qu'il y ait le minimum (idéalement pas du tout) d'hybridation sur les séquences d'acides nucléiques présentes dans les différents extraits, à savoir les séquences d'origine humaine et de moustique. L'absence de croisement a été testée par l'outil Blast (« Basic Local Alignment Search Tool »), disponible sur le lien (http://www.ensembl.org/index.html) et qui permet de tester l'alignement d'une séquence (Entrée) sur plusieurs espèces différentes de façon simultanée. Dans notre cas, en l'occurrence, les séquences des amorces ont été testées sur les génomes d'*Aedes aegypti* et *Homo sapiens* (*cf.* Tableau 22).

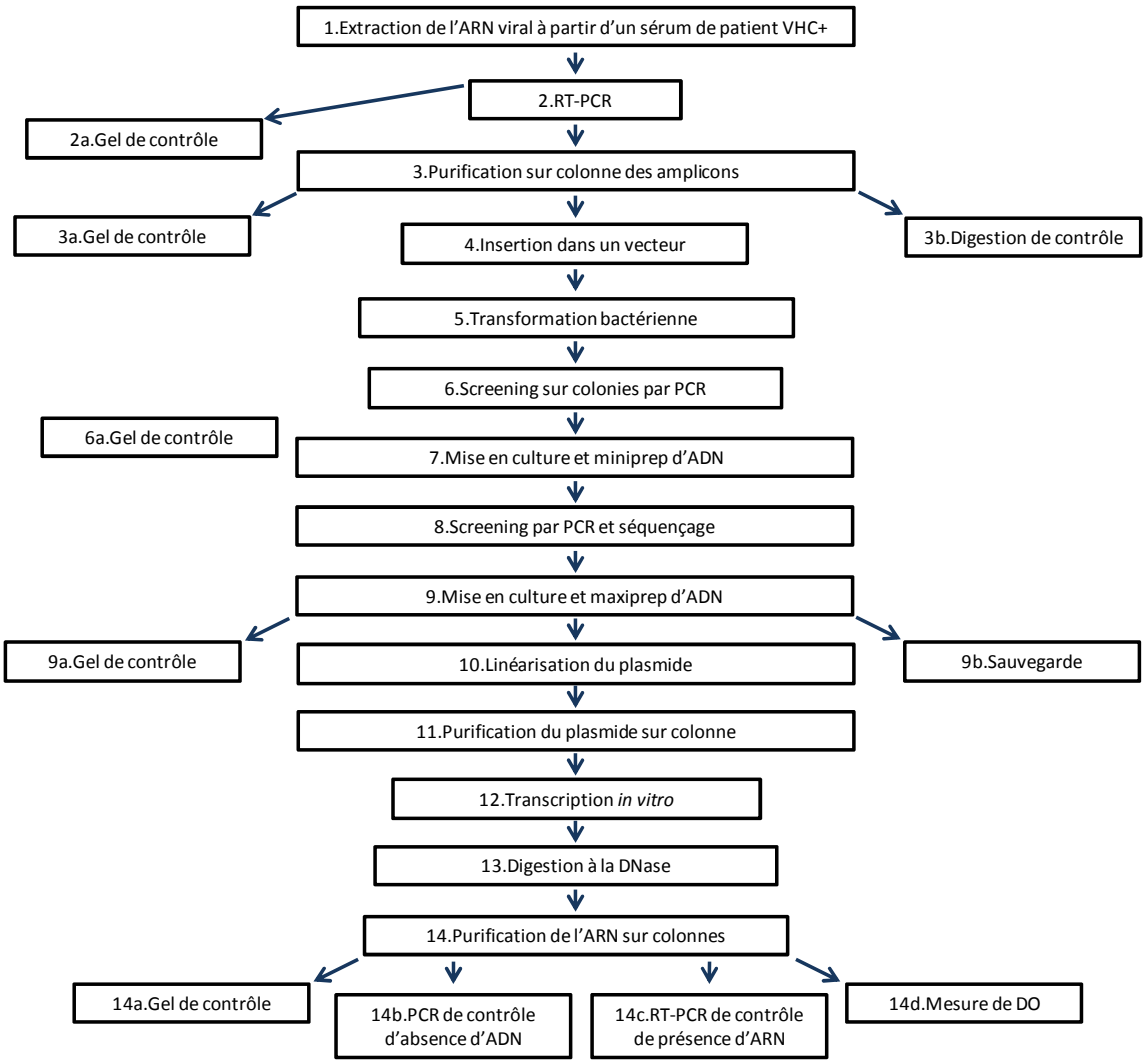


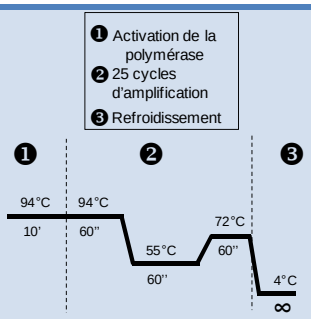
Figure 32 : Différentes étapes de construction du transcrit (témoin positif)

Tableau 13 : Combinaison des amorces utilisées dans la PCR dissymétique

	SP6	Amorce sens	Amorce anti-sens	M13 FP
Amorce sens	-	-	PCR(a)	-
T7	PCR(b)	PCR(c)	PCR(d)	-
M13 RP	-	-	-	PCR(e)

Tableau 14 : Protocole d'amplification par PCR dissymétrique. A) Composition du « mix » réactionnel. B) Conditions des cycles

A		B
dNTP	**0,2mM**	
Tampon Pol	**1X**	
Mg^{2+}	**4mM**	
Amorce sens	**1µM**	
Amorce anti-sens	**1µM**	
Enzyme Pol	**5U/µl**	
H_2O	**qsp 25µl**	
Matrice	**5***	
Volume final	**25**	



*Les PCR sont réalisées avec de l'ADN dilué au 1/100.

b. Construction du témoin positif pour la quantification

Afin de pouvoir quantifier le nombre de copies d'ARN du VHC présents dans un échantillon, nous avons construit un témoin positif de quantification (transcrit). Il s'agit de produire, en quantité suffisante, une séquence de l'ARN viral identique à la séquence utilisée pour la détection. La séquence cible est située dans la région 5' non-codante du génome du VHC entre 53nt et 272nt (*cf.* Figure 7, Figure 32). Le protocole utilisé pour la production du transcrit est le protocole interne de la CIBU 00027 modifié.

c. Transcription *in vitro*

i. Extraction de l'ARN viral : 50µl de sérum de patient infecté par le VHC sont extraits en utilisant le kit d'extraction Qiamp (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

ii. RT-PCR : *Cf.* § RT-PCR ci-dessus.

iii. Purification sur colonne : La purification des produits amplifiés a été réalisée en utilisant le kit de purification QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur, et le produit final élué dans 50µL d'eau.

iv. Contrôle de la qualité du produit purifié : 2µl à 3µl du produit purifié sont déposés sur un gel d'agarose à 2% (m/v) pour vérifier la présence et la pureté du produit.

Clonage : Pour le clonage de l'insert (témoin positif) nous avons utilisé le kit pCR II-TOPO (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Voir protocole de clonage dans pCR II-TOPO®. Pour le Screening sur colonies par PCR : Préparer le mix de PCR et la plaque de PCR (cf. § PCR plus haut), Piquer une colonie isolée avec un cône de P10 propre et à filtre, Faire une strie avec le cône sur une boite le LB + ampicilline (noter l'endroit et le numéro de clone au marqueur) et plonger le cône dans le puits de PCR ; À la fin, faire des aspirations-refoulements avec chaque cône avant de les jeter, puis lancer la PCR., Incuber la boîte de LB+ampicilline 37°C. Analyser les produits de PCR sur gel d'agarose à 2%. Pour la Miniprep d'ADN, nous avons utilisé le kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

v. PCR dissymétrique : Le but est de savoir dans quel sens la séquence cible s'est insérée dans le vecteur. Cinq PCR (de « a » à « e ») sont réalisées sur les clones choisis. Le Tableau 13 donne la combinaison des différentes amorces et le Tableau 14 la composition du « mix » de la PCR.

Tableau 15 : Interprétation des résultats de la PCR dissymétrique et déduction de l'orientation de l'insert

Résultats de PCR		ADN correspondant dans le sens…	Transcription par T7		Transcription par SP6	
T7 / oligo +	T7 / oligo -		ARN transcrit dans le sens…	Convenable pour virus à ARN de polarité	ARN transcrit dans le sens…	Convenable pour virus à ARN de polarité
Négatif	Bande de taille attendue	Positif	Négatif	Négative	Positif	Positive
Bande de taille attendue	Négatif	Négatif	Positif	Positive	Négatif	Négative

Tableau 16 : Composition du mix de digestion

H_2O	**qsp 100 µl**
Tampon	**1X**
Enzyme	**50 U**
ADN de maxiprep	**4 µg**

Tableau 17 : Composition du mix de la transcription

	Kit Ribomax SP6	**Kit Ribomax T7**
Transcription buffer 5X	**1X**	**1X**
rNTP	**1mM**	**1mM**
Plasmide linéarisé	**1µg**	**1µg**
Enzyme mix (5U/µg)	**20U**	**15U**
H_2O nuclease free	**qsp 100 µL**	**qsp 100 µL**

Tableau 18 : Composition du « mix » de la digestion par la turbo DNase

Mélange de transcription	**100 µL**
Turbo DNase buffer	**1X**
Turbo DNase (2U/µl)	**3U**

Ces combinaisons d'amorces permettent de vérifier la présence et la taille de l'insert, et de déduire son orientation dans le plasmide :

Présence de l'insert : les PCR oligo+/oligo- et M13FP/M13RP doivent être positives (1 seule bande bien distincte).

Taille de l'insert : la PCR oligo+/oligo- doit donner la taille exacte de l'insert, et la PCR M13FP/M13RP doit donner la taille de l'insert (220nt) + 240nt.

Orientation de l'insert : pour l'interprétation des résultats de la PCR dissymétrique et déduction de l'orientation de l'insert *cf.* Tableau 15.

i. Maxiprep d'ADN : A partir de 500µl de la préculture choisie, ensemencer 150 à 200 mL de LB + Ampicilline (100 µg/ml). Incuber à 37°C sous agitation pendant la nuit. La maxiprep est réalisée à l'aide du kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

ii. Linéarisation du vecteur : Mix de digestion (pour 100 µL par tube) *cf.* Tableau 16

iii. Purification du plasmide sur colonne : La purification est réalisée en utilisant le kit de purification QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) selon les *r*ecommandations du fournisseur, et le produit final élué dans 50µL d'eau.

iv. Transcription : En fonction de l'orientation de l'insert, on réalise une PCR avec l'amorce SP6 ou T7. *Cf.* Tableau 17 pour la composition du mix de transcription.

v. Incubation du mix à 37°C pendant 3 heures.

vi. Digestion à la Turbo DNase : D'après le protocole du Turbo DNA-free (Ambion). *Cf.* Tableau 18 pour la composition du mix de digestion.

Ainsi préparé, le « mix » est incubé à 37°C pendant 30 minutes, ajouter ensuite 1,5µl de DNase et ré-incuber à 37°C pendant 30 minutes. Après incubation, ajouter 20 µl du réactif « DNase Inactivation Reagent » préalablement vortexé et incuber à température ambiante pendant 2 minutes en agitant 2 à 3 fois. Ensuite, centrifuger à la vitesse maximale (10 000g) pendant 90 secondes puis transférer le surnageant soigneusement en évitant le culot. Enfin, conserver l'ARN (surnageant) à -20°C.

vii. Purification de l'ARN sur colonne : Nous avons utilisé le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

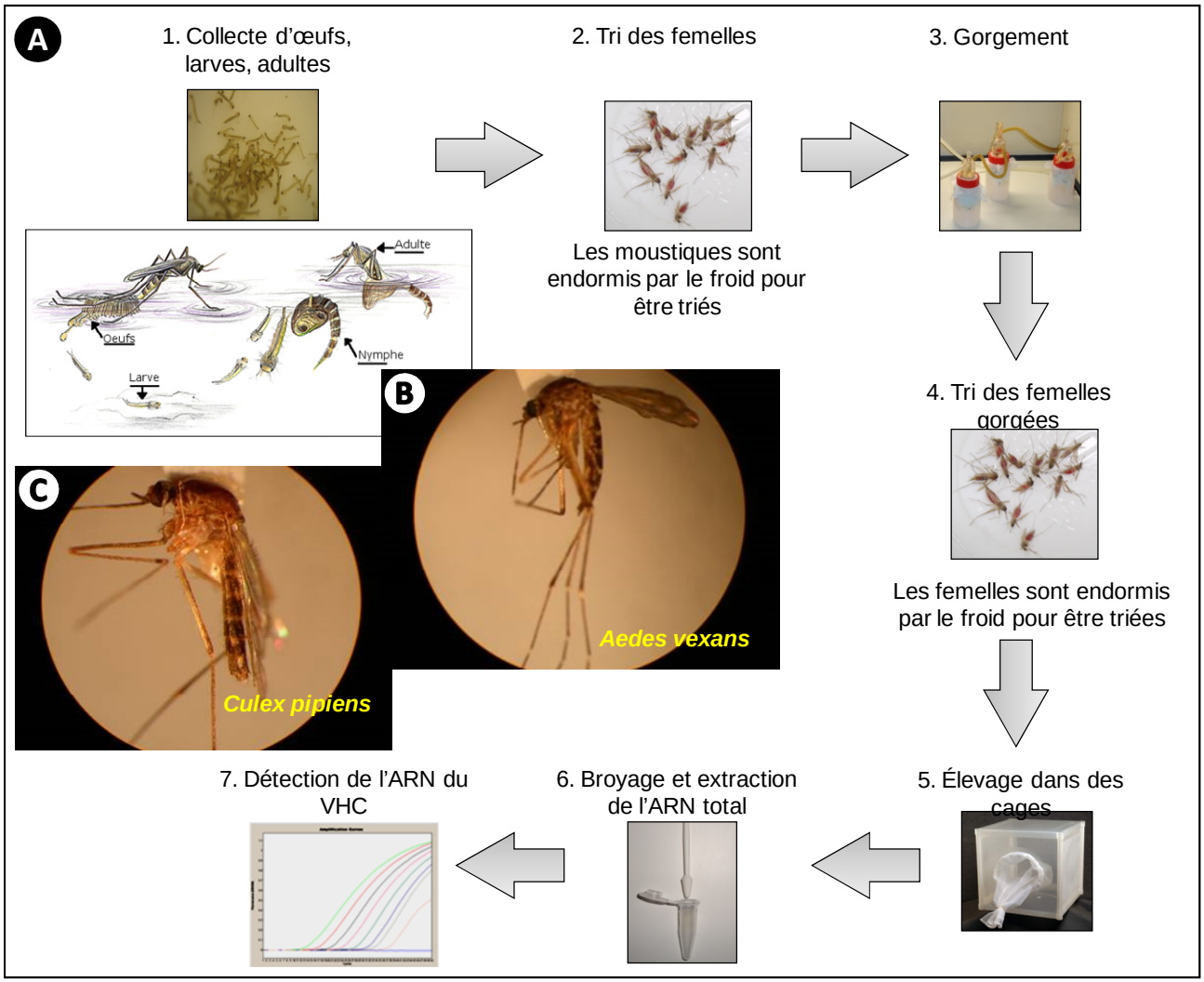


Figure 33 : A. Schéma général des étapes du protocole d'infection. B. Photo d'*Aedes vexans*. C. Photo de *Culex pipiens*.

viii. Contrôles : Pureté, DO, détermination de la concentration d'ARN

Mesurer la D.O. au spectrophotomètre afin de calculer les quantités d'ARN (en masse et en nombre de copies). Une dilution au 1/100 devrait permettre une bonne mesure de D.O. à 260 nm et 280 nm.

Calculs :

$$\text{Concentration massique } (\mu g/\mu l) = DO_{260} \times 0{,}04 \times facteur\ de\ dilution Pureté$$

$$= \frac{DO_{260}}{DO_{280}}\ doit\ être\ comprise\ entre\ 1{,}9\ et\ 2{,}0 \text{Concentration moléculaire (en copies / µL)} = 6{,}02 \times 10^{17}$$

$$\times \frac{concentration\ massique\ (\mu g/\mu l)}{nombres\ de\ bases\ de\ l'ARN\ \times 330}$$

ix. Contrôle d'absence d'ADN plasmidique : Ce contrôle se fait en réalisant une PCR sur l'ARN produit au lieu d'une RT-PCR.

x. Contrôle final de polarité : Se fait en réalisant une PCR avec les amorces qui ont donné la bonne taille de l'insert (*cf.* § PCR dissymétrique ci-dessus).

xi. Aliquotage : Pour des raisons fragilité du transcrit et de reproductibilité des résultats, le transcrit doit être aliquoté et conservé à -80°C.

d. Détermination de la limite de sensibilité

Pour ce faire, on réalise une qRT-PCR sur une série de dilutions logarithmiques du transcrit produit. La limite de sensibilité est définie par la concentration du transcrit au dessous de laquelle il n'est plus détecté.

2. Infections expérimentales

Cf. Figure 33.

a. Inoculum VHC

Pour les expériences d'infection *in vivo* et *in vitro* nous avons utilisé des sérums de patients VHC-positifs, négatifs pour l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le virus était de génotype 1b ayant des charges virales situées entre $7x10^5$ à $3x10^6$ copies par millilitre (copies/ml) déterminées par le test COBAS AMPLICOR HCV MONITOR. Les sérums provenaient du service de virologie du Centre Hospitalo-universitaire (Hôpital Nord) de Grenoble et de la Biobanque de Picardie (Amiens, France).

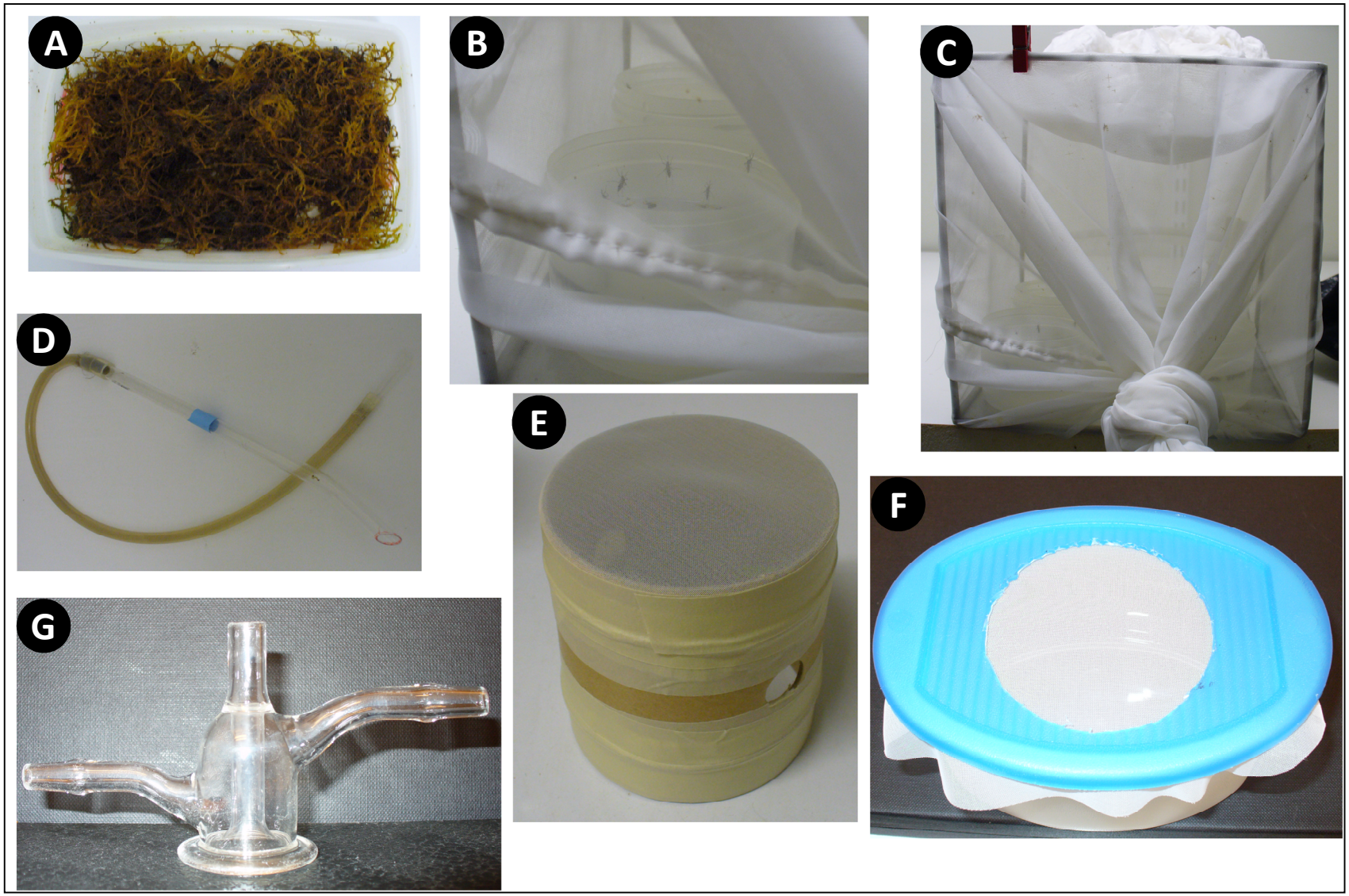


Figure 34 : A. Boite contenant de la mousse pour la ponte des œufs. B. Des moustiques entrain d'émerger d'un récipient contenant de l'eau. C. Cage d'élevage pré-infection. D. Aspirateur à bouche. E. Boite d'élevage pour les femelles infectées. F. Boite de gorgement. G. Gorgeur.

NOTE : Les manipulations utilisant des produits infectieux de classe 3 (comme le VHC) ont été réalisées dans des laboratoires / insectariums de confinement de niveau III.

b. Moustiques testés et conditions d'élevage

i. Espèces utilisées

Les moustiques utilisés appartenaient aux genres *Culex* et *Aedes*. Dans le genre *Culex*, nous avons utilisé l'espèce *Cx*. *pipiens* alors que deux espèces d'*Aedes* ont été utilisées *Ae*. *vexans* et *Ae*. *caspius*.

ii. Origine

Nous avons utilisé des espèces sauvages de *Culex pipiens*, d'*Aedes vexans* et d'*Ae*. *caspius*. Ces moustiques ont été capturés dans le domaine de la Tour du Vallat (en Camargue).

Une souche de laboratoire de l'espèce *Ae*. *vexans* (souche KK) a également été utilisée. Cette souche a été collectée dans la réserve naturelle de Kühkopf en Allemagne, puis adaptée à l'élevage en laboratoire. En effet, elle a été maintenue durant de nombreuses générations (plus de 170) par le Dr. Roland Kuhn (Université de Mayence) (198).

iii. Collecte

Nous avons utilisé deux méthodes pour la collecte de moustiques : (i) la collecte d'œufs et de larves, et (ii) la capture d'adultes. Les œufs des moustiques du genre *Culex* étaient récupérés à la surface de l'eau dans des récipients domestiques. Les œufs du genre *Aedes* ont été récupérés dans des échantillons de terre. Dans le cas d'une collecte de larve, cette dernière se fait dans les eaux des récipients domestiques pour les *Culex*, et dans les eaux stagnantes de canaux ou de prairies inondées pour les *Aedes*. Afin de récupérer des femelles adultes, nous avons utilisé deux types de dispositifs permettant l'aspiration des moustiques: (i) un dispositif manuel appelé aspirateur à bouche pour récupérer sur appât humain les femelles qui viennent se gorger de sang, et (ii) un dispositif automatique appelé « CDC Backpack Aspirator » soit sur appât humain soit directement dans les buissons (*cf.* Figure 34).

Collecter les œufs et les larves offre le confort de ne pas s'exposer aux piqûres et de pouvoir utiliser des moustiques dont on connait précisément l'âge. Dans tous les cas, les mâles et les femelles ont été triés par sexe avant le repas sanguin.

iv. Œufs/larves, conditions d'élevage et tri (*cf.* Figure 34)

En cas de collecte d'œufs ou de larves, ces derniers sont répartis dans des récipients contenant environ 500ml d'eau déchlorée, additionnée d'un demi-comprimé de levure de bière. La durée de passage des œufs vers le stade larvaire puis le stade de nymphes dépend de l'espèce de moustique, de la température et de l'humidité. Les récipients sont couverts par un voile et disposés dans une pièce avec des murs étanches, et afin d'éviter toute échappée de moustiques, les bouches d'aération ainsi que les accès sont également munis de voiles. La pièce est également dotée d'un système de contrôle de la température et de l'humidité maintenus à 28°C ±2 et 85% ±5 respectivement pour des conditions idéales de développement des œufs, larves et d'élevage des adultes. Une fois que les adultes apparaissent, ils sont aspirés par un aspirateur à bouche (*Cf.* Figure 34D) et transférés dans des cages contenant des tiges de cotons imbibés d'une solution de sucrose à 10% (v/v), qui constitue l'élément nutritif pour les jeunes moustiques. Sur chaque cage est disposé un morceau de coton imbibé d'eau, source d'humidité à proximité du moustique. C'est ainsi que les moustiques sont maintenus en élevage. Dans le cas où le but de l'élevage est de récupérer des œufs (nouvelle génération/nouveau passage), une souris anesthésiée est mise au dessus de la cage tous les 2 jours pendant 20 minutes environs (cette durée dépend du nombre de femelles présentes dans la cage), elle sert de source de sang pour les femelles. Pour les *Ae*. *vexans* d'élevage, on dispose dans la cage d'une boite contenant de la mousse légèrement humidifiée afin que les femelles puissent y pondre leurs œufs. La boite de mousse est récupérée à la fin de l'élevage et mise à température ambiante pour y conserver les œufs viables. Dans le cas où les moustiques sont destinés à être infectés, ces derniers doivent être triés pour séparer les mâles des femelles. Pour ce faire, les moustiques sont récupérés par les aspirateurs à bouche, puis mis dans des boites, elles-mêmes mises dans de la glace pilée pour les endormir. Une fois endormies, les femelles sont récupérées et mises dans des petites boîtes d'élevage (boites cylindriques 8cm Ø x 13cm, dont on a couvert l'une des deux extrémités par un morceau de tulle, alors que l'autre extrémité est fermée par une rondelle de polystyrène amovible qui sert de piston pour forcer les moustiques à se rapprocher du repas sanguin en réduisant l'espace disponible à raison de 60 femelles par boite environ. Les moustiques sont laissés à jeun pendant 24 heures avant l'expérience d'infection. Tous les moustiques utilisés pour les infections expérimentales étaient âgés entre 5 et 10 jours.

Tableau 19 : Récapitulatif des conditions d'infection pour les 4 campagnes

	Campagne 2005	Campagne 2006	Campagne 2007	Campagne 2009
Source du VHC	CHU – Grenoble	CHU – Grenoble	CHU – Grenoble	Biobanque de Picardie
Génotype viral	1b	1b	1b	1b
Origine des globules rouges	Mouton	Mouton	Mouton	Lapin
Charge virale dans le repas sanguin (copies/µl)	1000	830	1200	2400
Genres / espèces	Ae. vexans	Cx. pipiens / Ae.sp. (Ae. vexans + Ae. caspius)	Ae. vexans / Ae. caspius	*Ae. vexans* (souche KK)
Type de moustiques	Sauvages	Sauvages	Sauvages	D'élevage
Etat des moustiques lors de la collecte	Larves	Larves	Adultes	Œufs
Nombre de moustiques avant gorgement	170	150 / 110	200 / 130	320
Age au jour du gorgement (jours)	10	8	7	5
Durée du gorgement (heures)	16	16	16	16
Durée de l'élevage (jours)	21	21	15	30

c. Repas sanguin

Conditions préalables : Le repas sanguin est composé de globules rouges de mouton lavés additionnés par du sérum infectieux pour les tests d'infection, ou par un volume équivalent de tampon physiologique (ex. PBS 10mM) pour les témoins non infectés (*cf.* Tableau 19). Pour la procédure de lavage des globules rouges (volume de sang récolté dans un tube contenant 2% d'héparine): (i) Rajouter un volume de PBS 1X ; (ii) Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 rpm ; (iii) Reprendre le culot dans 1 volume de PBS ; (iv) Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 rpm ; (v) Refaire le lavage 3 fois ; (vi) Ramener le volume du culot au volume de sang de départ en rajoutant du sérum pour le repas virémique ou du PBS pour le repas non virémique.

i. Dispositif du repas sanguin artificiel

Pour alimenter les femelles, nous disposons de deux manières de faire : (i) Le gorgement à travers une membrane (système classique) : ce système est similaire à celui décrit par Rutledge *et al.* en 1964 (199). Le dispositif (*cf.* Figure 34) est placé au dessus de la boite de gorgement contenant les moustiques (*cf.* Figure 34 + § plus haut). Il s'agit d'un réservoir en verre traversé par une fente centrale. Le réservoir ne communique pas avec la fente centrale, mais il est percé de part et d'autre, permettant ainsi la circulation d'eau thermostatée (37°C). La base de ce dispositif est fermée par une membrane (ex. peau de poulet, parafilm, boudin de dialyse) qui permet aux moustiques d'aspirer le repas sanguin versé du côté supérieur de la fente. La circulation de l'eau chauffée à 37°C permet de chauffer le repas sanguin et la peau de poulet permet d'attirer les moustiques mimant ainsi les conditions naturelles de gorgement. (ii) Le gorgement par le système alternatif : les boites de gorgement dans ce cas sont complètement fermées du côté inférieur et couvertes du par un morceau de voile du côté supérieur. Le repas sanguin, dans ce cas, est présenté sur du coton qui est posé sur le voile (du coté supérieur de la boite) (198, 200).

ii. Levée du repas sanguin et tri des femelles gorgées

Après la durée du gorgement, le repas sanguin est levé, et les boites contenant les femelles sont mises dans de la glace pilée pour les endormir. Une fois endormies, seules les femelles gorgées sont récupérées et mises dans des boites d'élevage (environ 20 femelles par boite). Les boîtes d'élevage sont cylindriques et couvertes de part et d'autre par un voile. Il s'agit

d'une boite perforée (1cm Ø) permettant d'y introduire les femelles encore endormies. Un coton imbibé de solution de sucrose à 10% est déposé sur le voile supérieur pour nourrir les moustiques, ce coton est changé tous les 2 – 3 jours (chaque fois qu'il est sec). Les boîtes sont mises couvertes par du film plastique afin de garder l'environnement humide. Les moustiques sont ainsi maintenus en élevage jusqu'à la date du sacrifice. Pour sacrifier les moustiques, ces derniers sont mis dans un congélateur à -80°C.

d. Séparation : tête / reste du corps

Pour la détection de l'ARN du VHC dans têtes et les corps séparément, nous avons séparé les têtes du reste des corps en utilisant des scalpels stériles.

3. Clonage des produits amplifiés

Deux protocoles de clonage ont été utilisés : (i) clonage « à façon » dans des vecteurs types pUC18/19, (ii) clonage dans des vecteurs prêts à l'emploi de type pCRII TOPO (Invitrogen).

a. Protocole de clonage à façon :

La technique de clonage est employée ici pour isoler les produits de PCR *via* un vecteur plasmidique qui est ensuite inséré dans des bactéries. Ce vecteur présente un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline et, au niveau d'un site de restriction le gène *lacZ* codant pour l'enzyme b-ga*lacto*sidase, dont le substrat libéré prend une couleur bleue quand il est dégradé. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans le vecteur, ce gène n'est plus fonctionnel. Les colonies bactériennes blanches sont alors considérées comme positives, car contenant le fragment d'intérêt. La multiplication de ces bactéries permet l'obtention à l'identique d'un grand nombre de copies de l'insert.

i. Préparation de l'insert

Une amplification par PCR comme précédemment décrite est réalisée sur la séquence de l'IRES. Les produits de PCR sont purifiés sur colonne pour éliminer les nucléotides et amorces en excès dans le milieu réactionnel selon les recommandations du fournisseur (*cf.* § iii ci-dessus).

ii. Préparation de cellules compétentes

Les bactéries *Escherichia coli* DH5a sont mises en cul*ture pendant 16 h* dans une solution de milieu nutritif LB liquide à 37 °C. La culture est ensuite diluée au 1/100 dans le même milieu liquide, en présence de sulfate de magnésium de (MgSO4) à 20 mM. La densité optique (DO) de la solution réactionnelle est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les bactéries sont mises en culture lorsque la mesure de la DO_{590} est comprise entre 0,4 et 0,6 (obtenue après 2 à 3h de culture). Une première centrifugation est réalisée (5000 g, 10 min à 4 °C) pour récupérer les bactéries. Le culot est remis en suspension dans une solution contenant 100mM de chlorure de rubidium (RbCl), permettant par voie chimique de rendre les bactéries compétentes, en créant dans la paroi bactérienne des pores transitoires. Une nouvelle centrifugation est réalisée comme précédemment. Le culot est remis en suspension dans une solution de 10mM RbCl. La préparation aliquotée est conservée à -80 °C.

iii. Digestion plasmidique et ligation

Un microlitre de plasmide circulaire pUC18, contenant le gène de résistance à l'ampicilline est digéré par 1 µl d'enzyme de restriction à l'endroit où l'en veut insérer la séquence d'intérêt. Ce site de restriction se trouve au niveau du gène *lacZ*, codant pour la β-galactosidase. *La* préparation est incubée 24 h. Le vecteur est quantifié et sa concentration est ajustée à 20 ng/µl. Une déphosphorylation est réalisée pour permettre l'incorporation des inserts. Une séparation des produits de digestion par électrophorèse est réalisée pour vérifier la présence d'une bande à 2,7 kb correspondant à la taille du plasmide. Une étape de ligation permet l'incorporation de l'insert dans le plasmide. Pour cela, 10 µl d'insert (15 ng/µl) sont incubés pendant 12 h, en présence de 1 µl de vecteur (20 ng/µl), 1 µl de tampon de l'enzyme, 15 µl d'eau distillée et 1 µl de ligase T4 DNA Ligase (1u/µl) (Invitrogen).

b. Protocole de clonage dans pCR II TOPO®

Pour ce type de clonage nous avons utilisé le kit pCR II TOPO® (Invitrogen) selon les instructions fournies.

c. Transformation bactérienne

Les bactéries sont mises au contact de 5 µl de produits de ligation, puis placées 30 min dans la glace. Un choc thermique rend les bactéries compétentes. Ce choc thermique consiste en un passage rapide de 42 °C dans un bain-marie à 4 °C dans la glace pendant 2 min. Chaque produit de transformation est additionné de 500µl de milieu de culture LB et incubé 1 h 30 à 37 °C sous agitation permanente temps pour que le gène de résistance s'exprime. Les milieux de culture solides sont préparés avec 300 ml de milieu LB additionné d'agar, d'ampicilline (0,1 g/ml) et de 40 µl de Xgal (40 mg/ml), substrat de l'enzyme β-galactosidase ; 50 et 100 µl de produits de transformation sont étalés de manière homogène à la surface du milieu de culture. Les bactéries sont mises en culture pendant la nuit à 37 °C.

d. Analyse des produits de clonage

Les colonies blanches sont prélevées à l'aide d'un cure-dent puis diluées dans 200 µl d'eau distillée stérile et stockées à -20 °C. L'étude de l'insert est réalisée par PCR en utilisant directement la suspension bactérienne chauffée au préalable 3 min à 94 °C. Les amorces M15 r/f sont utilisées pour vérifier la présence du fragment inséré dans le plasmide. Ces

séquences amorces sont présentes sur le plasmide de part et d'autre du site de restriction de telle sorte que l'insert soit totalement amplifié.

4. Séquençage des produits amplifiés

Les séquençages sont réalisés chez Eurofins-MWG-Operon et au sein de la plateforme Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (PF8 - Génopole) de l'Institut Pasteur à Paris on utilisant la chimie Big Dye v.1.1 sur le séquenceur capillaire ABI3730XL™ (Applied BioSystems). Afin d'éviter les erreurs, les lectures sont effectuées dans les deux sens pour une séquence donnée.

5. Analyse des séquences

Nous avons utilisé l'outil Blast pour analyser nos séquences par rapport à la base de données mondiale (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), et des logiciels de bioinformatique, notamment, CLC Bio v.5.0 pour les analyses les plus fines (Triming, alignements, conversion ARN/ADN/protéines, comparaison de séquences, identification des mutations…).

Tableau 20 : Liste des couples d'amorces ayant permis d'obtenir des séquences amplifiées du génome du VHC sur les échantillons de l'infection expérimentale n°3

Couple d'amorces	Position amorce sens	Position amorce anti-sens	Taille	Gène
1TS / 2CH	53	272	220	5'UTR
1b-f / 1a-r	318	439	142	5'UTR – C
1e-f / 1e-r	1123	1598	488	E1 – E2
2e-f / 2d-r	2657	2957	318	P7 – NS2
3b-f / 3b-r	2954	3419	481	NS2
3d-f / 3c-r	3502	3727	246	NS3
3d-f / 3e-r	3502	4208	714	NS3
3e-f / 3e-r	3835	4208	390	NS3
3e-f / 4a-r	3835	4378	560	NS3
4a-f / 4a-r	3961	4378	435	NS3
4c-f / 4b-r	4485	4666	199	NS3
4d-f / 4d-r	4850	5322	491	NS3
5a-f / 5a-r	5182	5657	494	NS3 – NS4A – NS4B
5b-f / 5b-r	5514	6099	603	NS4B
5c-f / 5c-r	5884	6401	535	NS4B – NS5A
5e-f / 6b-r	6442	7355	918	NS5A
6a-f / 6a-r	6548	7076	537	NS5A
6c-f / 6b-r	7085	7355	290	NS5A
6d-f / 6d-r	7343	7827	504	NS5A – NS5B
6d-f / 6e-r	7343	8143	818	NS5B
6e-f / 7a-r	7639	8297	677	NS5B
6e-f / 6e-r	7639	8143	522	NS5B
6e-f / 6d-r	7639	7827	208	NS5B
7a-f / 7a-r	7824	8297	492	NS5B
PR1 / PR2	8245	8616	400	NS5B
7c-f / PR2	8297	8616	348	NS5B
7c-f/7b-r	8297	8537	258	NS5B
7c-f / PR2	8297	8616	350	NS5B
7d-f / 7e-r	8650	9383	751	NS5B – 3'UTR
7d-f / 7e-rint	8650	9288	673	NS5B
7d-f / 7d-r	8650	9132	501	NS5B

Tableau 21 : Liste des couples d'amorces ayant permis d'obtenir des séquences amplifiées du génome du VHC sur les échantillons de l'infection expérimentale n°4

Couple d'amorces	Position amorce sens	Position amorce anti-sens	Taille	Gène
1TS / 2CH	53	272	220	5'UTR
1c-f / 1c-r	700	1162	482	C – E1
1c-f / 1d-r	700	1356	674	C – E1
1c-f / 1b-r	700	824	143	C
1d-f / 1c-r	946	1162	236	E1
3d-f / 3c-r	3502	3727	246	NS3
3e-f / 3e-r	3835	4208	390	NS3
4a-f / 3e-r	3961	4208	265	NS3

Tableau 22 : Liste des amorces utilisées pour la détection de l'ARN du VHC

Taille	Amorce sens	Tm	Séquence	Amorce anti-sens	Tm	Séquence
73	>2a-f(1301)	55,30	5'-gggatatgatgatgaactgg	>1d-r(1356)	59,40	5'-acrgcttgtgggatccgg
122	>2c-f(1993)	54,80	5'-tggttyggctgtacatgg	>2b-r(2096)	59,90	5'-tgcttccggaagcartccg
141	>3b-f(2954)	60,50	5'-gccgcgatgccatcatcc	>3a-r(3077)	61,00	5'-gagcgcgyacraagtacgg
142	>1b-f(318)	60,50	5'-cgggaggtctcgtagacc	>1a-r(439)	63,70	5'-gcgcggcaacaggtaaactcc
160	>5a-f(5182)	54,80	5'-gtggaagtgtctcayacg	>4d-r(5322)	62,40	5'-ccaggtgctvgtgacgacc
199	>4c-f(4485)	56,00	5'-ctatggcaaagccatccc	>4b-r(4666)	53,70	5'-cattagagcgtctgttgc
204	>3b-f(2954)	60,50	5'-gccgcgatgccatcatcc	>2e-r(3140)	53,40	5'-ccrtttggacataatgacc
220	>2CH (53)	61,00	5’-aac tac tgt ctt cac gca gaa	>1TS (272)	62,20	5’-gcg acc caa cac tac tcg gct
246	>3d-f(3502)	58,80	5'-acaagaaccaggtcgaggg	>3c-r(3727)	63,10	5'-ccaartaaaggtccgagctgcc
251	>6b-f(6833)	62,40	5'-tcacagctcccatgygagcc	>6a-r(7076)	66,90	5'-atgttyccgcccatctcctgccg
258	>7c-f(8297)	57,70	5'-cgctgytttgactcaacgg	>7b-r(8537)	59,40	5'-cttygcagctcgacaggc
269	>5d-f(6151)	60,50	5'-ccccacgcactatgtgcc	>5c-r(6401)	61,00	5'-gccagactcccttgtaccc
307	>3a-f(2788)	63,50	5'-atggctgcatcgtgcggagg	>3a-r(3077)	61,00	5'-gagcgcgyacraagtacgg
310	>2a-f(1301)	55,30	5'-gggatatgatgatgaactgg	>1e-r(1598)	55,20	5'-ttgatgtgccagctgcc
337	>7a-f(7824)	59,70	5'-accgggacgtgctbaagg	>6e-r(8143)	56,70	5'-taragggccatyttctcgc
371	>5a-f(5182)	54,80	5'-gtggaagtgtctcayacg	>4e-r(5534)	54,80	5'-tctgcttgaaytgctcgg
387	>4e-f(5165)	57,30	5'-catcgtgggatcaaatgtgg	>4e-r(5534)	54,80	5'-tctgcttgaaytgctcgg
390	>3e-f(3835)	65,80	5'-cctacytgaagggctcytcggg	>3e-r(4208)	62,80	5'-cgcccgtggtgatggtcc
400	>PR1 (8245)	59,80	5’-tggggatcccgtatgatacccgctgctttga	>PR2 (8616)	58,30	(’-ggcggaattcctggtcatagcctccgtgaa
410	>7e-f(8913)	54,80	5'-cycacttcttctccatcc	>7e-rint(9288)	60,50	5'-gctgtgatatatgtctcc
423	>1a-f(37)	55,20	5'-atcactcccctgtgagg	>1a-r(439)	63,70	5'-gcgcggcaacaggtaaactcc
428	>1d-f(946)	56,00	5'-catgtcacgaacgactgc	>1d-r(1356)	59,40	5'-acrgcttgtgggatccgg
435	>4a-f(3961)	52,60	5'-atggaaactacyatgcgg	>4a-r(4378)	63,90	5'-cacgacragccgcgctcc
438	>2e-f(2657)	60,40	5'-tgttcttctgtgcygcctgg	>3a-r(3077)	61,00	5'-gagcgcgyacraagtacgg
455	>5e-f(6442)	60,50	5'-cacctgcccatgtggagc	>5e-r(6880)	59,40	5'-aggggtcggtragcatgg
467	>6c-f(7085)	62,40	5'-atgggcggraacatcacccg	>6c-r(7533)	63,10	5'-tcaagggggggcatggagg
478	>4b-f(4206)	58,20	5'-aaggaccatcaccacggg	>4b-r(4666)	53,70	5'-cattagagcgtctgttgc
481	>3b-f(2954)	60,50	5'-gccgcgatgccatcatcc	>3b-r(3419)	61,70	5'-atgggcgcraggagtcgc
482	>1c-f(700)	53,70	5'-ggtaaggtcatcgatacc	>1c-r(1162)	60,40	5'-agatcccccacgtacatrgc
488	>1e-f(1123)	59,40	5'-caygtcgayttgctcgttgg	>1e-r(1598)	55,20	5'-ttgatgtgccagctgcc
488	>7e-f(8913)	54,80	5'-cycacttcttctccatcc	>7e-r(9383)	60,50	5'-ggggagcaggtagatgcc
491	>4d-f(4850)	59,30	5'-gcatmtacaggtttgtgactcc	>4d-r(5322)	62,40	5'-ccaggtgctvgtgacgacc
492	>7a-f(7824)	59,70	5'-accgggacgtgctbaagg	>7a-r(8297)	57,70	5'-ccgttgagtcaaarcagcg
494	>5a-f(5182)	54,80	5'-gtggaagtgtctcayacg	>5a-r(5657)	54,80	5'-tcccgctgatgaarttcc
501	>7d-f(8650)	58,80	5'-cacggaggctatgactagg	>7d-r(9132)	61,00	5'-cttctggcccgatgtctcc
501	>2e-f(2657)	60,40	5'-tgttcttctgtgcygcctgg	>2e-r(3140)	53,40	5'-ccrtttggacataatgacc
504	>6d-f(7343)	58,20	5'-ccaataccacctccacgg	>6d-r(7827)	61,40	5'-catctccttgagcacgtccc
510	>4e-f(5165)	57,30	5'-catcgtgggatcaaatgtgg	>5a-r(5657)	54,80	5'-tcccgctgatgaarttcc
513	>4c-f(4485)	56,00	5'-ctatggcaaagccatccc	>4c-r(4978)	57,30	5'-ggtgtatttaggtaagcccg
516	>2a-f(1301)	55,30	5'-gggatatgatgatgaactgg	>2a-r(1805)	61,70	5'-gaggygcgtagtgccagc
521	>7b-f(8034)	55,60	5'-ttgayaccaccatcatggc	>7b-r(8537)	59,40	5'-cttygcagctcgacaggc
522	>6e-f(7639)	56,00	5'-gtcctacacatggacagg	>6e-r(8143)	56,70	5'-taragggccatyttctcgc
524	>2b-f(1589)	56,00	5'-aacaccaayggcagytgg	>2b-r(2096)	59,90	5'-tgcttccggaagcartccg

525	>1b-f(318)	60,50	5'-cgggaggtctcgtagacc	>1b-r(824)	56,70	5'-cctgttgcatagttcacgc
527	>6b-f(6833)	62,40	5'-tcacagctcccatgygagcc	>6b-r(7355)	62,40	5'-accgtcctcttyctccgtgg
535	>5c-f(5884)	58,80	5'-ataggccttgggaaggtgc	>5c-r(6401)	61,00	5'-gccagactcccttgtaccc
537	>6a-f(6548)	59,40	5'-caacgcrtacaccacggg	>6a-r(7076)	66,90	5'-atgttyccgcccatctcctgccg
541	>3d-f(3502)	58,80	5'-acaagaaccaggtcgaggg	>3d-r(4035)	57,00	5'-ggagcgtgtagatgggcc
549	>5d-f(6151)	60,50	5'-ccccacgcactatgtgcc	>5d-r(6678)	62,10	5'-gggcaytttacgttgtcrgtgg
553	>2d-f(2422)	57,70	5'-ctccaycagaacatcgtgg	>2d-r(2957)	58,20	5'-ggaggatgatggcatcgc
560	>3e-f(3835)	65,80	5'-cctacytgaagggctcytcggg	>4a-r(4378)	63,90	5'-cacgacragccgcgctcc
581	>2c-f(1993)	54,80	5'-tggttyggctgtacatgg	>2c-r(2555)	56,70	5'-gctatcagcagcatcatcc
603	>5b-f(5514)	64,70	5'-cgarcagggaatgcagctcgc	>5b-r(6099)	58,20	5'-agccggttcatccactgc
615	>7c-f(8297)	57,70	5'-cgctgytttgactcaacgg	>7c-r(8892)	57,30	5'-catcagaatcatccttgccc
642	>5e-f(6442)	60,50	5'-cacctgcccatgtggagc	>6a-r(7076)	66,90	5'-atgttyccgcccatctcctgccg
647	>3a-f(2788)	63,50	5'-atggctgcatcgtgcggagg	>3b-r(3419)	61,70	5'-atgggcgcraggagtcgc
665	>1d-f(946)	56,00	5'-catgtcacgaacgactgc	>1e-r(1598)	55,20	5'-ttgatgtgccagctgcc
673	>7d-f(8650)	58,80	5'-cacggaggctatgactagg	>7e-rint(9288)	60,50	5'-gctgtgatatatgtctcc
673	>2d-f(2422)	57,70	5'-ctccaycagaacatcgtgg	>3a-r(3077)	61,00	5'-gagcgcgyacraagtacgg
674	>1c-f(700)	53,70	5'-ggtaaggtcatcgatacc	>1d-r(1356)	59,40	5'-acrgcttgtgggatccgg
677	>6e-f(7639)	56,00	5'-gtcctacacatggacagg	>7a-r(8297)	57,70	5'-ccgttgagtcaaarcagcg
694	>1e-f(1123)	59,40	5'-caygtcgayttgctcgttgg	>2a-r(1805)	61,70	5'-gaggygcgtagtgccagc
702	>4d-f(4850)	59,30	5'-gcatmtacaggtttgtgactcc	>4e-r(5534)	54,80	5'-tctgcttgaaytgctcgg
704	>6b-f(6833)	62,40	5'-tcacagctcccatgygagcc	>6c-r(7533)	63,10	5'-tcaagggggggcatggagg
714	>3d-f(3502)	58,80	5'-acaagaaccaggtcgaggg	>3e-r(4208)	62,80	5'-cgcccgtggtgatggtcc
723	>4a-f(3961)	52,60	5'-atggaaactacyatgcgg	>4b-r(4666)	53,70	5'-cattagagcgtctgttgc
731	>7a-f(7824)	59,70	5'-accgggacgtgctbaagg	>7b-r(8537)	59,40	5'-cttygcagctcgacaggc
736	>2d-f(2422)	57,70	5'-ctccaycagaacatcgtgg	>2e-r(3140)	53,40	5'-ccrtttggacataatgacc
746	>5d-f(6151)	60,50	5'-ccccacgcactatgtgcc	>5e-r(6880)	59,40	5'-aggggtcggtragcatgg
751	>7d-f(8650)	58,80	5'-cacggaggctatgactagg	>7e-r(9383)	60,50	5'-ggggagcaggtagatgcc
762	>6c-f(7085)	62,40	5'-atgggcggraacatcacccg	>6d-r(7827)	61,40	5'-catctccttgagcacgtccc
778	>2e-f(2657)	60,40	5'-tgttcttctgtgcygcctgg	>3b-r(3419)	61,70	5'-atgggcgcraggagtcgc
792	>4b-f(4206)	58,20	5'-aaggaccatcaccacggg	>4c-r(4978)	57,30	5'-ggtgtatttaggtaagcccg
792	>3b-f(2954)	60,50	5'-gccgcgatgccatcatcc	>3c-r(3727)	63,10	5'-ccaartaaaggtccgagctgcc
806	>1a-f(37)	55,20	5'-atcactcccctgtgagg	>1b-r(824)	56,70	5'-cctgttgcatagttcacgc
808	>2a-f(1301)	55,30	5'-gggatatgatgatgaactgg	>2b-r(2096)	59,90	5'-tgcttccggaagcartccg
813	>6a-f(6548)	59,40	5'-caacgcrtacaccacggg	>6b-r(7355)	62,40	5'-accgtcctcttyctccgtgg
815	>5c-f(5884)	58,80	5'-ataggccttgggaaggtgc	>5d-r(6678)	62,10	5'-gggcaytttacgttgtcrgtgg
818	>6d-f(7343)	58,20	5'-ccaataccacctccacgg	>6e-r(8143)	56,70	5'-taragggccatyttctcgc
825	>4d-f(4850)	59,30	5'-gcatmtacaggtttgtgactcc	>5a-r(5657)	54,80	5'-tcccgctgatgaarttcc
848	>3e-f(3835)	65,80	5'-cctacytgaagggctcytcggg	>4b-r(4666)	53,70	5'-cattagagcgtctgttgc
854	>7c-f(8297)	57,70	5'-cgctgytttgactcaacgg	>7d-r(9132)	61,00	5'-cttctggcccgatgtctcc
856	>4c-f(4485)	56,00	5'-ctatggcaaagccatccc	>4d-r(5322)	62,40	5'-ccaggtgctvgtgacgacc
864	>1b-f(318)	60,50	5'-cgggaggtctcgtagacc	>1c-r(1162)	60,40	5'-agatcccccacgtacatrgc
871	>1d-f(946)	56,00	5'-catgtcacgaacgactgc	>2a-r(1805)	61,70	5'-gaggygcgtagtgccagc
878	>7b-f(8034)	55,60	5'-ttgayaccaccatcatggc	>7c-r(8892)	57,30	5'-catcagaatcatccttgccc
884	>3d-f(3502)	58,80	5'-acaagaaccaggtcgaggg	>4a-r(4378)	63,90	5'-cacgacragccgcgctcc
905	>5b-f(5514)	64,70	5'-cgarcagggaatgcagctcgc	>5c-r(6401)	61,00	5'-gccagactcccttgtaccc

911	>1c-f(700)	53,70	5'-ggtaaggtcatcgatacc	>1e-r(1598)	55,20	5'-ttgatgtgccagctgcc
916	>6e-f(7639)	56,00	5'-gtcctacacatggacagg	>7b-r(8537)	59,40	5'-cttygcagctcgacaggc
918	>5e-f(6442)	60,50	5'-cacctgcccatgtggagc	>6b-r(7355)	62,40	5'-accgtcctcttyctccgtgg
933	>5d-f(6151)	60,50	5'-ccccacgcactatgtgcc	>6a-r(7076)	66,90	5'-atgttyccgcccatctcctgccg
936	>5a-f(5182)	54,80	5'-gtggaagtgtctcayacg	>5b-r(6099)	58,20	5'-agccggttcatccactgc
952	>4e-f(5165)	57,30	5'-catcgtgggatcaaatgtgg	>5b-r(6099)	58,20	5'-agccggttcatccactgc
958	>3a-f(2788)	63,50	5'-atggctgcatcgtgcggagg	>3c-r(3727)	63,10	5'-ccaartaaaggtccgagctgcc
973	>6d-f(7343)	58,20	5'-ccaataccacctccacgg	>7a-r(8297)	57,70	5'-ccgttgagtcaaarcagcg
982	>2c-f(1993)	54,80	5'-tggttyggctgtacatgg	>2d-r(2957)	58,20	5'-ggaggatgatggcatcgc
983	>2b-f(1589)	56,00	5'-aacaccaayggcagytgg	>2c-r(2555)	56,70	5'-gctatcagcagcatcatcc
986	>1e-f(1123)	59,40	5'-caygtcgayttgctcgttgg	>2b-r(2096)	59,90	5'-tgcttccggaagcartccg
990	>6a-f(6548)	59,40	5'-caacgcrtacaccacggg	>6c-r(7533)	63,10	5'-tcaagggggggcatggagg
999	>6b-f(6833)	62,40	5'-tcacagctcccatgygagcc	>6d-r(7827)	61,40	5'-catctccttgagcacgtccc
1012	>5c-f(5884)	58,80	5'-ataggccttgggaaggtgc	>5e-r(6880)	59,40	5'-aggggtcggtragcatgg
1013	>2d-f(2422)	57,70	5'-ctccaycagaacatcgtgg	>3b-r(3419)	61,70	5'-atgggcgcraggagtcgc
1026	>7c-f(8297)	57,70	5'-cgctgytttgactcaacgg	>7e-rint(9288)	60,50	5'-gctgtgatatatgtctcc
1037	>4a-f(3961)	52,60	5'-atggaaactacyatgcgg	>4c-r(4978)	57,30	5'-ggtgtatttaggtaagcccg
1056	>1b-f(318)	60,50	5'-cgggaggtctcgtagacc	>1d-r(1356)	59,40	5'-acrgcttgtgggatccgg
1067	>4c-f(4485)	56,00	5'-ctatggcaaagccatccc	>4e-r(5534)	54,80	5'-tctgcttgaaytgctcgg
1076	>6c-f(7085)	62,40	5'-atgggcggraacatcacccg	>6e-r(8143)	56,70	5'-taragggccatyttctcgc
1087	>3b-f(2954)	60,50	5'-gccgcgatgccatcatcc	>3d-r(4035)	57,00	5'-ggagcgtgtagatgggcc
1088	>7a-f(7824)	59,70	5'-accgggacgtgctbaagg	>7c-r(8892)	57,30	5'-catcagaatcatccttgccc
1089	>2e-f(2657)	60,40	5'-tgttcttctgtgcygcctgg	>3c-r(3727)	63,10	5'-ccaartaaaggtccgagctgcc
1095	>5e-f(6442)	60,50	5'-cacctgcccatgtggagc	>6c-r(7533)	63,10	5'-tcaagggggggcatggagg
1102	>2c-f(1993)	54,80	5'-tggttyggctgtacatgg	>3a-r(3077)	61,00	5'-gagcgcgyacraagtacgg
1104	>7c-f(8297)	57,70	5'-cgctgytttgactcaacgg	>7e-r(9383)	60,50	5'-ggggagcaggtagatgcc
1117	>1c-f(700)	53,70	5'-ggtaaggtcatcgatacc	>2a-r(1805)	61,70	5'-gaggygcgtagtgccagc
1117	>7b-f(8034)	55,60	5'-ttgayaccaccatcatggc	>7d-r(9132)	61,00	5'-cttctggcccgatgtctcc
1135	>4b-f(4206)	58,20	5'-aaggaccatcaccacggg	>4d-r(5322)	62,40	5'-ccaggtgctvgtgacgacc
1145	>1a-f(37)	55,20	5'-atcactcccctgtgagg	>1c-r(1162)	60,40	5'-agatcccccacgtacatrgc
1162	>3e-f(3835)	65,80	5'-cctacytgaagggctcytcggg	>4c-r(4978)	57,30	5'-ggtgtatttaggtaagcccg
1163	>1d-f(946)	56,00	5'-catgtcacgaacgactgc	>2b-r(2096)	59,90	5'-tgcttccggaagcartccg
1165	>2c-f(1993)	54,80	5'-tggttyggctgtacatgg	>2e-r(3140)	53,40	5'-ccrtttggacataatgacc
1172	>3d-f(3502)	58,80	5'-acaagaaccaggtcgaggg	>4b-r(4666)	53,70	5'-cattagagcgtctgttgc
1185	>5b-f(5514)	64,70	5'-cgarcagggaatgcagctcgc	>5d-r(6678)	62,10	5'-gggcaytttacgttgtcrgtgg
1190	>4c-f(4485)	56,00	5'-ctatggcaaagccatccc	>5a-r(5657)	54,80	5'-tcccgctgatgaarttcc
1199	>5c-f(5884)	58,80	5'-ataggccttgggaaggtgc	>6a-r(7076)	66,90	5'-atgttyccgcccatctcctgccg
1209	>5d-f(6151)	60,50	5'-ccccacgcactatgtgcc	>6b-r(7355)	62,40	5'-accgtcctcttyctccgtgg
1212	>6d-f(7343)	58,20	5'-ccaataccacctccacgg	>7b-r(8537)	59,40	5'-cttygcagctcgacaggc
1231	>6c-f(7085)	62,40	5'-atgggcggraacatcacccg	>7a-r(8297)	57,70	5'-ccgttgagtcaaarcagcg
1238	>5a-f(5182)	54,80	5'-gtggaagtgtctcayacg	>5c-r(6401)	61,00	5'-gccagactcccttgtaccc
1253	>3a-f(2788)	63,50	5'-atggctgcatcgtgcggagg	>3d-r(4035)	57,00	5'-ggagcgtgtagatgggcc
1254	>4e-f(5165)	57,30	5'-catcgtgggatcaaatgtgg	>5c-r(6401)	61,00	5'-gccagactcccttgtaccc
1260	>3b-f(2954)	60,50	5'-gccgcgatgccatcatcc	>3e-r(4208)	62,80	5'-cgcccgtggtgatggtcc
1267	>4d-f(4850)	59,30	5'-gcatmtacaggtttgtgactcc	>5b-r(6099)	58,20	5'-agccggttcatccactgc

1267	>2a-f(1301)	55,30	5'-gggatatgatgatgaactgg	>2c-r(2555)	56,70	5'-gctatcagcagcatcatcc
1273	>6e-f(7639)	56,00	5'-gtcctacacatggacagg	>7c-r(8892)	57,30	5'-catcagaatcatccttgccc
1285	>6a-f(6548)	59,40	5'-caacgcrtacaccacggg	>6d-r(7827)	61,40	5'-catctccttgagcacgtccc
1289	>7b-f(8034)	55,60	5'-ttgayaccaccatcatggc	>7e-rint(9288)	60,50	5'-gctgtgatatatgtctcc
1293	>1b-f(318)	60,50	5'-cgggaggtctcgtagacc	>1e-r(1598)	55,20	5'-ttgatgtgccagctgcc
1313	>6b-f(6833)	62,40	5'-tcacagctcccatgygagcc	>6e-r(8143)	56,70	5'-taragggccatyttctcgc
1324	>2d-f(2422)	57,70	5'-ctccaycagaacatcgtgg	>3c-r(3727)	63,10	5'-ccaartaaaggtccgagctgcc
1327	>7a-f(7824)	59,70	5'-accgggacgtgctbaagg	>7d-r(9132)	61,00	5'-cttctggcccgatgtctcc
1337	>1a-f(37)	55,20	5'-atcactcccctgtgagg	>1d-r(1356)	59,40	5'-acrgcttgtgggatccgg
1346	>4b-f(4206)	58,20	5'-aaggaccatcaccacggg	>4e-r(5534)	54,80	5'-tctgcttgaaytgctcgg
1367	>7b-f(8034)	55,60	5'-ttgayaccaccatcatggc	>7e-r(9383)	60,50	5'-ggggagcaggtagatgcc
1380	>4a-f(3961)	52,60	5'-atggaaactacyatgcgg	>4d-r(5322)	62,40	5'-ccaggtgctvgtgacgacc
1382	>5b-f(5514)	64,70	5'-cgarcagggaatgcagctcgc	>5e-r(6880)	59,40	5'-aggggtcggtragcatgg
1384	>2e-f(2657)	60,40	5'-tgttcttctgtgcygcctgg	>3d-r(4035)	57,00	5'-ggagcgtgtagatgggcc
1384	>2b-f(1589)	56,00	5'-aacaccaayggcagytgg	>2d-r(2957)	58,20	5'-ggaggatgatggcatcgc
1386	>5d-f(6151)	60,50	5'-ccccacgcactatgtgcc	>6c-r(7533)	63,10	5'-tcaagggggggcatggagg
1390	>5e-f(6442)	60,50	5'-cacctgcccatgtggagc	>6d-r(7827)	61,40	5'-catctccttgagcacgtccc
1409	>1c-f(700)	53,70	5'-ggtaaggtcatcgatacc	>2b-r(2096)	59,90	5'-tgcttccggaagcartccg
1426	>3a-f(2788)	63,50	5'-atggctgcatcgtgcggagg	>3e-r(4208)	62,80	5'-cgcccgtggtgatggtcc
1430	>3b-f(2954)	60,50	5'-gccgcgatgccatcatcc	>4a-r(4378)	63,90	5'-cacgacragccgcgctcc
1442	>2c-f(1993)	54,80	5'-tggttyggctgtacatgg	>3b-r(3419)	61,70	5'-atgggcgcraggagtcgc
1445	>1e-f(1123)	59,40	5'-caygtcgayttgctcgttgg	>2c-r(2555)	56,70	5'-gctatcagcagcatcatcc
1468	>6b-f(6833)	62,40	5'-tcacagctcccatgygagcc	>7a-r(8297)	57,70	5'-ccgttgagtcaaarcagcg
1469	>4b-f(4206)	58,20	5'-aaggaccatcaccacggg	>5a-r(5657)	54,80	5'-tcccgctgatgaarttcc
1470	>6c-f(7085)	62,40	5'-atgggcggraacatcacccg	>7b-r(8537)	59,40	5'-cttygcagctcgacaggc
1475	>5c-f(5884)	58,80	5'-ataggccttgggaaggtgc	>6b-r(7355)	62,40	5'-accgtcctcttyctccgtgg
1486	>3d-f(3502)	58,80	5'-acaagaaccaggtcgaggg	>4c-r(4978)	57,30	5'-ggtgtatttaggtaagcccg
1499	>1b-f(318)	60,50	5'-cgggaggtctcgtagacc	>2a-r(1805)	61,70	5'-gaggygcgtagtgccagc
1499	>7a-f(7824)	59,70	5'-accgggacgtgctbaagg	>7e-rint(9288)	60,50	5'-gctgtgatatatgtctcc

Résultats et discussion – 1ière partie

Journal of Medical Virology 81:1726–1733 (2009)

Inhibition of the Binding of HCV Serum Particles to Human Hepatocytes by E1E2-Specific D32.10 Monoclonal Antibody

Ndiémé Ndongo,[1,2] Yassine Rechoum,[3] Sylvie De Sequeira,[1,2] Fabien Zoulim,[1,2,4] Christian Trépo,[1,2,4] Emmanuel Drouet,[3] and Marie-Anne Petit[1,2]*

[1]*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U871, Lyon, France*
[2]*Université Lyon 1, IFR62 Lyon-Est, Lyon, France*
[3]*Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), Université Joseph Fourier, Grenoble I, UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble, France*
[4]*Hospices Civils de Lyon, Hôtel Dieu, Service d'Hépatologie, Lyon, France*

The aim of this study was to determine the inhibition of binding activity of the monoclonal antibody (mAb) D32.10 which recognizes a highly conserved discontinuous antigenic determinant (E1:297–306, E2:480–494, and E2:613–621) expressed on the surface of serum-derived HCV particles (HCVsp) of genotypes 1a, 1b, 2a, and 3a. To this end, an in vitro direct cell-binding assay based on the attachment of radiolabeled HCVsp was developed, and Scatchard plots were used to analyze ligand–receptor binding data. HCV adsorption was also assessed by quantitating cell-associated viral RNA by a real-time RT-PCR method. Saturable concentration-dependent specific binding of HCVsp to Huh-7 or HepaRG cells was demonstrated. The Scatchard transformed data showed two-site interaction for Huh-7 and proliferative HepaRG cells: the high-affinity binding sites ($K_{d_1} = 0.1–0.5\,\mu g/ml$) and the low-affinity binding sites ($K_{d_2} = 5–10\,\mu g/ml$), and one-site high-affinity binding model between E1E2/D32.10-positive HCVsp and hepatocyte-like differentiated HepaRG cells. The E1E2-specific mAb D32.10 inhibited efficiently (>60%) and selectively the binding with an $IC_{50} \leq 0.5\,\mu g/ml$ in all the experimental approaches using serum HCV of genotype either 3 or 1b. This supports the involvement of the E1E2/D32.10 discontinuous antigenic determinant in the interactions between human hepatocytes and HCVsp, and suggests that D32.10-like antibodies present in sera from patients infected with HCV could play a protective role. ***J. Med. Virol. 81:1726–1733, 2009.***
© 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis C virus; serum particles; human hepatocytes; cell-binding assays; anti-E1E2 monoclonal antibody

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infects about 170 million people worldwide, causing chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [Chisari, 2005]. Current treatments are not optimal, and a vaccine is not available to prevent HCV infection [Feld and Hoofnagle, 2005]. HCV is a positive-strand RNA virus in the *Flaviviridae* family that encodes a polyprotein of ~3,000 amino acids [Lindenbach et al., 2007]. Cellular signal peptidases and virally encoded proteases are involved in polyprotein processing to produce the structural proteins, core (C) and envelope glycoproteins 1 and 2 (E1 and E2), and the non-structural (NS) proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B [Lindenbach et al., 2007]. Similar to other enveloped viruses, E1 and E2 envelope glycoproteins most likely play a pivotal role in HCV life cycle, that is, virus binding and entry, which are critical for tissue tropism and pathogenesis. Little is known about the molecular events that mediate cell entry for HCV. However, significant progress has been made with the development of several HCV models: HCV-like particles (HCV-LPs) produced in insect cells [Baumert et al., 1998; Triyatni et al., 2002; Wellnitz et al., 2002], HCV pseudotyped particles (HCVpp) displaying unmodified and functional E1 and E2 glycoproteins onto retroviral and lentiviral core particles [Hsu et al., 2003; Bartosch et al., 2003a,b], and cell-culture grown HCV (HCVcc) obtained after transfection of a unique HCV genotype 2a complete replicon (JFH-1) into Huh-7 or Huh7-derived

Grant sponsor: INSERM; Grant sponsor: Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS), France.

*Correspondence to: Marie-Anne Petit, INSERM U871, 151 Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France.
E-mail: marie-anne.petit@inserm.fr

Accepted 23 April 2009
DOI 10.1002/jmv.21562
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

© 2009 WILEY-LISS, INC.

cells (Huh-7.5 or Huh-7.5.1) [Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005]. By using such models, it was possible to observe that HCV enters into target cells in a multistep process involving glycosaminoglycans (GAGs) and more especially heparin-like GAGs which play a key role for the initial attachment of the virus, followed by the interaction with the tetraspanin CD81 among others [see for review, Dubuisson et al., 2008]. CD81 is now considered as a central regulator of cellular events required for HCV infection of human hepatocytes [Brazzoli et al., 2008]. However, the remaining limitations of HCVcc model are its tight dependence on the JFH-1 NS genes (replicase complex) of genotype 2a and that robust viral growth is observed only in immortalized tumor Huh-7 or Huh-7-derived cells that respond poorly to treatment with double-stranded RNA (dsRNA) [Foy et al., 2005]. Therefore, it is essential to extend entry studies to in vivo-produced HCV and other cell types than highly permissive Huh-7 sub-lines. It has been shown recently that serum-derived HCV infection of primary human hepatocytes is CD81 dependent [Molina et al., 2008]. However, the nature of the cell–virion combination appeared to be a determinant factor for virus entry.

Enveloped HCV particles have been identified previously in the serum of patients with chronic hepatitis C, so-called HCVsp [Petit et al., 2005], and a unique monoclonal antibody (mAb) D32.10 was described which recognizes a highly conserved discontinuous antigenic determinant (E1:297–306, E2:480–494, and E2:613–621) expressed on the surface of HCVsp (genotypes 1a, 1b, 2a, and 3a) [Petit et al., 2003, 2005]. Indeed, the two regions in the E2 glycoprotein include (i) putative CD81-binding region 1 (aa 474–492) and region 3 (aa 612–619) of HCV [Yagnik et al., 2000; Rothwangl et al., 2008], and (ii) highly conserved GAG-binding sites (PRR1: aa 482–488 and CR4: aa 615–621) [Olenina et al., 2005]. It has been shown recently that the CD81-binding region 3 (aa 612–619), which is highly conserved across genotypes, was responsible for mediating E2-binding CD81 [Rothwangl et al., 2008]. Although the CD81-binding region 1 (aa 474–492) of E2 has been reported not to mediate binding to CD81, it could play a role in HCVpp infectivity [Rothwangl et al., 2008]. Furthermore, human-derived mAbs against E1 (aa 288–326) have been shown to neutralize HCVpp infection (except genotype 3) as well as the infectivity of HCVcc of genotypes 1a and 2a [Meunier et al., 2008]. Thus, it was expected that D32.10 which recognizes one E1 and two E2 highly conserved regions important for HCV entry could be able to block HCV–cell interactions.

The molecular basis of interactions between HCVsp and human Huh-7 or highly differentiated liver progenitor HepaRG cells [Parent et al., 2004; Maire et al., 2008], and the inhibition of binding (IOB) activity of the E1E2-specific mAb D32.10 were investigated.

MATERIALS AND METHODS

The primary aim of this study was to develop cell-binding assays to study HCVsp–cell (Huh-7 or HepaRG) interactions. The study allowed the examination of saturation radioligand binding data by Scatchard plots and inhibitory activities of the D32.10 mAb.

Cell Culture

HepaRG cells were cultured as described previously [Parent et al., 2004; Maire et al., 2008]. To induce the differentiated stage, HepaRG cells were not split after confluency reached at day 7, and maintained up to day 28–42 in a medium without DMSO but containing 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate. Huh-7 cells were maintained in DMEM (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise Cedex, France) containing 4.5 g/ml glucose (Eurobio, Les Ulis, France) and supplemented with 10% FCS (Foetal Clone II, Hyclone, Thermo Fisher Scientific p/a Perbio Science France SAS, Brebières, France), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, penicillin, and streptomycin (Cambrex Bio Science, St. Beauzire, France).

Virus Samples

HCVsp (Lat., genotype 3a) were purified from plasmapheresis samples of a patient infected chronically by successive ultracentrifugation steps as described previously [Petit et al., 2005]. The final HCVsp-Lat total pellet (TP) was resuspended in TAN buffer (0.05 M triethanolamine [pH 8], 0.1 M NaCl) and stored at −80°C. The HCVsp-Lat TP sample contained 10^6 copies of HCV RNA or genome equivalents (Geq) per mg of protein. The E1E2 antigenic activity was positive up to 1 Geq or 1 ng of protein. The characteristics of particles from HCVsp-Lat TP were similar to those reported previously for another HCVsp TP preparation of genotype 1a/2a [Petit et al., 2005]. When the HCVsp-Lat TP preparation was analyzed in sucrose gradient, HCVsp-Lat E1E2/D32.10-positive fractions (EPF) were recovered as a peak at a density of 1.17 g/ml [Petit et al., 2005], and stored at −80°C for binding studies.

Radioiodination of HCVsp

Purified HCVsp-Lat TP and EPF were radioiodinated according to the chloramine T method described by Tejedor and Ballesta [1982]. The radiolabeled proteins were separated from free iodine by passage on PD10 column (Amersham Biosciences, Orsay Cedex, France), then precipitated with trichloroacetic acid. Finally, radioactivity was counted before and after passage on the column (COBRA II, Auto-Gamma® Counting System, Packard Instruments S.A., Rungis, France). The yield was around 90% and the specific radioactivity 0.15 μCi per μg of protein or 10^3 Geq for low-affinity (LA) binding studies and 0.75 μCi per μg of protein or 10^3 Geq for high-affinity (HA) binding studies. After elution from PD10 column, the radiolabeled material was recovered as a single peak (Fig. 1A). By SDS–PAGE analysis in reducing conditions and autoradiography of ^{125}I-labeled HCVsp-lat TP (Fig. 1B, panel a), two bands at the expected size of E1 and E2 were found labeled strongly

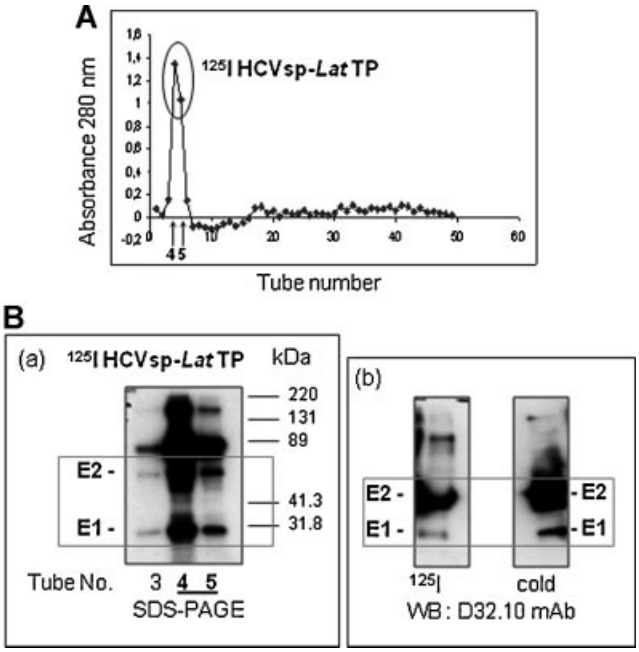


Fig. 1. **A**: Size-exclusion chromatography of radiolabeled (^{125}I) HCVsp-Lat TP. The profile of elution from PD10 column. Absorbance at 280 nm was determined for each fraction (tube number). Radiolabeled-HCVsp-Lat TP was recovered in fractions 4 and 5 (↑). **B**: Analysis by SDS–PAGE and autoradiography of ^{125}I-HCVsp-Lat TP (tubes no. 3–5, panel a). Experiments of Western blot (WB) using the D32.10 mAb (IgG, 5 μg/ml) with either ^{125}I-HCVsp-Lat (tube no. 4, left part of panel b) or unlabeled (cold) HCVsp-Lat TP preparation (right part of panel b) at the same concentration of 5 μg/ml. Molecular weights are expressed in kDa and indicated on the right of panel a.

in two fractions #4 and #5. By Western blotting (WB) (Fig. 1B, panel b), same proteins from either ^{125}I-HCVsp or from cold HCVsp were recognized by D32.10 mAb. Two major bands at the expected size of E1 and E2 were labeled strongly. Higher molecular weight species were seen in the gels, and could be potential contaminating bands and/or oligomeric forms of E1E2.

Cell-Binding Assays and Scatchard Plot Analysis

At day 4 after plating, Huh-7 or HepaRG cells were incubated with RPMI 1640 (Invitrogen SARL) containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA to suspend the cells, washed with FCS containing culture medium, and resuspended in RPMI containing 1% bovine serum albumin (RPMI-BSA). Binding experiments were carried out in RPMI-BSA as described previously [Godard et al., 1992]. Cells (0.6×10^6 per well) were incubated with increasing concentrations of labeled HCVsp-Lat TP or EPF. Non-specific binding was evaluated by including a 200-fold excess of unlabeled HCVsp-Lat preparation (four experimental points). Incubation was performed under agitation for 2 hr at room temperature. Cell bound (B) and unbound (F) fractions were separated by centrifugation through a layer of dibutyl phthalate (85%) and paraffin oil (15%) [Godard et al., 1992]. Regression analysis of data and the Scatchard transformation were performed using the GraphPad PRISM Version 4.0 Software.

For IOB experiments, increasing concentrations from 0.2 to 300 μg/ml (cf. Table I) of D32.10 [Petit et al., 2003], AP33 [Tarr et al., 2006], or a mouse IgG1κ (MOPC-21, Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) as irrelevant control antibody were incubated for 1 hr at 37°C with a fixed, non-saturable concentration of labeled HCVsp-Lat TP or EPF before addition of cells for virus-binding experiments performed at room temperature as described above.

Quantitation of Cell-Associated Viral RNA (cavRNA)

The experiments were carried out on Huh-7 cells cultured up to sub-confluence on 24-well plates (10^6 cells per well) as described previously [Germi et al., 2002]. For binding studies, each well was inoculated with 200 μl of FCS-free medium containing 45,000 copies of

TABLE I. Concentrations of Irrelevant, AP33, or D32.10 Monoclonal Antibodies Used in IOB Experiments

mAb concentration (μg/ml)	Irrelevant MOPC-21 (Sigma–Aldrich)	Irrelevant RCA 1G6 (house)	AP33 mAb [Tarr et al., 2006]	D32.10 mAb [Petit et al., 2003]
0.2	n.d.	X	X[a]	X
0.5	n.d.	n.d.	X[a]	X
1.0	X	n.d.	X[a]	X
1.5	n.d.	n.d.	X[a]	X
2.0	X	X	X[a]	X
5.0	n.d.	n.d.	X[a]	X
10	X	n.d.	X	X
15	n.d.	n.d.	X	n.d.
20	n.d.	X	X	X
50	n.d.	n.d.	X	X
100	X	X	X	X
150	n.d.	n.d.	X	n.d.
200	n.d.	n.d.	X	X
300	n.d.	n.d.	X	n.d.

n.d., not determined.
X, concentration tested in 2 (AP33), 4 (RCA 1G6), or 10 (MOPC-1 and D32.10) independent experiments (in triplicate).
[a]Only included in one experiment in triplicate.

HCV RNA from serum sample positive for HCV of genotype 1b. After 2 hr of incubation at room temperature, non-adsorbed virus was eliminated by washing wells 5–6 times and the adsorbed cells collected by scratching in 200 μl of FCS-free medium. The last wash was collected to measure residual HCV RNA. For inhibition of adsorption assays, the inoculum was incubated with D32.10 (0.2, 2.0, 20, or 100 μg/ml) for 1 hr at room temperature before addition to cells. The mAb RCA 1G6 (IgG1) was used as a control (Table I). The viral load of the inoculum was 4×10^6 copies/ml (COBAS AMPLICOR HCV MONITOR test, Roche Diagnostics, Meylan, France). The quantitation of *cav*RNA was carried out using the real-time one-step RT-PCR method on LightCycler instrument (Roche Diagnostics). The inhibition of adsorption by D32.10 was measured in 2–4 independent assays for each experiment.

RESULTS

Binding Properties of HCVsp to Huh-7 or Highly Differentiated HepaRG Cells

Binding assays were first conducted with radiolabeled purified HCVsp-Lat TP. The standard approach for analyzing saturation binding experiments was to subtract the non-specific curve from the total binding curve to determine the specific (receptor) binding for each concentration of the radioligand. Similarly, specific saturable binding of HCVsp-Lat TP to Huh-7 (Fig. 2A) and HepaRG cells at proliferating (Fig. 2B) or differentiated (Fig. 2C) stage was shown to be concentration-dependent and to reach saturation between 3 and 5 μg of protein/ml corresponding to $3–5 \times 10^3$ Geq/ml (panels a). However, it is interesting to note that the degree of non-specific binding which was subtracted from the total binding by the use of the cold particles varied and decreased from 75% for Huh-7 cells to 50% for proliferating HepaRG cells and to only 25% for differentiated HepaRG cells. Thus, the binding of HCVsp to Huh-7 cells is much less specific (only 25%, reflected by no significant saturation of the curve, Fig. 2A) than the binding to HepaRG cells, especially when the cells are differentiated (75% of specific binding, Fig. 2C). The analysis by Scatchard plot yielded a linear representation (panels b) from saturation binding experiments in all the cases allowing the determination of the number of sites, B_{max} (*X*-axis intercept), and the ligand affinity, as equilibrium dissociation constant or K_d (negative reciprocal of the slope). For Huh-7 and proliferating HepaRG cells, two classes of binding sites with HA $K_{d_1} = 0.1–0.5$ μg/ml and LA $K_{d_2} = 5–10$ μg/ml were identified (Fig. 2A and B, respectively, panels b). Once again it was noted that the HA-binding sites were much more difficult to define for the Huh-7 hepatoma cells than for highly differentiated HepaRG cells. Globally, from 20 independent experiments (each point in duplicate or triplicate), accessible HA-binding sites were estimated at 500–2,000 and LA-binding sites at 2,000–10,000 per

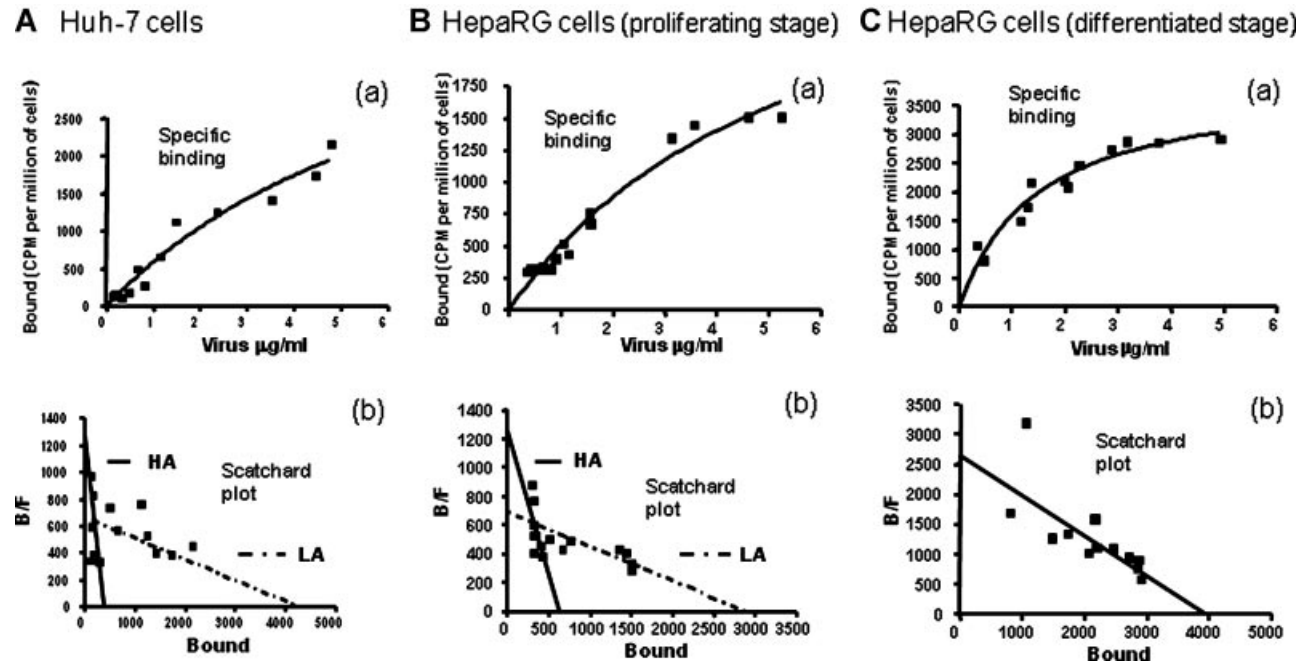


Fig. 2. Properties of the binding of ^{125}I-HCVsp-Lat TP to human hepatocytes. **A**: Huh-7 cells. **B**: HepaRG cells at proliferating stage. **C**: HepaRG cells at differentiated stage. **Panels a**: Concentration-dependent saturable specific binding curves (bound or B) calculated by subtracting the non-specific curve (obtained in the presence of an excess of unlabeled ligand) from the total binding curve. **Panels b**: Scatchard plots formed with the GraphPad PRISM version 4.0 software. The ratio of B to F (Free) was calculated for each concentration. ^{125}I-HCVsp-Lat TP (1–5 μg of protein/ml, corresponding to $10^3–5 \times 10^3$ Geq/ml) was incubated for 2 hr at room temperature with Huh-7 or HepaRG cells either at day 4 (prolif.) or at day 38 (diff.) after plating. The results are representative of at least 20 independent experiments for Huh7 or HepaRG prolif. and 6 independent experiments for HepaRG diff. B_{max} is expressed in number of binding sites per 10^6 cells, and K_d in μg of protein/ml. HA, high affinity; LA, low affinity.

10^6 cells, corresponding to the binding of around 1Geq/HA-binding site. Concerning the HepaRG cells at the differentiated stage (Fig. 2C) where hepatocyte-like cells represented around 40% of the total cell population [Parent et al., 2004], the analysis of the most specific saturation binding data (panel a) led to a one-site Scatchard plot (panel b) showing only one class of HA-binding sites with a significantly higher density (B_{max} corresponding to approximately 4,000 sites per 10^6 cells) and a K_d value of 1.5 μg/ml (panel b). The results demonstrate that HCVsp particles bind more specifically to HepaRG cells than to Huh-7 immortalized tumor cells and that the HA-binding sites are expressed preferentially on the surface of hepatocyte-like differentiated HepaRG cells.

Inhibition of Binding (IOB) by Anti-E1E2/D32.10 mAb

Preincubation of ^{125}I-purified HCVsp-Lat TP for 1 hr at 37°C with D32.10 (purified IgG1) at increasing concentrations (cf. Table I) prior to cell-binding assays performed at room temperature showed that D32.10 inhibited specifically HCVsp-Lat TP binding to Huh-7 cells and HepaRG cells at the proliferating or differentiated stages from 0.2 to 2 μg/ml in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). The inhibitory antibody concentration reducing the binding by 50% or $IC_{50} = 0.5$ μg/ml for proliferating Huh-7 and HepaRG cells and around 1–2 μg/ml for differentiated HepaRG cells (Fig. 3A). However, it was noted that non-specific inhibitory effect of an irrelevant mouse IgG1 was not observed with the differentiated HepaRG cells (not shown), whereas a similar non-specific inhibitory potency of 10% up to 2 μg/ml, of 25% at 10 μg/ml, and 40% at 100 μg/ml was determined with both Huh-7 and proliferating HepaRG cells (Table I, Fig. 3B). This suggests a very specific efficient IOB activity exerted by the anti-E1E2/D32.10 mAb (low $IC_{50} \leq 1–2$ μg/ml) on the HCVsp–hepatocyte interactions through HA-binding sites.

As positive control, the IOB activity of the mouse mAb AP33, which recognizes a linear epitope in the E2 glycoprotein (E2:412–423) and is known to neutralize potently retroviral pseudoparticles (HCVpp) as well as the cell culture infectious HCV clone JFH-1 (HCVcc) [Tarr et al., 2006], was examined. When used at increasing concentrations (cf. Table I), AP33 inhibited only HCVsp-Lat TP binding to proliferating HepaRG cells in a concentration-dependent manner from 20 to 100 μg/ml showing an IC_{50} around 50 μg/ml, and exerted an inhibitory effect of ≤30% at lower concentrations (≤10 μg/ml) unlike the mAb D32.10 (Fig. 3C). As shown in Figure 3B, irrelevant mouse IgG1 (MOPC-21) at concentrations ≥10 μg/ml inhibited the HCVsp binding from 25% up to 40% in a non-specific manner. Therefore, the IOB activity of AP33 appears much less efficient (100-fold higher IC_{50}) and significant (non-specific inhibition ≥40%) at such high concentrations (≥10 μg/ml) in contrast to that of D32.10 for inhibiting the interactions between HCVsp and highly differentiated HepaRG cells.

When ^{125}I-HCVsp-Lat E1E2-positive fractions (EPF) from sucrose gradient were used selectively in HepaRG cell-binding assays, the saturation plateau of specific binding was reached from 0.5 μg of protein/ml (Fig. 4A, panel a). Transformation of the data into Scatchard plot (Fig. 4A, panel b) showed that only a one-site binding was identified with a very HA low $K_d = 0.07$ μg/ml. From three independent experiments the average K_d was 0.05 ± 0.02 μg/ml. Since the K_d is lower, the affinity of E1E2-positive HCVsp for hepatocyte-like HepaRG cells is higher than that of the total HCVsp population. This

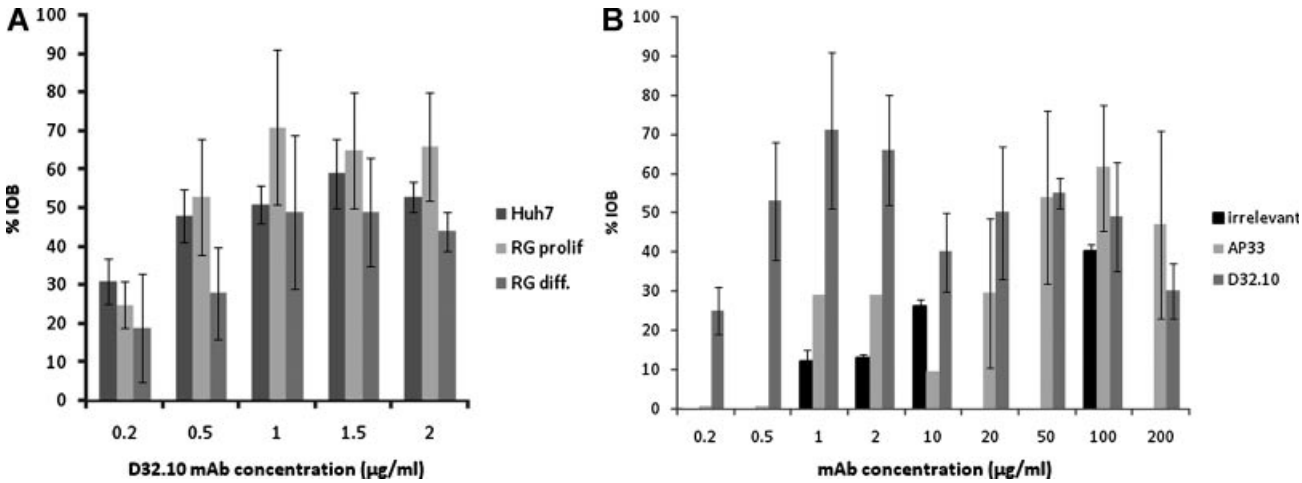


Fig. 3. **A**: Inhibition of the binding of HCVsp-Lat TP to Huh-7 and HepaRG cells by E1E2-specific D32.10 mAb. ^{125}I-HCVsp-Lat TP was preincubated with increasing concentrations of D32.10 (0.2–2 μg/ml, cf. Table I) for 1 hr at 37°C. The HCVsp-D32.10 immune complexes were then incubated for 2 hr at room temperature with Huh-7 or HepaRG cells at proliferating (RG prolif.) or differentiated (RG diff.) stages. **B**: Inhibition of the binding of HCVsp-Lat TP to proliferating HepaRG cells by an irrelevant mouse IgG1 (MOPC-21) and by the AP33 mAb in comparison with the mAb D32.10. Preincubation of HCVsp-Lat TP was performed with 1, 2, 10, or 100 μg/ml of the irrelevant mAb (Table I) as non-specific control. Preincubation of HCVsp-Lat TP was performed with 0.2–200 μg/ml of AP33 mAb or D32.10 mAb (cf. Table I). The results represented correspond to mean values ± standard deviation (SD) of 10 independent experiments for MOPC-21 (irrelevant) and D32.10 (**panels A**,**B**), and of 2 independent experiments for AP33 (cf. Table I).

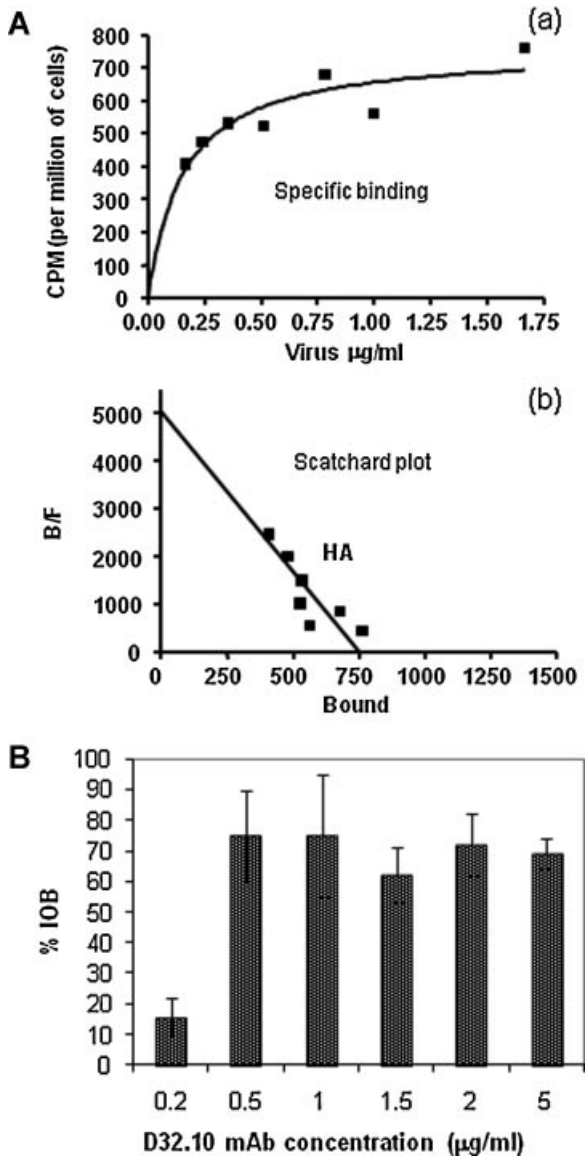


Fig. 4. **A**: Properties of the binding of ^{125}I-E1E2-enveloped HCVsp-Lat (EPF) to HepaRG cells at proliferating stage. **Panel a**: Concentration-dependent saturable specific binding. **Panel b**: Scatchard plot. The results are representative of three independent experiments. **B**: Inhibition of the binding of HCVsp-Lat EPF to proliferating HepaRG cells by E1E2-specific D32.10 mAb. HCVsp-Lat EPF was preincubated with increasing concentrations of D32.10 (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, or 5 µg/ml). The results are expressed in % of IOB and represent the mean values ± SD of three independent experiments. Non-specific inhibition was <10% by using the MOPC-21 irrelevant mAb under these experimental conditions.

suggests that the enveloped HCVsp are involved selectively in HA interactions. Under these conditions, maximal IOB by D32.10 (60–100%) was obtained for concentrations between 0.5 and 5 µg/ml and the IC_{50} was lower than 0.5 µg/ml (Fig. 4B). Non-specific IOB was not observed with an irrelevant antibody used at concentrations ≤5 µg/ml (results not shown). This supports that the E1E2 discontinuous conformational epitope targeted by D32.10 and expressed on the surface of enveloped HCVsp exhibits particular HA for their corresponding HepaRG cell receptor(s).

Finally, to support these results the *cav*RNA approach [Germi et al., 2002] was performed and validated with an HCV1b-positive serum sample and Huh-7 cells. The incubation of the virus with increasing concentrations of D32.10 before the binding assay resulted in a strong significant inhibitory effect at 0.2 and 2 µg/ml concentrations (60–70%, Fig. 5). An irrelevant mAb used at same concentrations exerted an inhibitory effect <10%, whereas a high non-specific inhibition (≥45%) was observed at 20 or 100 µg/ml (Fig. 5). Thus, it was demonstrated that the mAb D32.10 inhibits specifically and efficiently the adsorption of serum HCV of genotype 1b to Huh-7 cells with an optimal concentration of 2 µg/ml (Fig. 5B). The IOB activity of D32.10 thus appears to be independent of the genotype as well as of the experimental approach.

DISCUSSION

This study was undertaken to determine the IOB ability of the unique D32.10 mAb [Petit et al., 2003]. Indeed, D32.10 recognizes a highly conserved conformational epitope encompassing one region in the E1 glycoprotein and two regions in the E2 glycoprotein, which are exposed on the surface of enveloped HCVsp [Petit et al., 2005] and may be involved in HCV–cell interactions through GAG- and CD81-binding sites [Yagnik et al., 2000; Olenina et al., 2005; Rothwangl et al., 2008]. In this study, an in vitro direct cell-binding assay [Godard et al., 1992] was first adapted to particulate ligand such as HCV particles for examining the saturation radioligand binding data by nonlinear regression in order to determine the receptor number and affinity. This approach allowed the measurement of specific radiolabeled-HCVsp binding at equilibrium at various concentrations of the radioligand and the estimation of non-specific binding of this radioligand as that obtained in the presence of a large excess of

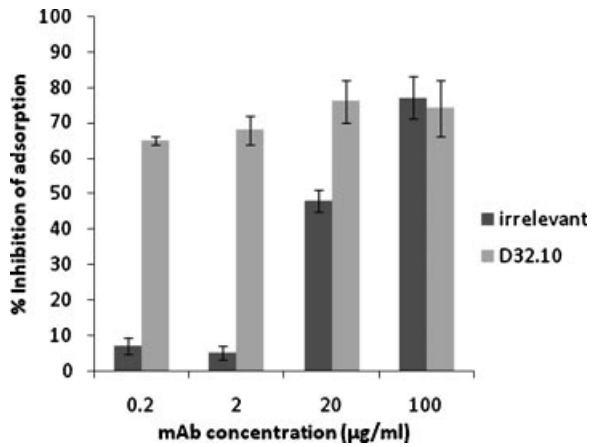


Fig. 5. Inhibition of the adsorption of HCV1b to Huh-7 cells by E1E2-specific D32.10 mAb in *cav*RNA approach. Plasma was incubated with the irrelevant RCA 1G6 IgG1 or the D32.10 mAb (0.2, 2, 20, and 100 µg/ml) before the binding assays. The results are expressed in percentage of inhibition of the adsorption corresponding to HCV RNA copies determined by real-time RT-PCR for each concentration. The mean values and the SD represent four independent assays.

unlabeled ligand. Therefore, it was not necessary to include a negative control in these experiments. To transform HCVsp–cell binding data into a linear form, the most popular Scatchard method was applied to estimate the B_{max} and K_d from Scatchard plots. Evidence was provided by these studies for a two-site interaction between HCVsp and proliferating Huh-7 or HepaRG cells. One interaction of HA with a K_d of 0.1–0.5 μg/ml, and one interaction of lower affinity (LA) with a K_d of 5–10 μg/ml. The HA interaction was difficult to identify with the Huh-7 cells which seemed to expose preferentially LA-binding sites. In contrast, only HA interactions were identified clearly between HCVsp and the differentiated HepaRG cells, suggesting that these interactions could be more specific for polarized hepatocytes [Parent et al., 2004]. Both types of interactions could be identified easily with the proliferating HepaRG cells.

Moreover, when E1E2/D32.10-positive enveloped HCVsp were used selectively for binding studies, only HA interactions with a very low K_d (<0.1 μg/ml) were observed with the proliferating HepaRG cells. The findings of the present study suggest that specific HA interactions (low K_d) involve preferentially the conformational E1E2 epitope targeted by D32.10 on the surface of HCVsp and binding sites (receptors) mainly expressed on highly differentiated HepaRG liver cells. Supporting this view, the anti-E1E2/D32.10 mAb was shown to inhibit specifically and strongly the binding between HCVsp and Huh-7 or HepaRG cells with an $IC_{50} = 0.5$ μg/ml, but appeared still more efficient when E1E2-positive enveloped HCVsp were used exhibiting an IC_{50} <0.5 μg/ml. When an irrelevant mAb was used, no or low inhibitory effect (10–15%) was observed for concentrations <10 μg/ml whereas an inhibitory effect of 25–40% could be observed for concentrations >10 μg/ml. This supports a highly specific effect of the mAb D32.10 to inhibit HCVsp–cell interactions. If the mAb AP33, which is well known to be capable of neutralization of E1E2-mediated entry and HCV infectivity in HCVpp and HCVcc systems [Tarr et al., 2006], was used in a same approach, a dose-dependent inhibitory effect was observed only when relatively high concentrations (>10 μg/ml) were used. The mAb AP33 exerted a maximal inhibition of around 65% at a concentration of 100 μg/ml, corresponding to an $IC_{50} = 50$ μg/ml in our system. This finding is in accordance with the results obtained previously with the HCVcc system, since HCVcc infectivity was reduced by 80% when AP33 was added to the JFH-1 virus inoculum at a concentration of 50 μg/ml. Similar inhibitory effect was also observed by using the mAb D32.10 at such high concentrations (20–200 μg/ml). In contrast, very low inhibitory effect (<30%) was observed with the mAb AP33 at low concentrations. This should be noted that only the effects at concentrations below 2 μg/ml seem to be highly specific to inhibit efficiently HCVsp–cell interactions.

In conclusion, the mAb D32.10 through its unique discontinuous epitope formed by three highly conserved regions in the E1 and E2 glycoproteins and expressed on the surface of in vivo produced HCV particles, named HCVsp, exhibits a particular efficiency for inhibiting the HA interactions between HCVsp (genotype 3 or 1b) and Huh-7 or highly differentiated hepatocyte-like HepaRG cells. This strongly suggests a potential neutralizing activity of the mAb D32.10 in vitro on HCVcc and/or HCVsp infectivity (now in progress) and in vivo in patients infected with HCV as well as in a human liver-chimeric mouse model as shown recently with AR3 human mAbs [Law et al., 2008]. Thus, the mAb D32.10 may be an useful tool in preventing HCV infection, especially after exposure to HCV-positive blood and recurrence of HCV after liver transplantation in patients with cirrhosis, and for developing a vaccine candidate based on the HCV E1E2/D32.10 epitope.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Raphaële Germi (FRE 2854 CNRS/Université Joseph Fourier, La Tronche-Grenoble, France) for transferring the *cav*RNA approach, Jean-Pierre Zarski (Unité d'Hepato-Gastroenterologie, Hôpital Général de Grenoble, France) and Fabien Zoulim (Service d'Hépatologie et de Gastro-Entérologie, Hôtel Dieu, Hospices Civils de Lyon, France) for providing HCV1b-positive serum and plasmaphereses from patient Lat, Arvin H. Patel (MRC Virology Unit, Institute of Virology, University of Glasgow, Glasgow, UK) for the AP33 mAb.

REFERENCES

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. J Exp Med 197:633–642.

Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. J Biol Chem 278: 41624–41630.

Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. J Virol 72:3827–3836.

Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Zhu Q, Pizza M, Crotta S. 2008. CD81 is a central regulator of cellular events required for HCV infection of human hepatocytes. J Virol 82:8316–8329.

Chisari FV. 2005. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. Nature 436:930–942.

Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. Cell Microbiol 10:821–827.

Feld JJ, Hoofnagle JH. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. Nature 436:967–972.

Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. Proc Natl Acad Sci USA 102:2986–2991.

Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RWH, Zarski JP, Drouet E. 2002. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. J Med Virol 68:206–215.

Godard A, Heymann D, Raher S, Anegon I, Peyrat MA, Le Mauff B, Mouray E, Gregoire M, Virdee K, Soulillou JP, Moreau F, Jacques Y. 1992. High and low affinity receptors for human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor on human cells. J Biol Chem 267:3214–3222.

Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate

pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. Proc Natl Acad Sci USA 100:7271–7276.

Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR. 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. Nat Med 14:25–27.

Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science 309:623–626.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Maire M, Parent R, Morand AL, Alotte C, Trépo C, Durantel D, Petit MA. 2008. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun 368:556–562.

Meunier JC, Russell RS, Goossens V, Priem S, Walter H, Depla E, Union A, Faulk KN, Bukh J, Emerson SU, Purcell RH. 2008. Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the E1 glycoprotein of hepatitis C virus. J Virol 82:966–973.

Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascussi JM, Sureau C, Fabre JM, Sacunha A, Larrey D, Dubuisson J, Coste J, McKeating JA, Maurel P, Fournier-Wirth C. 2008. Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. J Virol 82:569–574.

Olenina LV, Kuzmina TI, Sobolev BN, Kuraeva TE, Kolesanova EF, Archakov AI. 2005. Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. J Viral Hepat 12:584–593.

Parent R, Marion MJ, Furio L, Trépo C, Petit MA. 2004. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. Gastroenterology 126:1147–1156.

Petit MA, Jolivet-Reynaud C, Peronnet E, Michal Y, Trépo C. 2003. Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. J Biol Chem 278:44385–44392.

Petit MA, Lièvre M, Peyrol S, De Sequeira S, Berthillon P, Ruigrok RWH, Trépo C. 2005. Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. Virology 336:144–153.

Rothwangl KB, Manicassamy B, Uprichard SL, Rong L. 2008. Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: Putative CD81 binding region I is not involved in CD81 binding. Virol J 5:46–58.

Tarr AW, Owsianka AM, Timms JM, McClure CP, Brown RJP, Hickling TP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Patel AH, Ball JK. 2006. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. Hepatology 43:592–601.

Tejedor F, Ballesta JP. 1982. Iodination of biological samples without loss of functional activity. Anal Biochem 127:143–149.

Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, Patel A, Kohn LD, Liang TJ. 2002. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: A model system for studying viral binding and entry. J Virol 76:9335–9344.

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Myamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat Med 11:791–796.

Wellnitz S, Klumpp B, Bart H, Ito S, Depla E, Dubuisson J, Blum HE, Baumert TF. 2002. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. J Virol 76:1181–1193.

Yagnik AT, Lahm A, Meola A, Roccasecca RM, Ercole BB, Nicosia A, Tramontano A. 2000. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. Proteins 40:355–366.

Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 102:9294–9299.

V. RESULTATS – 1IERE PARTIE

Inhibition of the Binding of HCV Serum Particles to Human Hepatocytes by E1E2-Specific D32.10 Monoclonal Antibody

Ndiémé Ndongo, Yassine Rechoum, Sylvie De Sequeira, Fabien Zoulim, Christian Trépo, Emmanuel Drouet, and Marie-Anne Petit (173)

VI. DISCUSSION – 1IERE PARTIE

Cette première série de résultats représente une première série d'expériences réalisées lors de mon stage de master M2R et terminées dans les premiers mois de la thèse. Tout en caractérisant l'anticorps monoclonal D32.10 (*cf.* § II.b.ii ci-dessus) et ses fonctions de neutralisation vis-à-vis de la fixation du virus sur des modèles cellulaires différents, nous avons optimisé la technique de mesure de l'ARN VHC résiduel à la surface des cellules testées. La grande originalité de cet anticorps réside dans le fait qu'il a été produit par immunisation de souris par des particules VHC concentrées après une série de centrifugations et obtenues à partir d'une plasmaphérèse réalisée chez un patient chroniquement infecté par le VHC(génotype 1b). L'anticorps D32.10 reconnaît spécifiquement des épitopes situés au niveau des glycoprotéines E1 et E2 de l'enveloppe des particules de VHC sériques des génotypes 1a et 1b. Il s'agit d'un épitope conformationnel reconnu par l'anticorps D32.10 et caractérisé par la technique du Phage Display ; il présente une homologie de séquences avec une région de E1 (^{297}RHWTTQGCNC^{306}) et deux régions de E2 (^{613}YRLWHYPCT^{621} et ^{480}PDQRPYCWHYPPKPC^{494}) (*cf.* Figure 21 et Figure 22) (21, 162). Par d'autres travaux, il a été démontré que ces régions étaient très conservées et impliquées dans les processus de fixation du VHC sur les cellules (172, 201, 202). Dans le cadre de cette étude, initiée pendant mon stage de Master 2R de Biotechnologie (UJF Grenoble1), nous avons étudié l'effet de cet anticorps sur l'entrée du VHC sérique dans les cellules Huh7.

Notre travail a consisté à mettre au point la méthode de quantification du virus associé aux cellules (« cell associated virus RNA » ou « cavRNA ») après infection par du sérum, contenant une charge virale connue de VHC de génotypes 1b et 3a, préalablement incubé avec l'anticorps. Ainsi, nous avons pu tester d'une part ces deux génotypes du VHC, et deux anticorps différents les IgG D32.10 et D4.12.9 (ce dernier reconnaît un autre épitope discontinu localisé sur les protéines E1 et E2 ; il a également été produit après immunisation de souris par des particules virales natives) sur les cellules Huh7 (cellules d'hépatome humain) et Vero (cellules du rein du singe vert d'Afrique). Nous avons démontré au cours de ce travail que l'anticorps D32.10 inhibait la fixation du VHC sur les cellules Vero et les cellules Huh7 de 21,26% et 42,60% respectivement (*cf.* Figure 35A, Figure 35B).

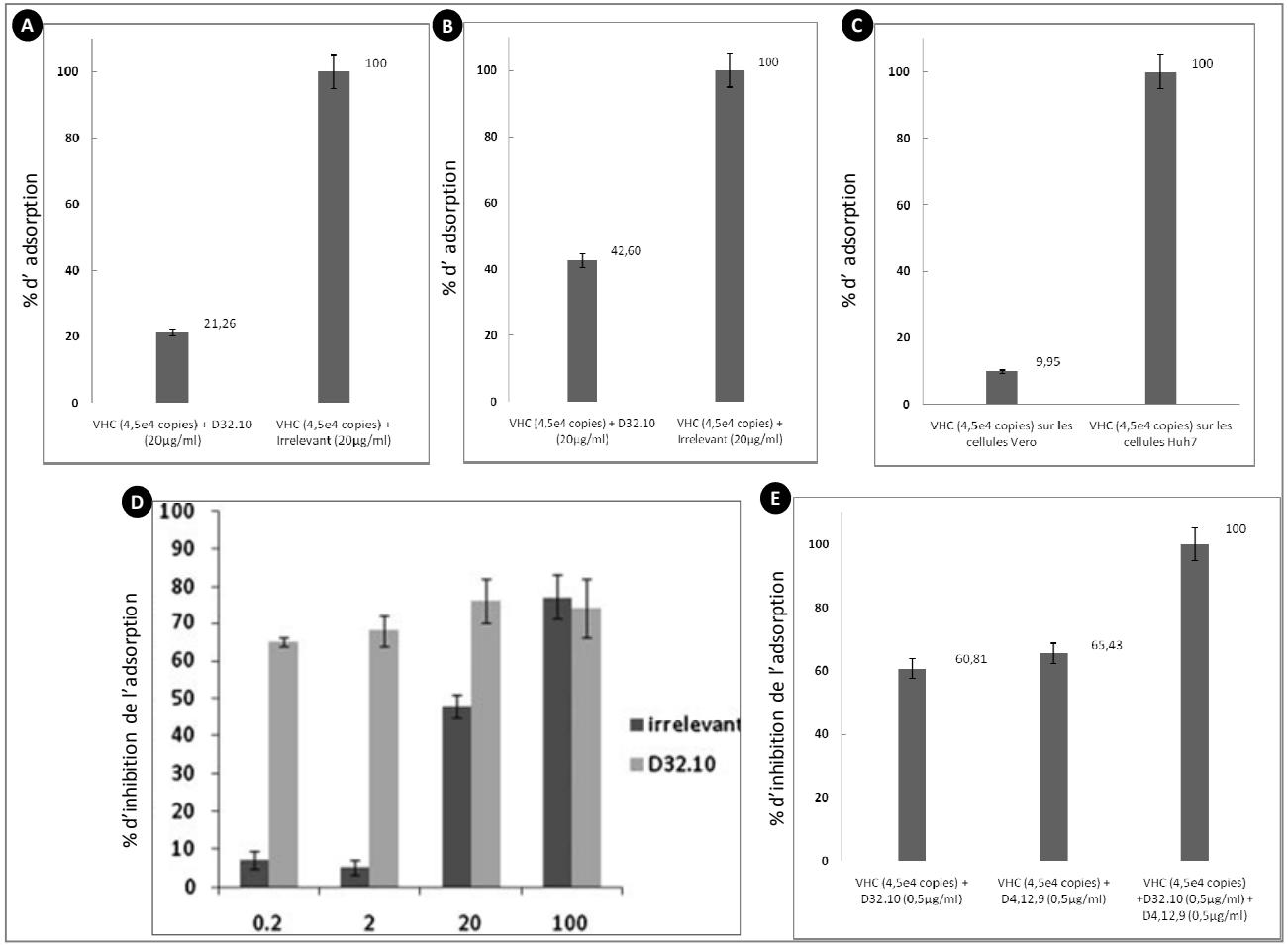


Figure 35 : Etude de l'effet inhibiteur des anticorps D32.10 et D4.12.9 sur l'adsorption du VHC sur les cellules Huh7 et les cellules Vero. (A) Effet du Mab D32.10 sur l'adsorption du VHC (génotype 1b). Quantification du *cavRNA* sur cellules Huh7. Comparaison de la quantité de *cavRNA* en présence du mAbD32.10 à la quantité de *cavRNA* en présence du mAb « irrelevant ». Les histogrammes expriment le rapport des deux quantités (en pourcentage). **(B)** Effet de l'anticorps D32.10 sur l'adsorption du VHC (génotype 1b). Quantification du *cavRNA* sur cellules Huh7. Comparaison de la quantité de *cavRNA* en présence de l'anticorps D32.10 à la quantité de *cavRNA* en présence de l'anticorps « irrelevant ». Les histogrammes expriment le rapport des deux quantités (en pourcentage). **(C)** Adsorption relative du HCV sur les cellules Huh7 *versus* cellules Vero. **(D)** Effet de l'anticorps D32.10 sur l'adsorption du VHC 1b sur les cellules Huh7. Des concentrations d'anticorps allant de 0,2µg/ml à 100µg/ml ont été testées. L'anticorps RCA 1G6 IgG1 a servi de témoin négatif « irrelevant ». **(E)** Effet synergique du « Mix »D32.10 + D4.12.9 (% d'inhibition de l'adsorption virale) *versus* anticorps seuls. Comparaison de la quantité de *cavRNA* en présence des anticorps spécifiques seuls à la quantité de *cavRNA* en présence du « mix » des deux mAb.

Toutefois, les cellules Huh7 montraient une meilleure capacité à fixer le VHC que les cellules Vero (10 fois plus) (*cf.* Figure 35C). Ceci n'est pas étrange si on considère que le VHC est un virus qui infecte préférentiellement les cellules hépatiques.

Les études approfondies sur l'anticorps D32.10 issues du présent travail ont montré un effet dose-dépendant de l'anticorps sur l'adsorption du virus. Par rapport à un anticorps « irrelevant », entre 20 et 0,2µg/ml notre anticorps a un effet inhibiteur proportionnel à sa concentration. Au dessus de 20µg l'effet est non spécifique, en effet nous avons noté des taux d'inhibition comparables voire plus faibles que l'anticorps « irrelevant ». En dessous de 0,2µg/ml, l'anticorps semble perdre de son efficacité. Ceci montre qu'il existe une concentration d'anticorps optimale d'inhibition de l'adsorption pour la quantité d'inoculum introduite (puisque l'inhibition croît puis décroît). Au-delà d'une certaine concentration d'anticorps, l'inhibition perd sa spécificité. En revanche, au-dessous, elle garde son caractère spécifique mais devient proportionnelle à la quantité d'anticorps (*cf.* Figure 35D).

Par ailleurs, par en combinant ces deux anticorps, D32.10 et D4.12.9, simultanément dans les tests d'inhibition, nous avons constaté un gain d'inhibition d'adsorption par rapport à l'utilisation de ces deux anticorps testés séparément. Cet effet synergique d'inhibition de l'adsorption du virus pourrait être lié au fait qu'en se fixant sur leurs épitopes respectifs, les deux anticorps réduisent la probabilité pour que le virus soit reconnu à la surface des cellules, sans doute par compétition et/ou par encombrement stérique (*cf.* Figure 35E).

Ce travail, qui vient d'être publié, apporte certains éléments nouveaux dans l'identification d'épitopes neutralisants au niveau de l'enveloppe du VHC : (i) la technique de mesure de l'ARN résiduel (cavRNA) que nous avons mise au point est une technique originale qui a été reprise par d'autres équipes par la suite (ii) L'identification d'épitopes neutralisants et conservés chez différents génotypes de VHC est un des objectifs majeurs en termes de prophylaxie anti-VHC (203). Une des suites de ce travail serait de chimériser ou d'humaniser cet anticorps à des fins médicales (traitement des rechutes – réinfections VHC - après greffe de foie).

Résultats et discussion – 2ième partie

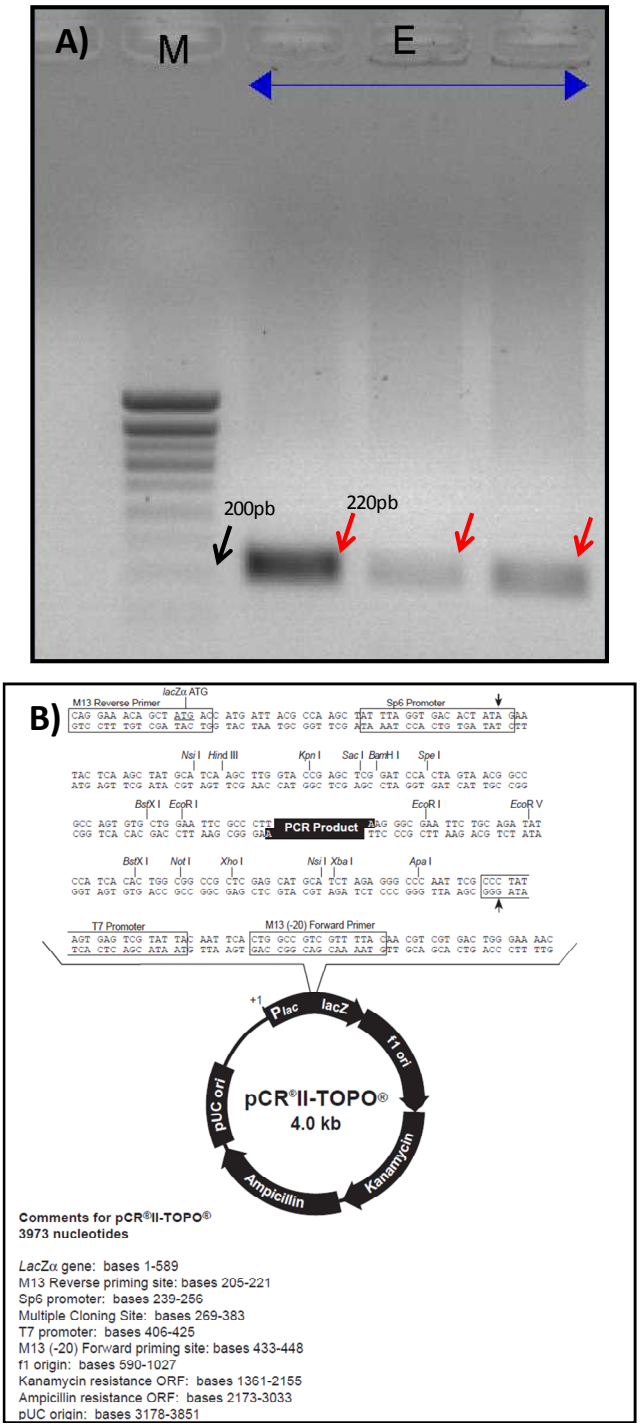


Figure 36 : Préparation du transcrit. A) Electrophorèse en gel agarose 2%, montrant la séquence obtenue après amplification par les amorces 1TS/2CH (220pb). B) Carte du plasmide pCR®II-TOPO avec ses principales caractéristiques (position et types des sites de coupure par les enzymes de restriction, types et positions des gènes de sélection et de résistances, position de l'origine de réplication). M : marqueur de poids moléculaire, E : échantillon.

VII. RESULTATS – 2IEME PARTIE

a. Mise au point de la méthode de détection

i. Construction et production du transcrit

Après amplification et contrôle de la qualité sur gel d'agarose (*cf.* Figure 36), la séquence cible (53 – 272ntd) a été purifiée directement à partir du produit de PCR, puis clonée (*cf.* Figure 37) dans le vecteur pCR®II-TOPO (*cf.* Figure 38). Sur les vingt-neuf clones positifs, cinq clones ont été sélectionnés (#1, #2, #8 #30 et #33) et une PCR dissymétrique a été réalisée pour déterminer l'orientation de l'insert (*cf.* Figure 39). L'orientation de l'insert peut être déduite suivant le résultat obtenu sur gel et en s'appuyant sur le Tableau 23. Ainsi, pour les clones #1 et #30, le brin positif de l'insert était en aval du promoteur (les 2 PCR(c) étaient négatives). Ces clones ont donc été transcrits par le promoteur SP6. A l'inverse, les clones #2 et #8 avaient intégré l'insert dans le sens inverse (le brin négatif de l'insert était en aval du promoteur (les 2 PCR(c) étaient positives)) ; ils ont donc été transcrits par le promoteur T7. Le clone #33 a été éliminé car le produit de la PCR(e) donnait deux bandes au lieu d'une seule en électrophorèse sur gel d'agarose.

Nous avons choisi le clone #1 pour la suite de la transcription, il a été mis en culture pour une maxiprep. Après purification, la concentration du plasmide obtenu était d'environ 1µg/µl (mesure effectuées par DO_{260}) .

ii. Linéarisation des plasmides de la maxiprep

La linéarisation du plasmide a été effectuée à l'aide de l'enzyme de restriction *Pst*I qui coupe immédiatement après l'insert et ne reconnait aucun site de coupure au sein de ce dernier (*cf.* Figure 38). Après linéarisation du plasmide, l'insert a été transcrit à l'aide du promoteur SP6 pour obtenir de l'ARN à la concentration de 0,54µg/µl (déterminée par mesure de la DO_{260}).

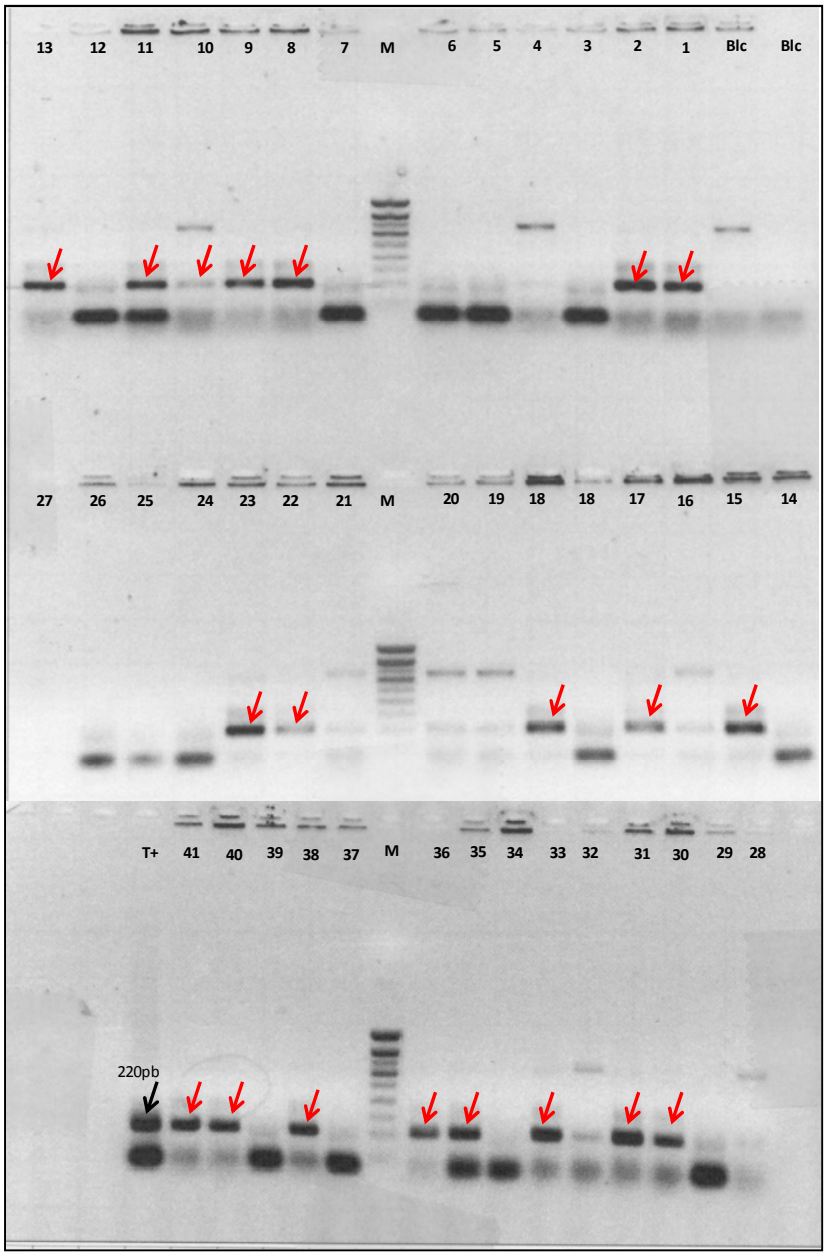


Figure 37 : Screening sur colonies. Electrophorèse en Gel d'agarose permettant d'identifier clones ayant intégré l'insert. Les clones sont numérotés de #1 à #41. Le rendement de clonage est de 70% (29 clones positifs (désignés par une flèche rouge) sur 41 clones au total).

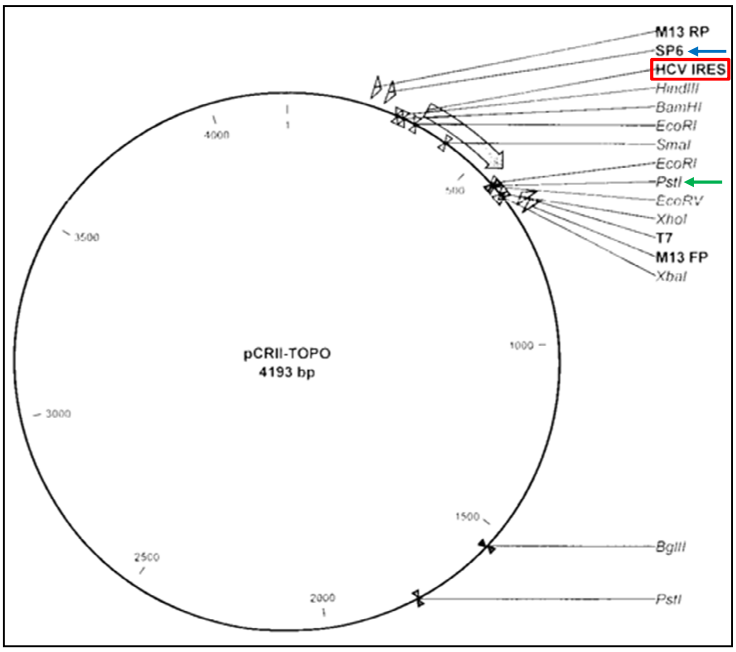


Figure 38 : Carte du vecteur pCRII©-TOPO contenant la séquence de l'IRES du VHC. L'insert est représenté par une flèche vide, la flèche bleue désigne le promoteur SP6 qui a permis de produire l'insert, la flèche verte désigne l'enzyme de restriction *Pst*I qui coupe immédiatement après l'insert.

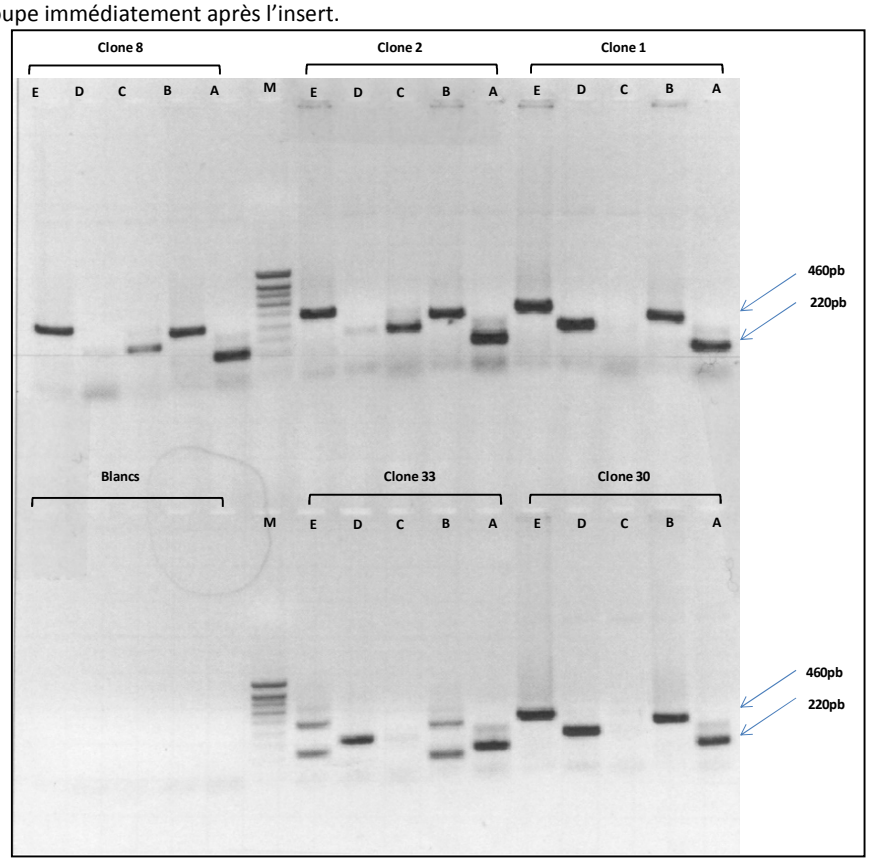


Figure 39 : Détermination de l'orientation de l'insert. Electrophorèse en gel d'agarose des clones et screening sur miniprep par PCR dissymétrique. Les clones #1, #2, #8, #30 et # 33 ont été choisis à partir de l'expérience de clonage précédente ; une PCR dissymétrique a été réalisées afin de voir le sens d'insertion dans le plasmide. Cinq PCR ont été réalisées pour chaque clone, c'est la combinaison des amorces utilisées qui détermine le sens d'insertion. *cf.* **Tableau 23** pour l'interprétation des résultats de la PCR dissymétrique) : A : amorces sens/anti-sens, B : SP6/T7, C : amorce sens/T7, amorce anti-sens/T7 et E : M13FR/M13RP. Les inserts des clones 1 et 30 sont positifs, les inserts des clones 2 et 8 sont négatifs, le clone 33 n'a pas été sélectionné car la PCR(E) présente deux bandes.

Tableau 23 : Interprétation des résultats de la PCR dissymétrique et déduction de l'orientation de l'insert

Résultats de PCR		ADN correspondant dans le sens…	Transcription par T7		Transcription par SP6	
T7 / oligo +	T7 / oligo -		ARN transcrit dans le sens…	Convenable pour virus à ARN de polarité	ARN transcrit dans le sens…	Convenable pour virus à ARN de polarité
Négatif	Bande de taille attendue	Positif	Négatif	Négative	Positif	Positive
Bande de taille attendue	Négatif	Négatif	Positif	Positive	Négatif	Négative

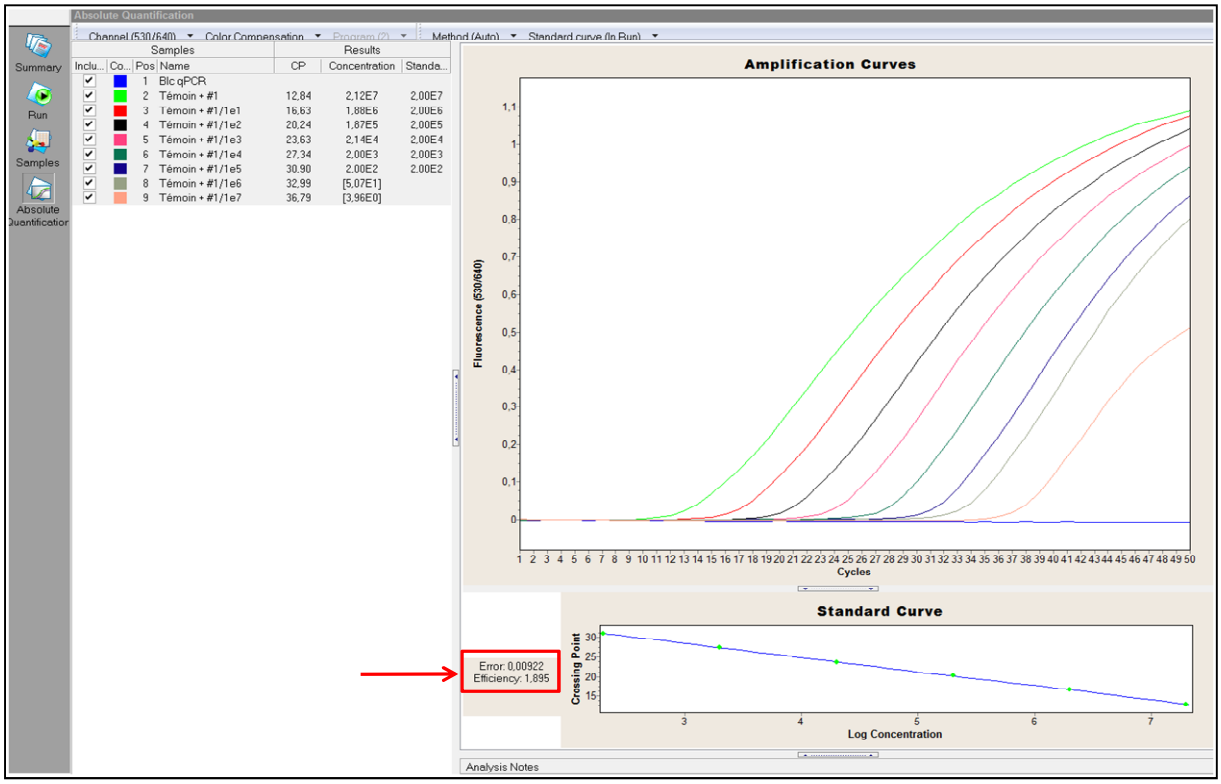


Figure 40 : Test de l'efficacité de la qPCR. En l'absence d'extrait de moustique, l'amplification d'un témoin positif (plasmide contenant la séquence cible) est d'une bonne efficacité (voir cadran rouge Efficacité = 1,895. pour un rendement théorique de 100% l'efficacité = 2)

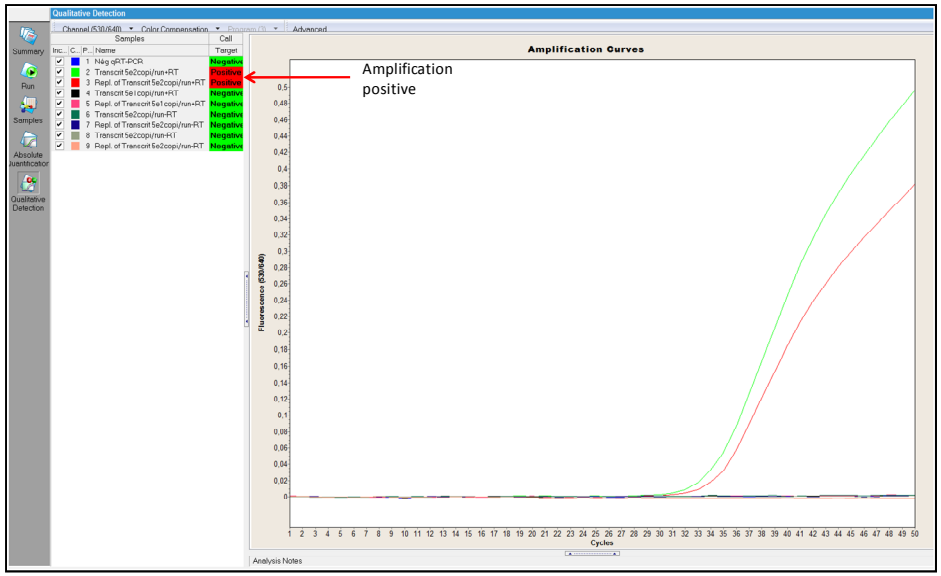


Figure 41 : Vérification de la qualité du transcrit. Une amplification a été réalisée avec ou sans enzyme de rétro-transcription (+RT/-RT). Si l'ADN ayant servi de matrice pour la rétro-transcription était présent, il aurait été amplifié en présence et en absence de RT. En revanche le transcrit n'aurait pu être amplifié qu'après une rétro-transcription. Le transcrit a été amplifié en présence de RT (réalisé en double dans les capillaires #2 et #3) mais pas en son absence (réalisé en double dans les capillaires #6 et#7) ceci montre que le transcrit ne contenait pas de résidus d'ADN matriciel. Le transcrit dilué à 30 copies/run n'a pas été détecté, ceci serait dû à une RT non suffisante.

Plasmide	Transcrit	Sérum	Transcrit + extrait de moustique non infecté
20 copies/µl	60 copies/run	320 copies/run	700 copies/run

Tableau 24 : Seuil de détection de la région 5'NTR du VHC par prise d'essai de 4µl et test de présence d'inhibiteurs

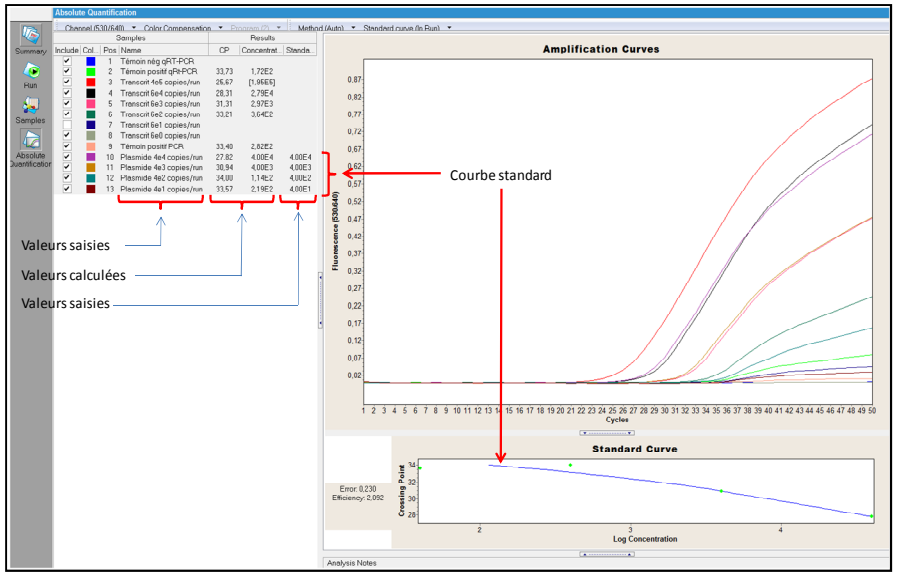


Figure 42: Test de l'efficacité de transcription. La courbe étalon a été réalisée à partir d'une série de dilutions du plasmide, la concentration de la solution-mère étant déterminée au départ par la mesure de la densité optique (DO). Le logiciel calcule pour chaque échantillon positif, le « crossing point » (Cp) correspondant au nombre de cycle à partir duquel cet échantillon est détecté. Chaque point de la gamme étalon se verra alors attribué un Cp (déterminé par l'amplification) et une concentration (déterminée par la DO). Le logiciel effectue ensuite une extrapolation à partir de ces données pour attribuer pour les Cp des échantillons inconnus, une concentration correspondant à son Cp. L'efficacité de la transcription est déterminée en réalisant une série de dilutions du transcrit dont la concentration de la solution-mère a été déterminée par la mesure de la DO. En comparant les concentrations mesurées par DO et celles qui sont déterminées après amplification, on estime l'efficacité de la rétro-transcription. Ex. la concentration saisie et mesurée par DO pour le transcrit du capillaire #4 est de 6e4 copies/run, alors que la concentration déduite par le logiciel est de 2,8e4, cette sous-estimation traduit la perte qui a eu lieu lors de la transcription, ici, elle est de 2,14 fois (6e4/2,8e4 = 2,14).

$$\text{Concentration moléculaire (en copies / µL)} = 6{,}02 \times 10^{17} \times \frac{concentration\ massique\ (\mu g/\mu l)}{nombres\ de\ bases\ de\ l'ARN\ \times 330}$$

Concentration massique = 0,54µg/µl

Nombre de bases de l'ARN = 407 ntd (séquence d'intérêt = 220 ntd, amont de la séquence d'intérêt = 81 ntd, aval de la séquence d'intérêt = 90ntd).

Concentration moléculaire = 2,42 x 10^{12} copies/µl.

Nous avons ensuite ajusté la concentration de l'insert à 10^{11} copies/µl.

iii. Digestion de l'ADN matriciel par la Turbo DNase

Afin de pouvoir quantifier la charge virale VHC de façon fiable, il a fallu digérer complètement l'ADN qui a servi de matrice pour la transcription. Trois digestions à la Turbo DNase ont été nécessaires pour atteindre cet objectif. L'absence totale d'ADN contaminant a ensuite été constatée en réalisant une qRT-PCR avec/sans ajout de transcriptase inverse (*cf.* Figure 41). Cette expérience a montré que l'amplification ne peut avoir lieu qu'avec les « mix » contenant la transcriptase inverse, ceci signifie que l'ADN est complètement absent, car s'il était présent l'absence de la transcriptase inverse ne l'aurait pas affecté.

iv. Détermination de la limite de sensibilité de la détection

La limite de détection du LightCycler 2.0 (Roche) d'une même séquence est différente selon qu'elle se trouve sous sa forme ADN ou ARN, pure ou en présence d'autres éléments. Ainsi, il a fallu déterminer la limite de sensibilité pour les différentes matrices utilisées (transcrit, plasmide, sérum, +/- extraits de moustique). Il s'est avéré que l'on pouvait détecter la séquence d'intérêt (i) dans le plasmide à partir de 20 copies / run (run = prise d'essai, 2-4µl), dans le transcrit à partir de 60 copies / run, (ii) dans le sérum à partir de 320 copies / µl et (iii) dans un extrait de moustique à partir de 700 copies / run (cf. Figure 42 et Tableau 24).

Tableau 25 : Détermination du seuil de détection en fonction du ratio de concentration ([Extrait]/[ARN]).

	Nombre de copies par prise d'essai (4µl)						
Concentration de l'extrait	25	50	100	150	200	250	500
	1	1	1	1	1	1	1
	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
	1/20	1/20	1/20	1/20	1/20	1/20	1/20
	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50
	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200

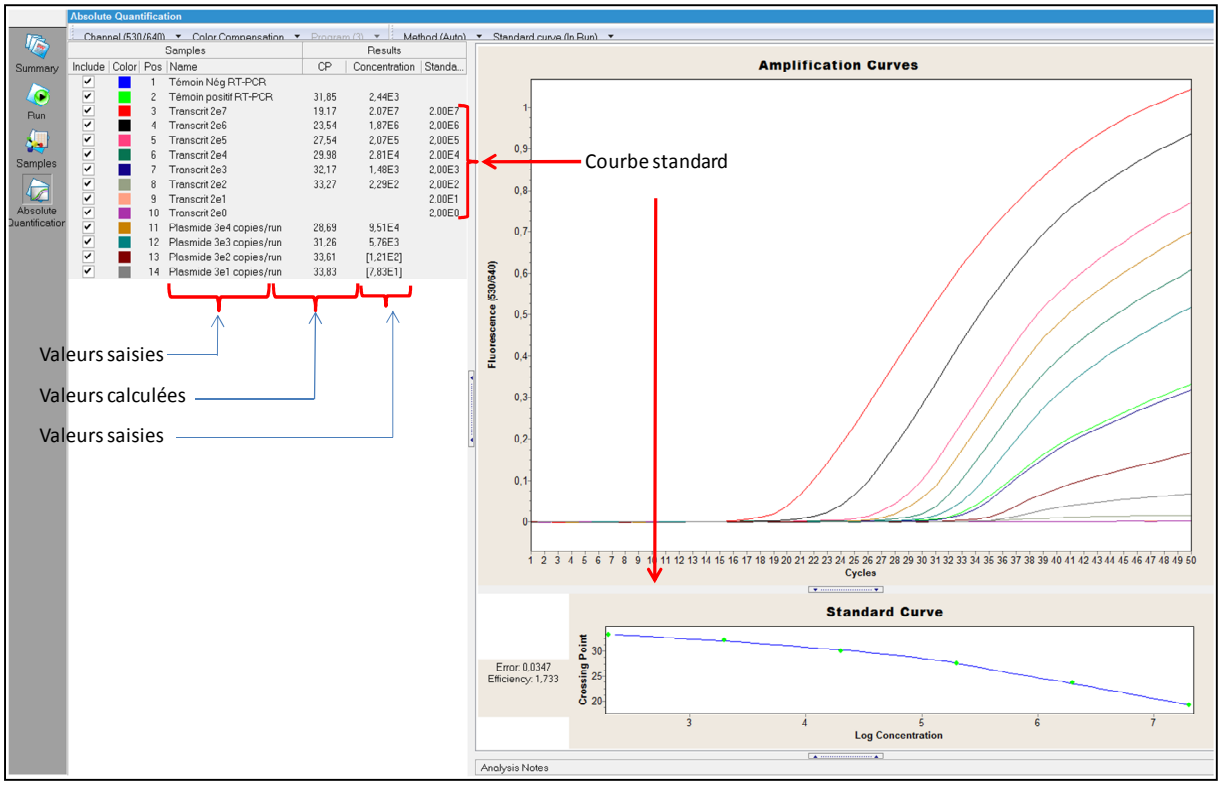


Figure 43: Efficacité de la transcription. La courbe étalon est réalisée à partir d'une série de dilutions du transcrit, la concentration de la solution-mère étant déterminée au départ par la mesure de la densité optique (DO). Le logiciel calcule pour chaque échantillon positif, le « crossing point » (Cp) correspondant au nombre de cycle à partir duquel cet échantillon est détecté. Chaque point de la gamme étalon se verra alors attribué un Cp (déterminé par l'amplification) et une concentration (déterminée par la DO). Le logiciel effectue ensuite une extrapolation à partir de ces données pour attribuer pour les Cp des échantillons inconnus, une concentration correspondant à son Cp. L'efficacité de la transcription est déterminée en réalisant une série de dilutions du plasmide dont la concentration de la solution mère a été déterminée par la mesure de la DO. En comparant les concentrations mesurées par DO et celles qui sont déterminées après amplification on estime l'efficacité de la rétro-transcription. Ex. la concentration saisie et mesurée par DO pour le plasmide du capillaire #11 est de $3^{e}4$ copies/run, alors que la concentration déduite par le logiciel est de $9{,}51^{e}4$, cette surestimation traduit la perte qui a eu lieu lors de la transcription, ici elle est de 3,17 fois ($9{,}51^{e}4/3^{e}4 = 3{,}17$).

La perte de sensibilité de détection dépend également du ratio : *Concentration de l'extrait* / *Concentration de l'ARN*, comme le montre le Tableau 25 ci-contre. Plus la concentration de l'extrait est importante, moins la détection est sensible. Cet effet n'est cependant pas linéaire car à partir d'une certaine concentration en ARN viral (250 copies/4µl), la quantité d'extrait n'affecte plus la limite de détection.

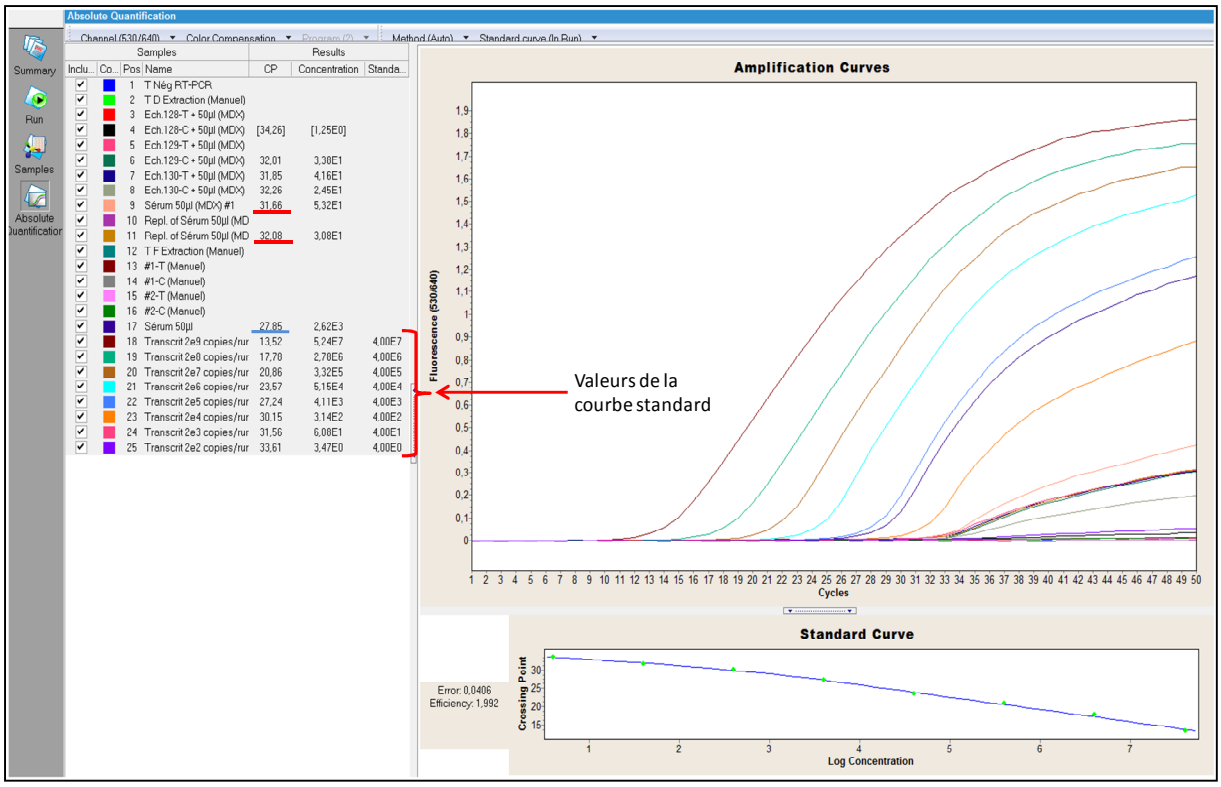


Figure 44 : Choix du mode d'extraction (manuel/automatique). Des échantillons ont étaient extraits manuellement ou grâce à un robot (MDX™ – Qiagen). Les Cp obtenus après extraction manuelle sont plus précoces (Cp=27,85 souligné en bleu) que ceux obtenus après extraction au robot (Cp entre 31,66 et 32,08), ce qui signifie que l'extraction manuelle est plus efficace. La perte d'efficacité dans le cas d'une extraction par le robot est le résultat des pertes de volumes lors des transferts entre les différents tubes (volumes morts). La série de dilutions du transcrit sert à réaliser la courbe standard. TD : témoin négatif de début d'extraction; TF : témoin négatif de fin d'extraction; T: tête du moustique; C: corps du moustique.

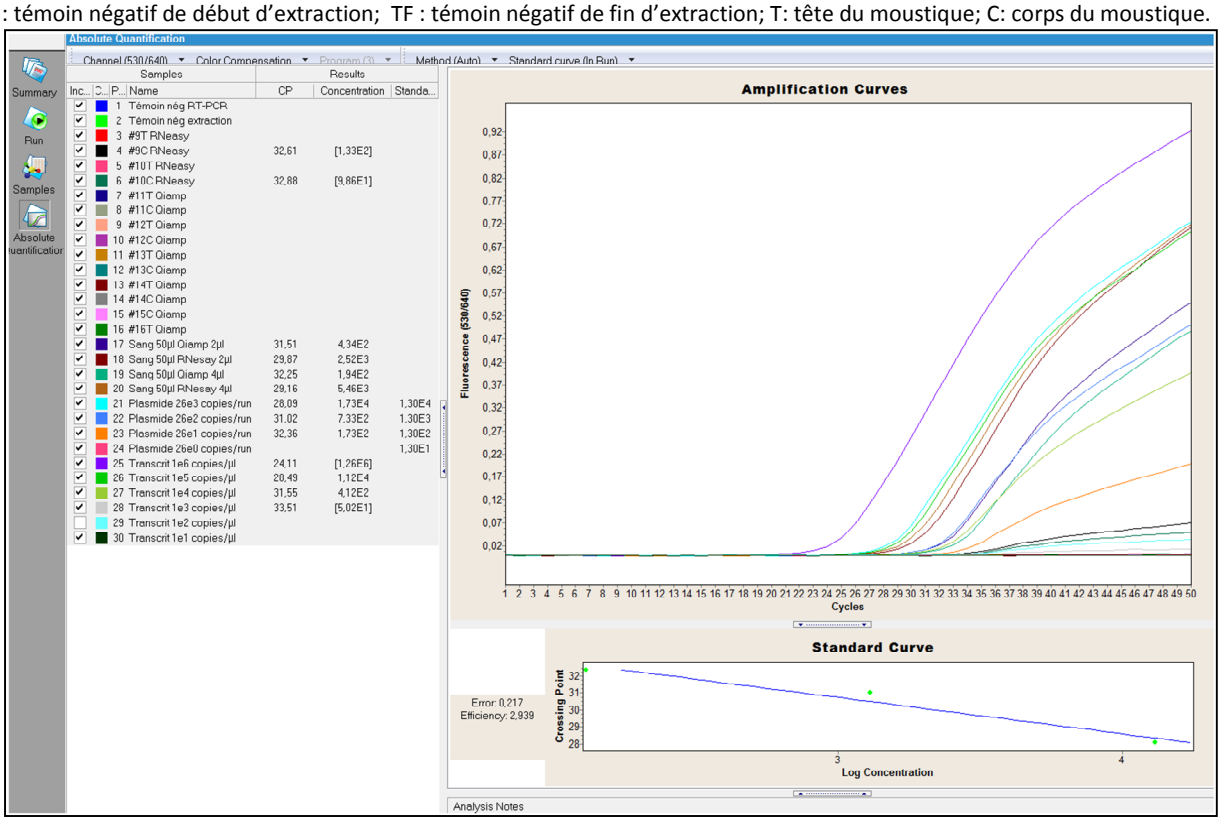


Figure 45 : Choix du kit d'extraction. Des extractions ont été réalisées sur la même quantité du témoin positif. Les témoins positifs (sang) ainsi que les échantillons ont été extraits en utilisant les kits RNeasy et Qiamp (Qiagen) puis amplifiés par qRT-PCR. Les Cp les plus faibles sont obtenus avec le kit Qiamp pour les échantillons liquides (sang) et avec le kit RNeasy pour les échantillons solides (moustiques) . T: tête du moustique, C: corps du moustique.

v. Optimisation des autres paramètres

- Mode et temps de broyage

L'extraction manuelle de l'ARN total des échantillons semble donner des résultats plus intéressants comparée à l'extraction automatique ; en effet, pour un même volume du sérum VHC positif, l'échantillon extrait à l'aide du robot est détecté plus tardivement que l'échantillon extrait manuellement (*cf.* Figure 44) la différence entre les deux modes d'extraction est d'un peu plus que 3 cycles. La quantification effectuée sur la base de la courbe standard montre que, dans le cas d'une extraction manuelle, l'échantillon contient à l'origine 2,62^{e}3 copies/run *versus* entre 3,08^{e}1 et 5,32^{e}1 copies/run dans le cas d'une extraction automatique soit 2 log de différence.

- Choix du Kit d'extraction et kit d'amplification

Nous avons testé différents kits d'extraction et il s'avère (i) que le kit Qiamp (Qiagen) donne les meilleurs résultats, lorsqu'il s'agit d'extraire les ARN à partir d'un liquide, (ii) que les kits RNeasy (Qiagen) ou NucleoSpin RNA XS (Macherey Nagel) sont plus adaptés pour extraire les ARN totaux à partir des tissus de moustiques respectivement dans des volumes finaux de 50 et 10µl (*cf.* Figure 45). En ce qui concerne l'amplification par qRT-PCR en une seule étape, le kit Quantitect OneStep Probe (Qiagen) permet d'obtenir les meilleures amplifications, la Figure 46 montre le profil d'une amplification utilisant le kit Transcriptor One-Step RT-PCR Kit (Roche) : la fluorescence augmente très légèrement au fil des cycles, et la phase exponentielle d'amplification est totalement absente.

- Concentration des amorces et sonde

Les concentrations des amorces et sondes ont été fixées respectivement à 1,5µM et 0,312µM sur la base de la sensibilité de détection (*cf.* Figure 47, Figure 48). Ces concentrations permettent de détecter la présence de l'ARN viral avec les Cp (« crossing points ») les plus faibles.

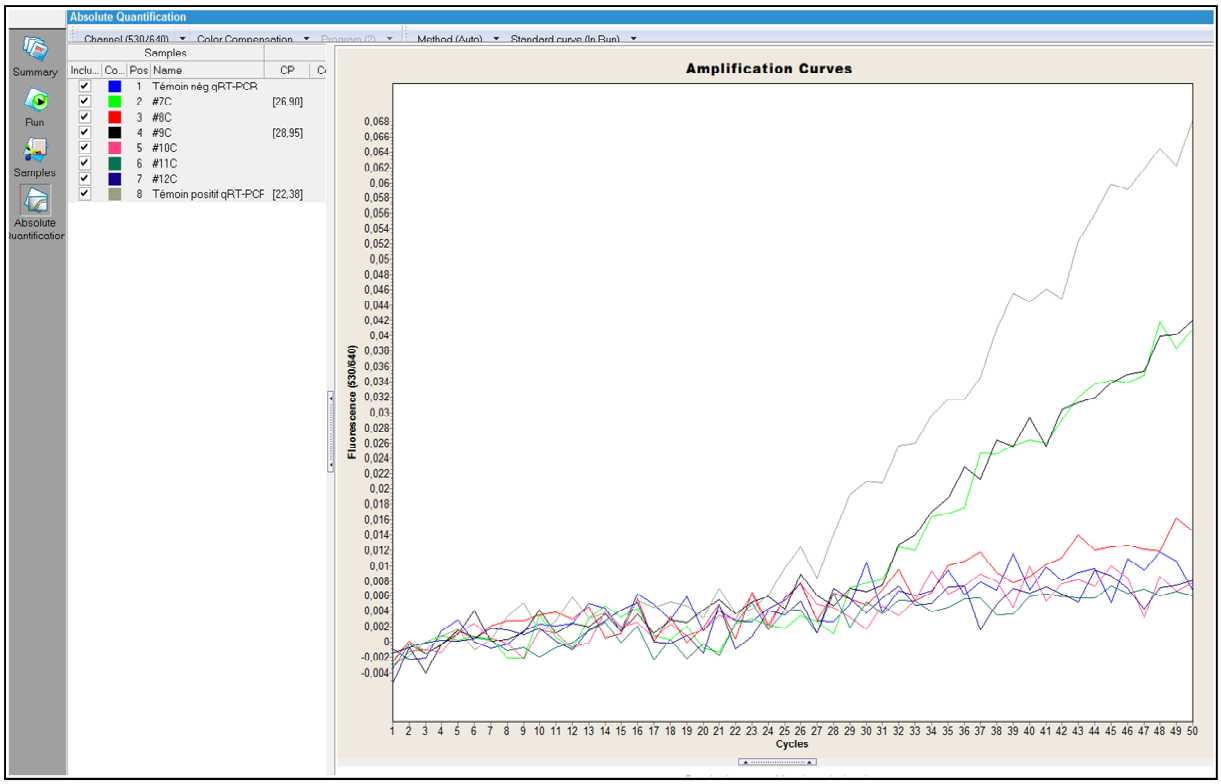


Figure 46 : Choix du kit du d'amplification par qRT-PCR. Des extraits d'échantillons positifs ont été amplifiés par le kit Transcriptor One-Step RT-PCR Kit (Roche). La fluorescence augmente très légèrement et la phase exponentielle d'amplification est totalement absente.

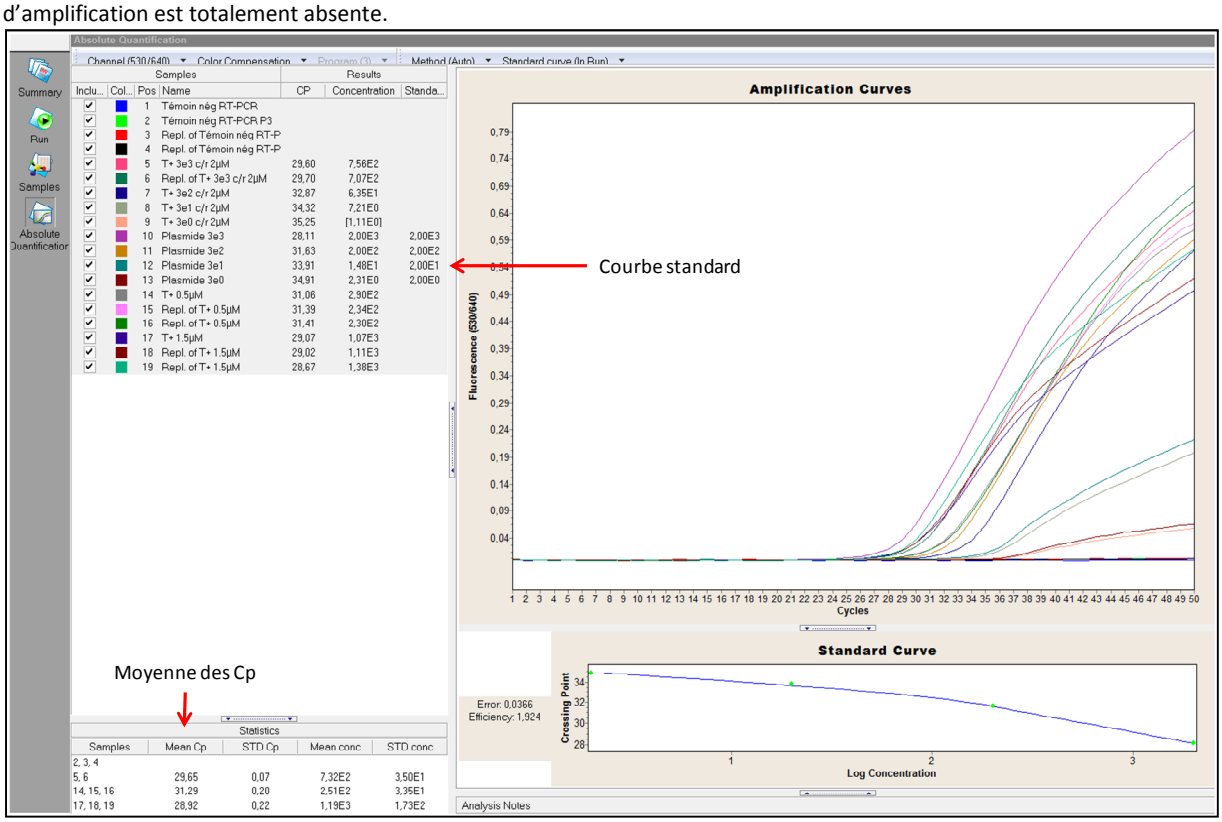


Figure 47 : Optimisation de la concentration des amorces. Différentes concentrations d'amorces ont été utilisées (0,5µM, 1,5 µM et 2µM). Le test est réalisé en triple, le calcul de la moyenne des Cp montre que les amplifications réalisées en présence de 1,5µM d'amorce donnent les Cp les plus faibles donc les amplifications les plus efficaces. Le témoin négatif de qRT-PCR est réalisé également en triple car il y a eu un épisode de contaminations.

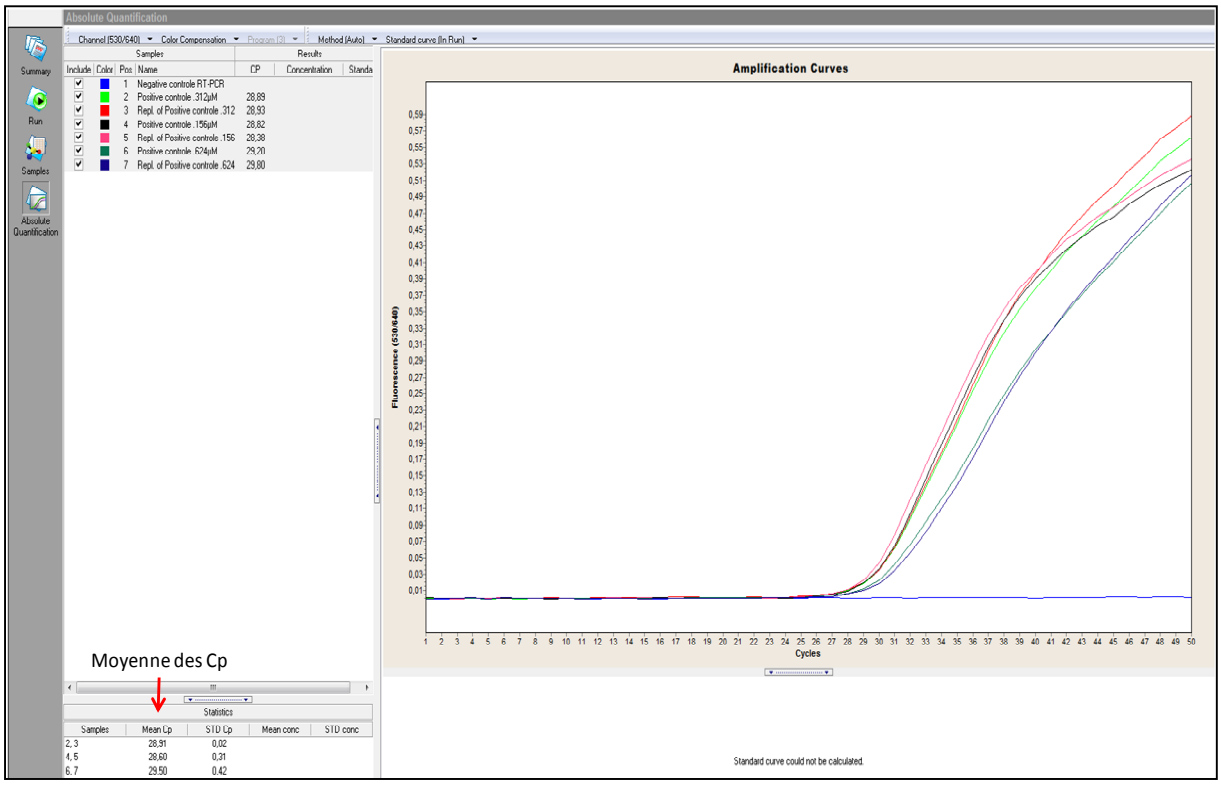


Figure 48 : Optimisation de la concentration de la sonde. Différentes concentrations d'amorces ont été utilisées (0,156µM, 0,312µM et 0,624µM). Le test est réalisé en double, le calcul de la moyenne des Cp montre que les amplifications réalisées en présence de 0,156µM ou 0,312µM de sonde donnent les Cp les plus faibles.

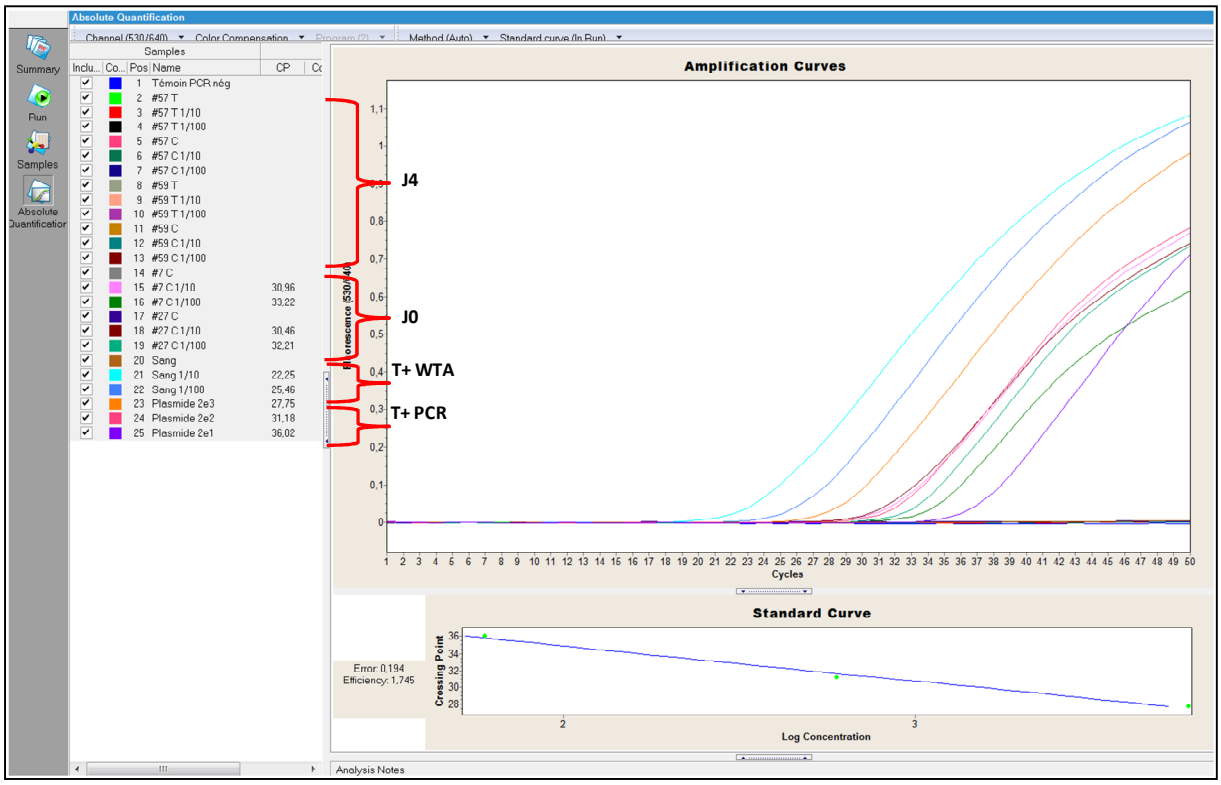


Figure 49 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par WTA. Afin d'être correctement amplifiés, les échantillons doivent être dilués au 1/10 au minimum, une charge d'ADN matriciel trop importante inhibe l'amplification (capillaires 14, 17 et 20). Le génome du VHC est détecté dans les corps des moustiques à J0 et dans le témoin positif en WTA (sang). Les échantillons à J4 ne contiennent pas de génome de VHC. La courbe standard est réalisée à partir de dilutions du plasmide contenant la séquence cible du VHC (fragment de l'IRES) qui sert en même temps de témoin positif de la PCR.

- Détection dans les produits issus de l'amplification par WTA

Afin de pouvoir être amplifiés, les échantillons doivent être dilués au 1/10 au minimum, une charge d'ADN matriciel trop importante, en effet, inhibe l'amplification (capillaires #14, #17 et #20 *cf.* Figure 49). Le génome du VHC est détecté dans les corps des moustiques à J0 et dans le témoin positif de la WTA (repas de sang). Il n'y a pas eu détection d'ARN du VHC dans les échantillons à J4 (*cf.* Figure 49).

Tableau 26 : Récapitulatif des conditions d'élevage et résultats des infections

	Campagne 2005	**Campagne 2006**	**Campagne 2007**	**Campagne 2009**
Source du VHC	Sérum CHU – Grenoble	Sérum CHU – Grenoble	Sérum CHU – Grenoble	Sérum Biobanque de Picardie
Génotype viral	1b	1b	1b	1b
Origine des globules rouges	Mouton	Mouton	Mouton	Lapin
Charge virale dans le repas sanguin (copies/µl)	1000	830	1200	2400
Genres / espèces	*Ae. vexans*	*Cx. pipiens* / *Ae.sp.* (*Ae. vexans* + *Ae. caspius*)	*Ae. vexans* / *Ae. caspius*	*Ae. vexans* (souche KK)
Type de moustiques	***Sauvages***	***Sauvages***	***Sauvages***	***Elevage (souche KK)***
Etat des moustiques lors de la collecte	***Larves***	***Larves***	***Adultes***	***Œufs***
Nombre de moustiques à gorger	***170***	***150 / 110***	***200 / 130***	***320***
Age au jour du gorgement (jours)	***10***	***8***	***7***	***5***
Durée du gorgement (heures)	***16***	***16***	***16***	***16***
Durée de l'élevage (jours)	***21***	***21***	***15***	***30***
Nombre de moustiques gorgés	***58***	***80 / 41***	***127 / 56***	***303***
Taux de gorgement (%)	***34,1***	***53,3 / 37,3***	***63,5 / 43,1***	***94,7***
Nombre de total de moustiques testés	***12***	***20 / 15***	***43 / 18***	***204***
Dont témoins négatifs	8	7 / 7	11 / 2	13
Taux de mortalité (%)	***79***	***75 / 63***	***66 / 68***	***33***
Pourcentage de positifs à J0 (%)	***100***	***100***	***100***	***71,4***
Pourcentage de corps positifs au dernier jour d'élevage	***33,3***	***0 / 33,33***	***0 / 85,71***	***66,67***

b. Résultats des infections expérimentales

Le Tableau 26 résume les conditions dans lesquelles les différentes infections ont été réalisées.

Le nombre de moustiques collectés pour réaliser nos expériences, était toujours très important (500-1000 moustiques) ; cependant, beaucoup d'entre eux mouraient dès les premières heures suivant la collecte, d'autres succombaient après endormissement. Concernant les moustiques sauvages, seuls 20% de la totalité étaient disponibles pour être gorgés au jour de l'infection (entre 100 et 200 moustiques sur 500 à 1000 du départ), cela ne semble pas dépendre du genre de moustique utilisé ou de leur état physiologique lors de la collecte (adultes/larves). Enfin, nous avons remarqué que les moustiques d'élevage survivent mieux aux conditions de captivité : sur 320 moustiques adultes, 303 étaient prêts à être gorgés le jour de l'infection.

- Efficacité du gorgement

Au fur et mesure des expériences, nous avons amélioré les conditions de gorgement, notamment, la méthode d'endormissement, le dispositif et les boites de gorgement. Ceci a permis d'obtenir au final de plus en plus d'individus gorgés, cependant il faut noter que la durée de gorgement reste relativement longue (16h).

- Durée d'élevage et taux de mortalité

La durée de vie ainsi que les taux de survie des moustiques sauvages sont nettement inférieurs à ceux des moustiques d'élevage (63-79% à J21 *vs.* 33% à J30).

- Détection du virus à J0

La quantité de VHC ingérée par le moustique était suffisante pour être détectable à J0 par PCR dans tous les moustiques pour les trois premières expériences. Le taux de moustiques positifs à l'ARN du VHC à J0 dans la dernière expérience (2009) était 25% plus faible par rapport aux expériences précédentes.

Tableau 27 : Résultats de l'expérience 1

Expérience 1		
Espèces de moustiques testées	*Ae. Vexans*	
Méthode de détection	RT-PCR point final	
Prise d'essai au jour J	14	21
Total	1	6
Positifs	0	3
Pourcentage	0	50

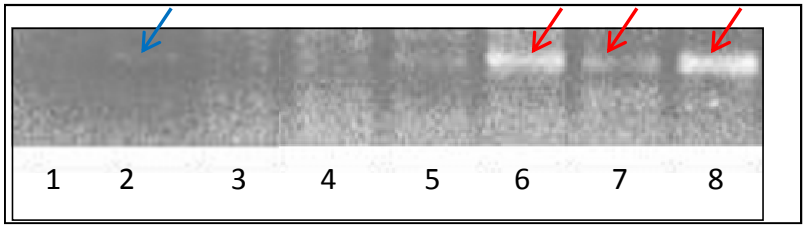


Figure 50 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits de RT-PCR end point réalisée sur les échantillons de moustiques infectés par le VHC. Piste 1) Témoin négatif de la PCR ; piste 2) Témoin négatif moustique ; pistes 3,4) jour 0; piste 5) jour 14; pistes 6,7,8) jour 21. Les flèches rouges désignent la bande d'intérêt, la flèche bleue désigne légère bande de contamination détectée dans le moustique non infecté du J0.

i. Infection expérimentale 2005

Cette expérience préliminaire a été effectuée sur un faible nombre de moustiques (7 moustiques), néanmoins, elle montre, la possibilité de détecter l'ARN viral dans les moustiques à 21 jours post-infection (*cf.* Figure 50, Tableau 27). Nous avons par ailleurs relevé par ailleurs la présence d'une bande de la même taille que la bande attendue dans le moustique non infecté, il doit s'agir sans doute d'une contamination même si cette dernière est beaucoup plus faible en intensité que les bandes obtenues dans les moustiques du J21.

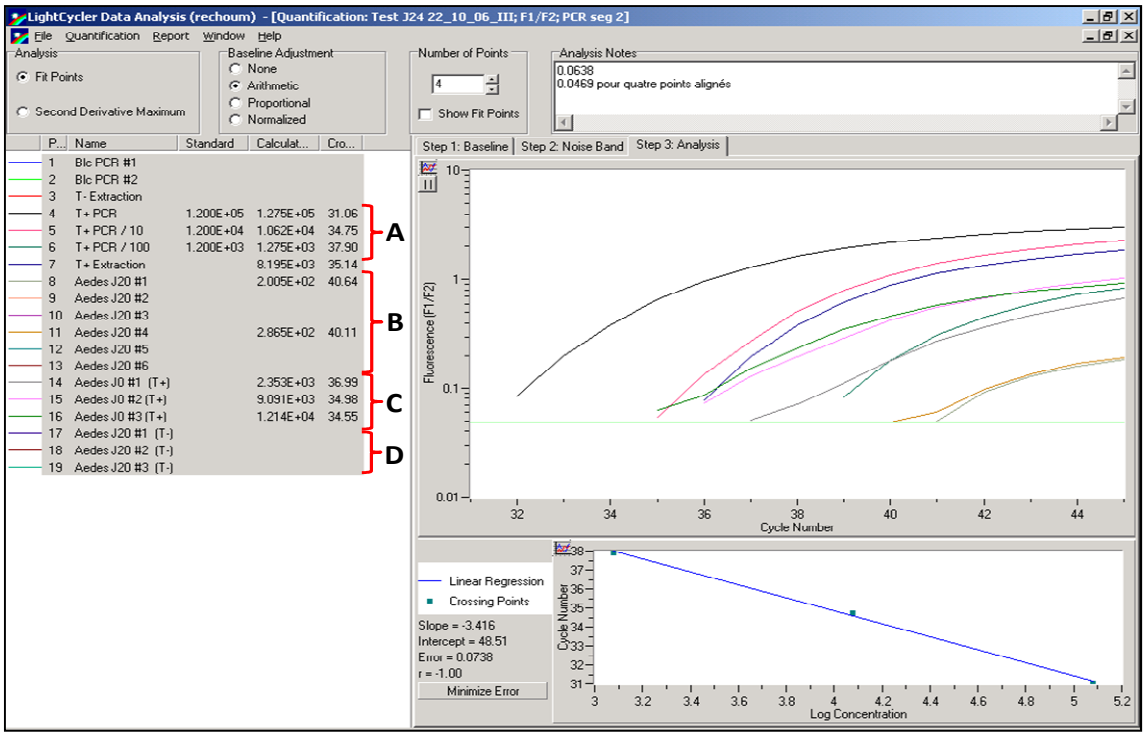


Figure 51 : Détection de l'ARN viral par qRT-PCR après extraction des ARN totaux des moustiques du genre *Aedes* après 21 jours d'élevage. La courbe standard a été réalisée sur une dilution logarithmique d'un extrait d'ARN viral de titre connu (de 120 000 copies/run à 1 200 copies/run). Pour chaque échantillon sont indiqués (i) le nombre de cycles au bout desquels l'ARN viral a été détecté (Cp), ii) la concentration au départ par rapport à la courbe standard. Les courbes en haut à droite montre l'évolution de la détection du signal pour chaque échantillon. (A) échantillons composant la courbe standard. (B) Echantillons infectés du J24. (C) Echantillons témoins positifs du J0. (D) Echantillons témoins négatifs (non infectés).

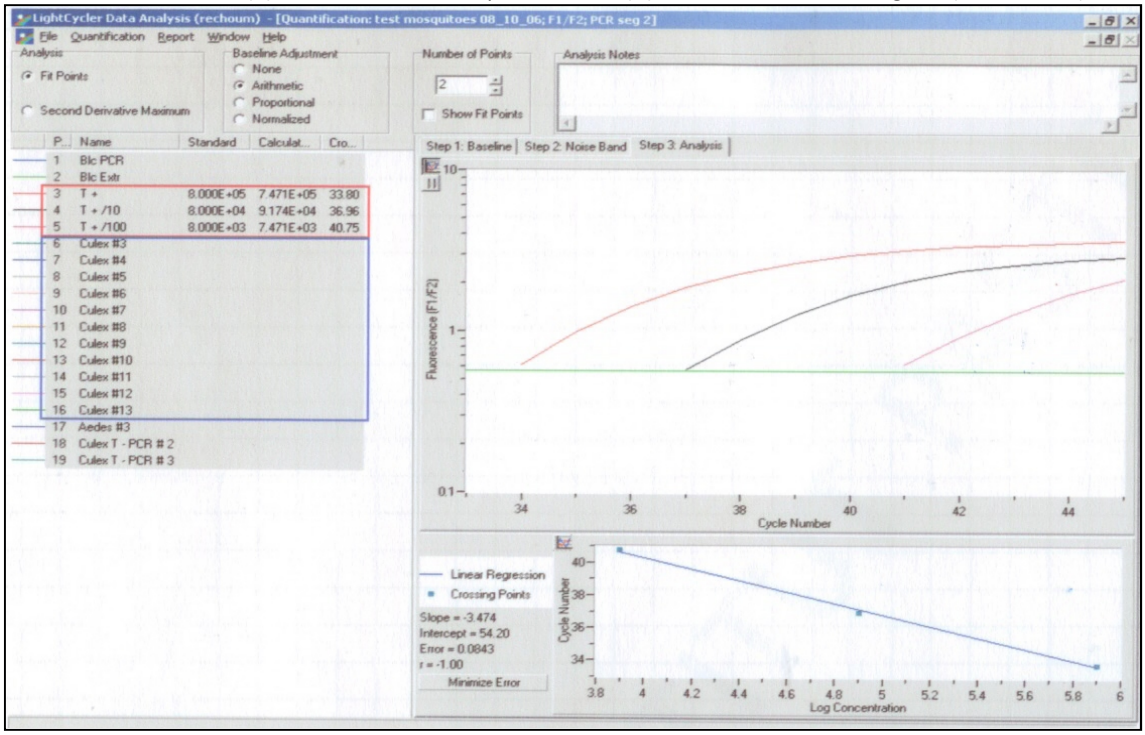


Figure 52 : Détection de l'ARN viral par qRT-PCR après extraction des ARN totaux des moustiques du genre *Culex* après 21 jours d'élevage. La courbe standard a été réalisée sur une dilution logarithmique d'un extrait d'ARN viral de titre connu (de 120 000 copies/run à 1 200 copies/run). Pour chaque échantillon sont indiqués (i) le nombre de cycles au bout desquels l'ARN viral a été détecté (Cp), ii) la concentration au départ par rapport à la courbe standard. Les courbes en haut à droite montre l'évolution de la détection du signal pour chaque échantillon. (A) échantillons composant la courbe standard. (B) Echantillons infectés du J24. (C) Echantillons témoins positifs du J0. (D) Echantillons témoins négatifs (non infectés).

ii. Infection expérimentale 2006

Dans le but de tester la réponse de deux genres de moustiques vis-à-vis de l'infection par le VHC nous avons infecté expérimentalement des individus des genres *Culex* et *Aedes*. La détection de l'ARN du VHC a été réalisée par RT-PCR en temps réel. Il était très intéressant de voir comment la réponse de ces deux genres de moustiques qui occupent le même territoire peut être totalement différente. Sur les six moustiques du genre *Aedes* du J21, deux (66,7%) se sont révélés contenir de l'ARN du VHC (*cf.* Figure 51), alors qu'un nombre plus important de moustiques du genre *Culex* a été testé (11 moustiques), et aucun n'a été révélé positif pour la présence génome viral (*cf.* Figure 52). Les moustiques à J0 étaient, quant à eux, tous négatifs. La Figure 51 résume les résultats obtenus pour cette infection expérimentale.

Afin de voir si l'ARN détecté était du génome résiduel ou il s'agissait d'une réplication, nous avons amplifié, cloné (*cf.* Figure 53) puis séquencé une région du gène de la RdRp du VHC provenant de l'un des échantillons positifs et l'avons comparé à la séquence provenant d'un moustique du J0 et aux séquences de la RdRp publiées dans les banques de séquences spécialisées (http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/) (*cf.* Figure 54, Figure 55, Figure 56, Figure 57, et Figure 58). Le résultat du séquençage montre la présence de mutations de substitutions à plusieurs endroits ; seules trois mutations avaient une incidence sur la séquence en acides aminés. Les trois mutations dans la séquence aminoacide étaient uniques parmi plus de 850 séquences publiées. Ces mutations sont $Val^{262} \rightarrow Ala^{262}$, $Pro^{265} \rightarrow Ser^{265}$, et $Asn^{316} \rightarrow Asp^{316}$, elles ont fait l'objet d'un brevet (WO/2008/078056) et sont disponibles pour consultation et téléchargement sur PubMed (Numéros d'accession : FN398084 et CAZ61009 respectivement pour les séquences nucléotidiques et aminoacides à J0 et FN396931 et CAZ61008 respectivement pour les séquences nucléotidiques et aminoacides à J21) (*cf.* Figure 54, Figure 55, Figure 56, Figure 57, et Figure 58).

Tableau 28 : Résultats de l'expérience 2

Expérience 2				
Espèces de moustiques testées	*Cx. pipiens*		*Ae. vexans* + *Ae. caspius*	
Méthode de détection	qRT-PCR		qRT-PCR	
Prise d'essai au jour J	0	21	0	21
Total	3	11	3	6
Positifs	3	0	3	2
Pourcentage	100	0	100	33,33

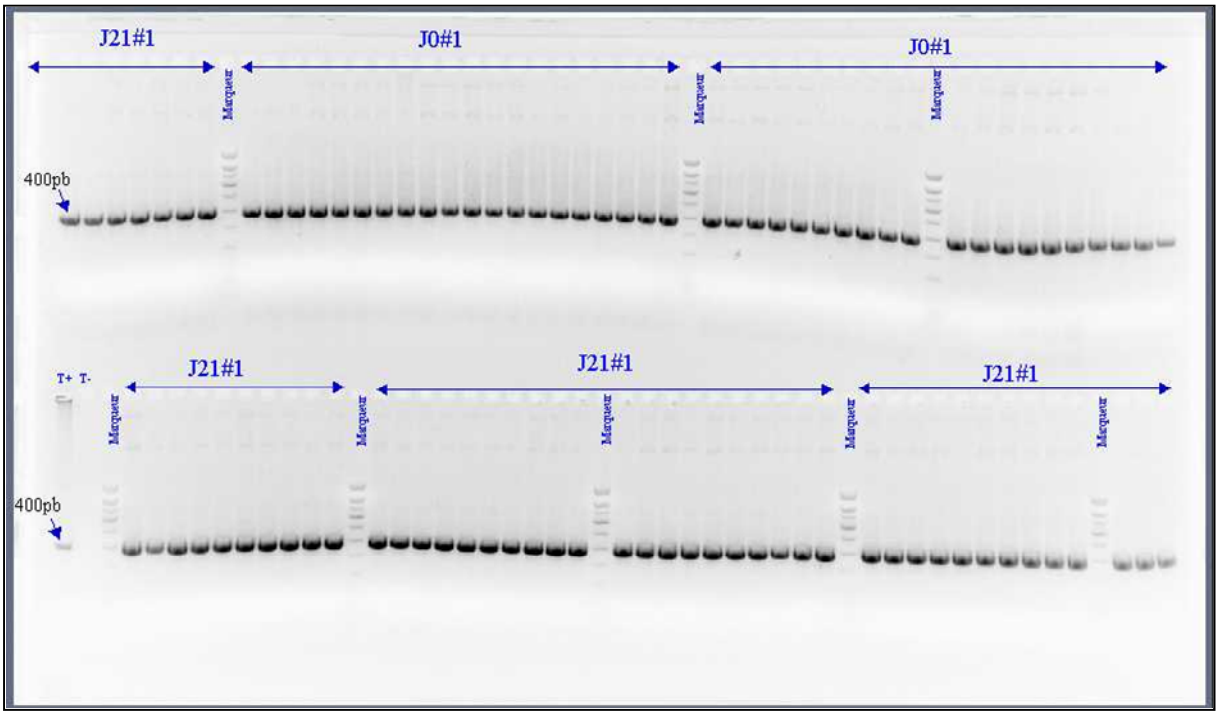


Figure 53 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des clones transformés. Après clonage, les bactéries ont été mises en culture pendant 16 heures dans des boites de Pétri. Un screening sur les clones ayant poussé a été effectué pour sélectionner les clones positifs. La migration sur gel des produits de la PCR montre les clones positifs (présence d'une seule bande à 400pb). T+ témoin positif de la PCR, T- témoin négatif du clonage et de la PCR, J0#1 moustique du J0 infecté (sert de référence), J21#1 moustique du J21 infecté.

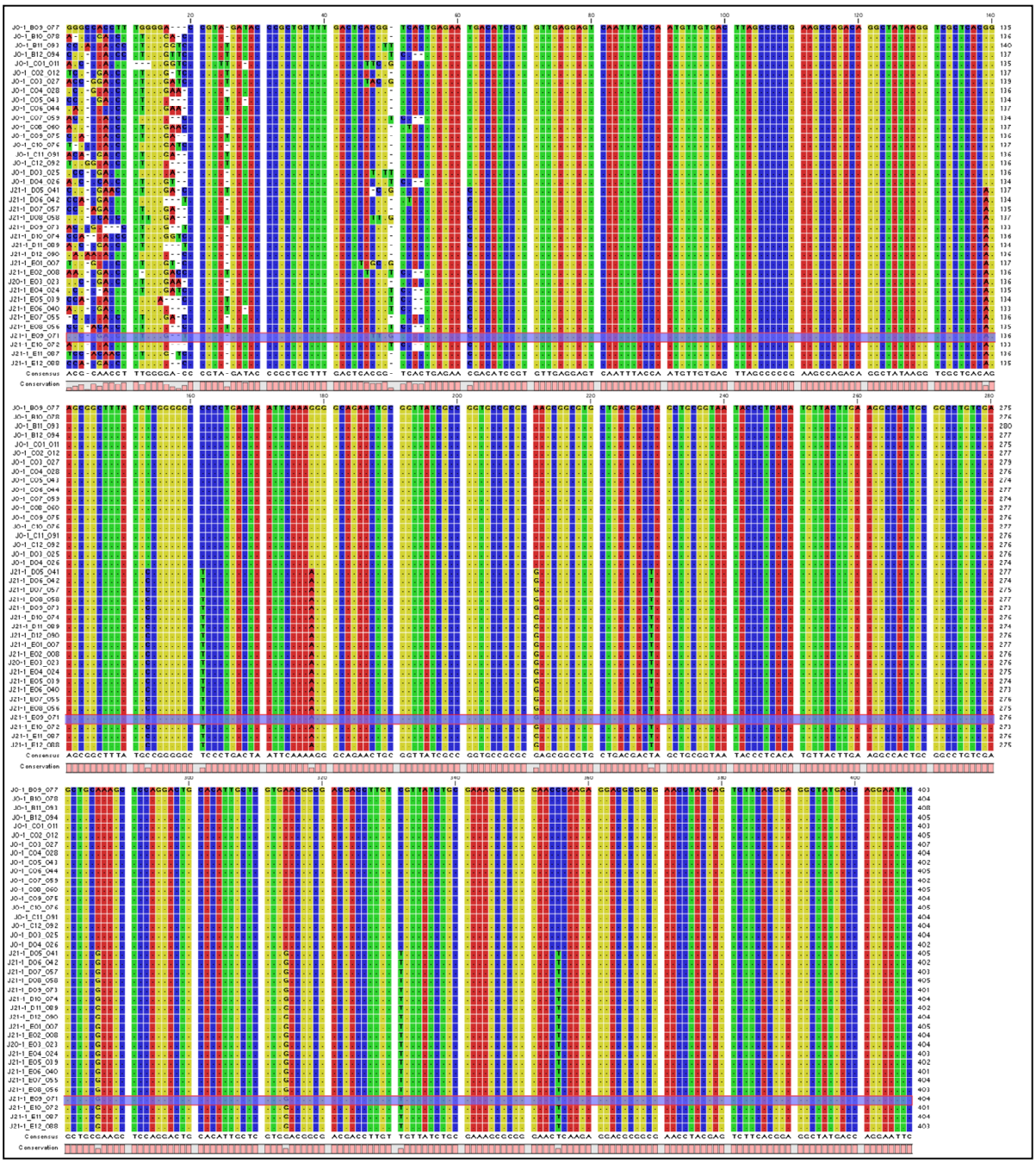


Figure 54 : Alignement des séquences nucléotidiques obtenues après séquençage des fragments de NS5B issus d'un individu *Ae vexans* à J0 et d'un moustique du J21. Chaque couleur désigne un des quatre nucléotides (A : rouge, T : vert, C : bleu, G : jaune). 20 séquences des échantillons à J0 (référence) et J21 sont alignées, les points montrent les nucléotides qui sont similaires entre les deux échantillons, les lettres A, T, G et C lorsqu'elles apparaissent, elles indiquent une mutation. Les tirets indiquent une mutation de délétion. Le graphe en bas de chaque alignement indique le degré de conservation d'un nucléotide à une position donnée. Une séquence consensus est donnée sous les graphes de conservation.

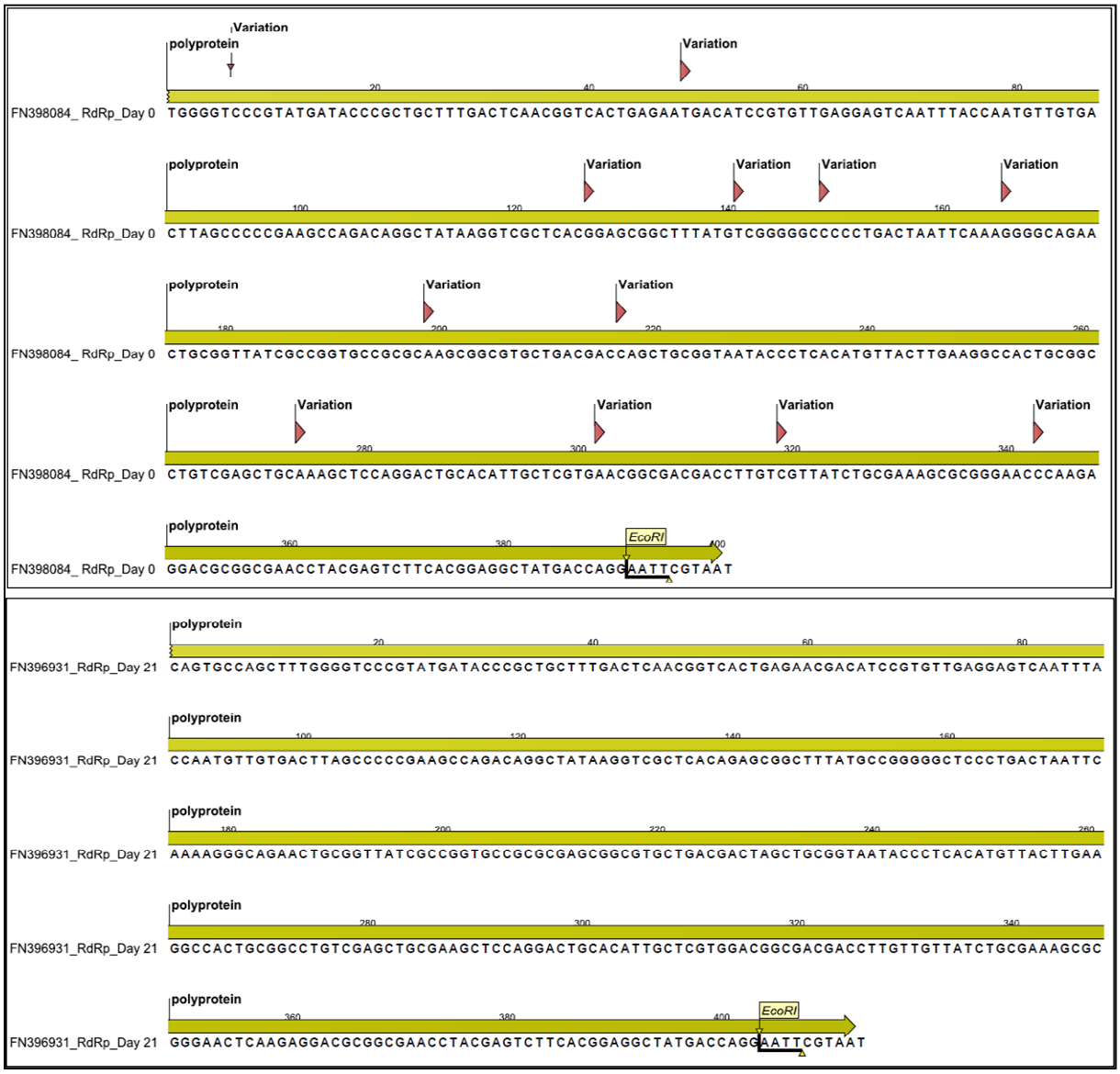


Figure 55 : Séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21 après infection. Les numéros commençant par FN sont les numéros d'accès dans les banques.

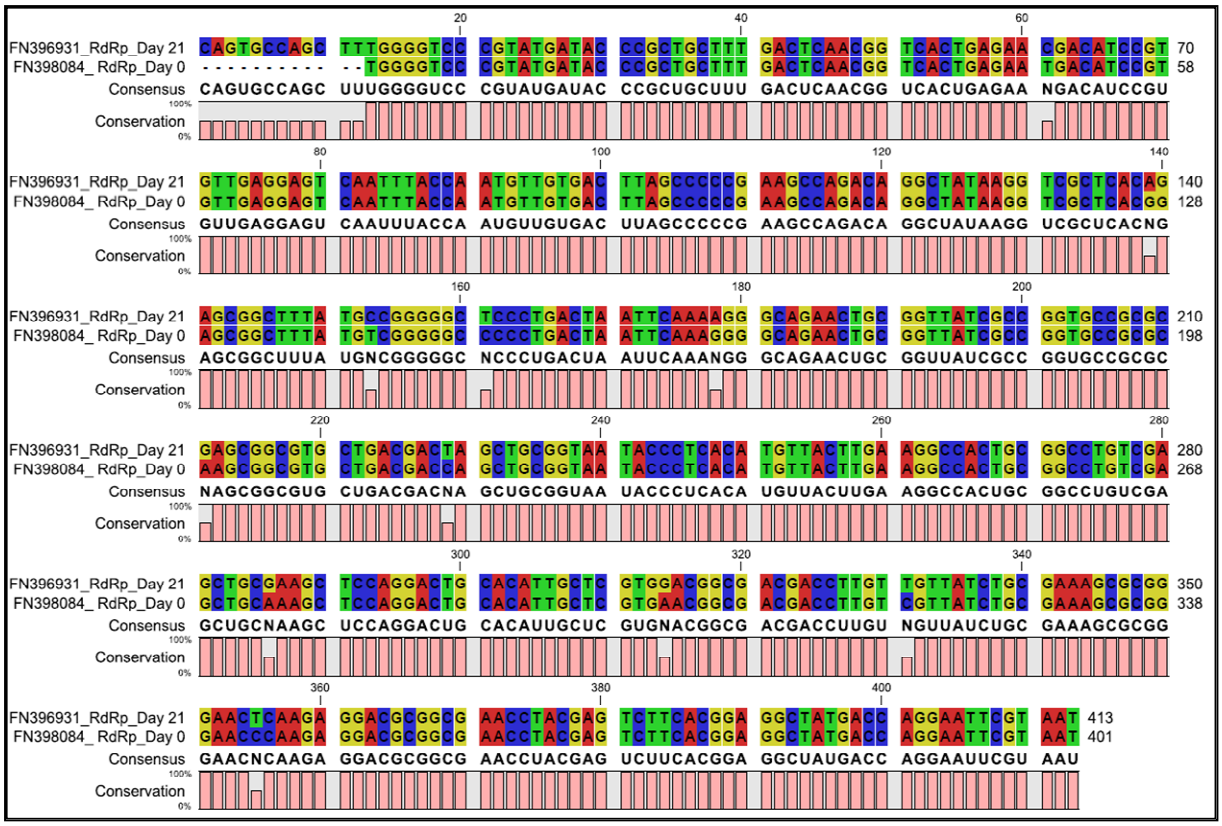


Figure 56 : Alignement des séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21 après infection. Les numéros commençant par FN sont les numéros d'accès dans les banques. Le degré d'homologie entre les deux séquences est schématisé par un graphique sous chaque ligne d'alignement. Les flèches indiquent les positions des mutations. Il faudra noter que toutes ces mutations ne seront pas forcément répercutées sur la séquence en acides aminés grâce à la dégénérescence du code génétique.

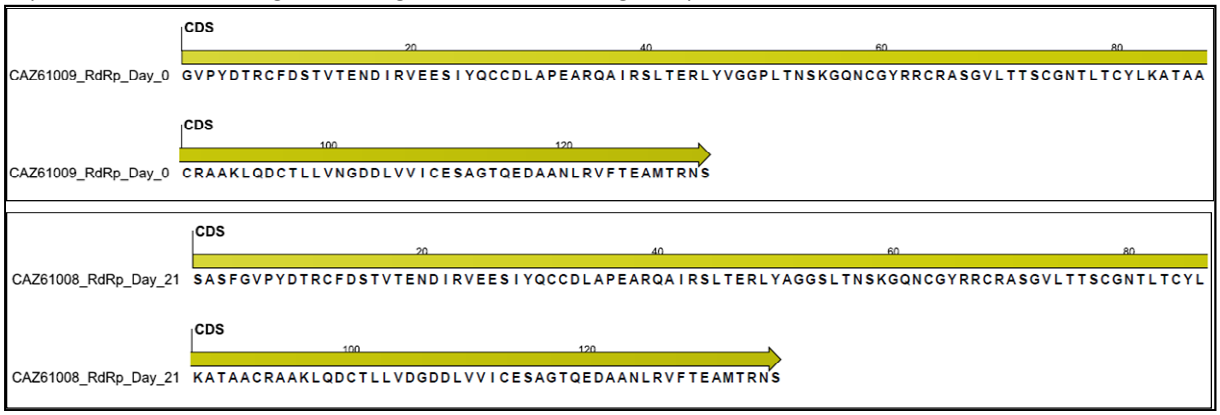


Figure 57 : Séquences consensus en acides aminés obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21 après infection. Les numéros commençant par CAZ sont les numéros d'accès dans les banques.

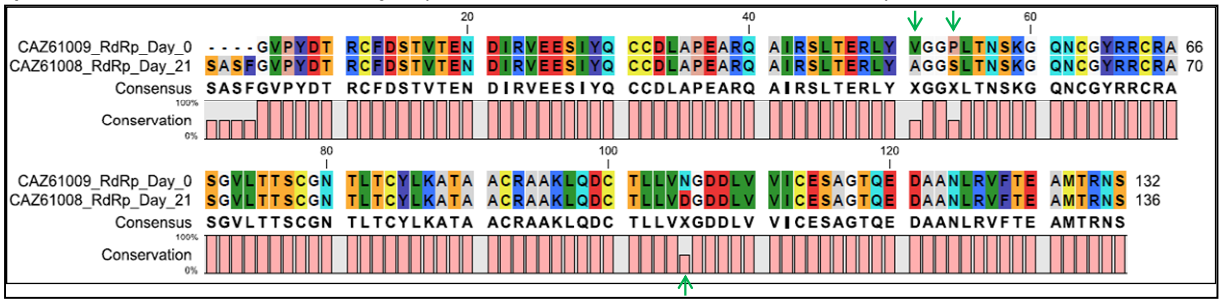


Figure 58 : Alignement des séquences consensus en acides aminés obtenues sur les fragments clonés de la RdRp (gène N5B) à J0 et J21 après infection. Les numéros commençant par CAZ sont les numéros d'accès dans les banques. Le degré d'homologie entre les deux séquences est schématisé par un graphique sous chaque ligne d'alignement. Les flèches désignent les mutations qui sont apparues Val^{262}→Ala^{262}, Pro^{265}→Ser^{265}, and Asn^{316}→ Asp^{316}.

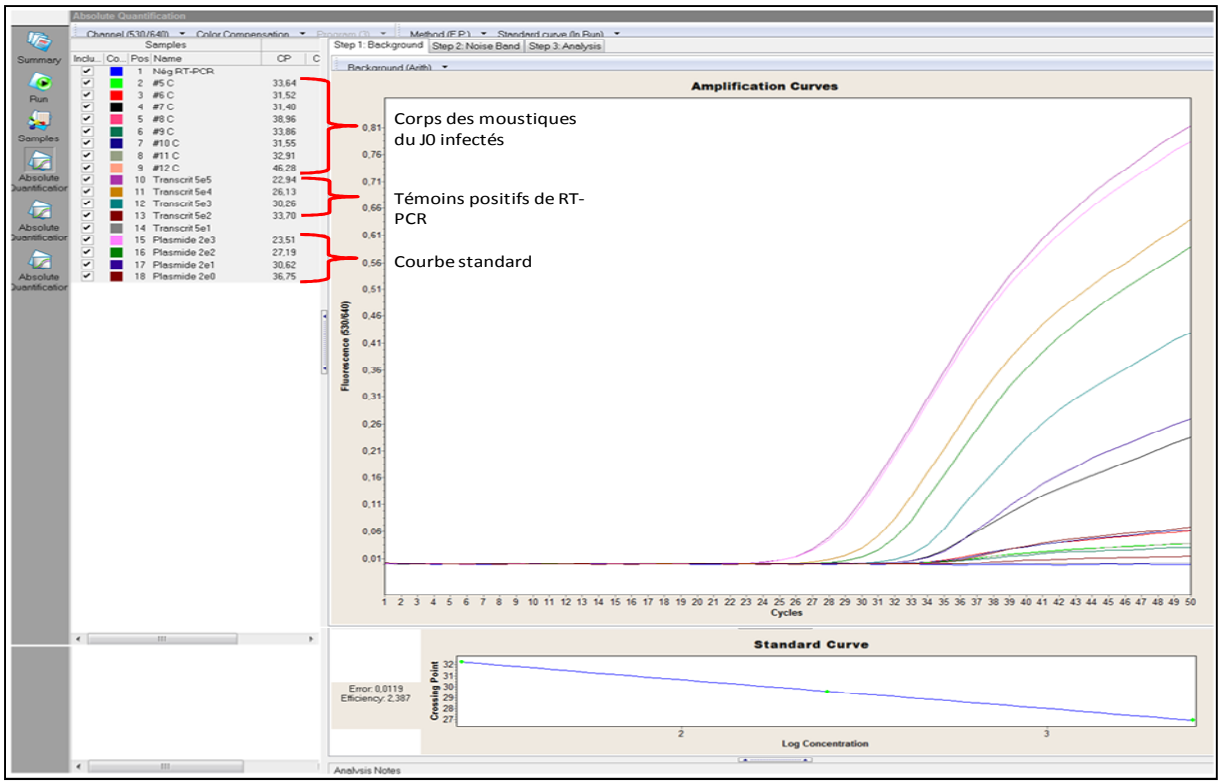


Figure 59 : Détection de l'ARN du VHC dans les corps des moustiques (infectés) à J0 par qRT-PCR. L'ARN du VHC a été détecté dans tous les corps des moustiques du J0 infectés. C: corps du moustique.

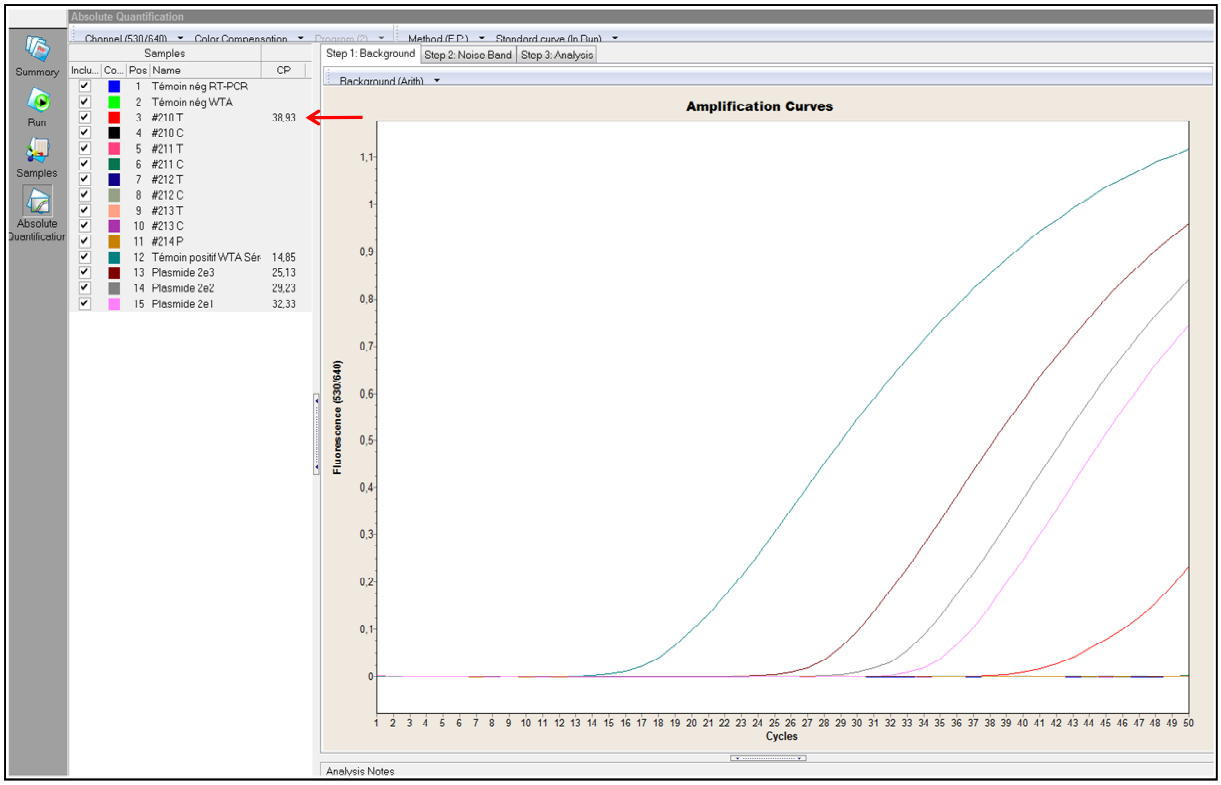


Figure 60 : Détection de l'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par la de WTA. Le génome du VHC est détecté dans la tête du moustique #210 uniquement. T: tête, C: corps, P: pool de moustiques morts. Tous les échantillons testés (#210T, #210C, #211T, #211C, #212T, #212C, « 213T, #213C, #214P et le sérum HCV+ témoin positif de la WTA) ont été dilués au 100ième.

iii. Infection expérimentale 2007

Dans cette expérience, nous nous sommes intéressés au genre *Aedes* qui s'est montré plus compétent. Nous avons travaillé sur deux espèces *d'Aedes* (*Ae*. *caspius* et *Ae*. *vexans*) et suivi l'évolution de la détection de l'ARN en fonction du temps et des tissus. L'ARN VHC était détectable par qRT-PCR dans les corps de tous les moustiques (infectés) à J0, mais dans aucune des têtes de ces mêmes moustiques. Les moustiques gorgés par un repas sanguin non-virémique étaient en revanche tous négatifs (*cf.* Figure 59). Par la même technique de détection (RT-PCR en temps réel) il n'était pas possible de détecter de l'ARN viral dans les autres échantillons (J4, J8, J15) et ce pour les deux espèces de moustiques. L'emploi d'une technique de détection plus sensible, la WTA-PCR, a cependant pu détecter de l'ARN viral dans une tête à J0 et une tête à J15 (échantillon #210T) (*cf.* Figure 60, Figure 61 et Figure 62). Cependant, cet échantillon n'était pas systématiquement trouvé comme positif ; l'amplification de l'ARN VHC n'était positive qu'une fois sur quatre (*cf.* Figure 61). Le fait que la détection de l'ARN du VHC ne soit pas reproductible dans cet échantillon, et du fait de ne pas avoir pu détecter de l'ARN viral dans le corps du même moustique (échantillon #210C) nous a poussés à revoir les conditions d'amplification et de les modifier. Par la suite, les nouvelles conditions d'amplification nous ont permis d'obtenir une détection reproductible de l'ARN viral dans l'échantillon #210T mais aussi dans le corps du même échantillon (#210C). De plus, nous avons pu détecter de l'ARN viral chez quatre autres moustiques. Au total, sur les six moustiques du J15, nous avons détecté de l'ARN viral dans trois moustiques complets et deux corps (recherche négative dans leurs têtes) soit 51% des têtes, 85% des corps (*cf.* Tableau 29 et Figure 63). Ainsi, ces résultats nous ont permis d'avoir une idée préliminaire de la cinétique d'infection par le VHC. Pour *Ae*. *caspius*, l'amplification par WTA a montré la présence de l'ARN viral dans la tête d'un moustique à J0 (négatif par qRT-PCR), une tête et un corps d'un moustique à J4 (~6% de positifs). Les moustiques *Ae*. *caspius* à J8 et J15 étaient en revanche totalement négatifs. Les moustiques *Ae*. *vexans* étaient également négatifs à 8 jours post-infection.

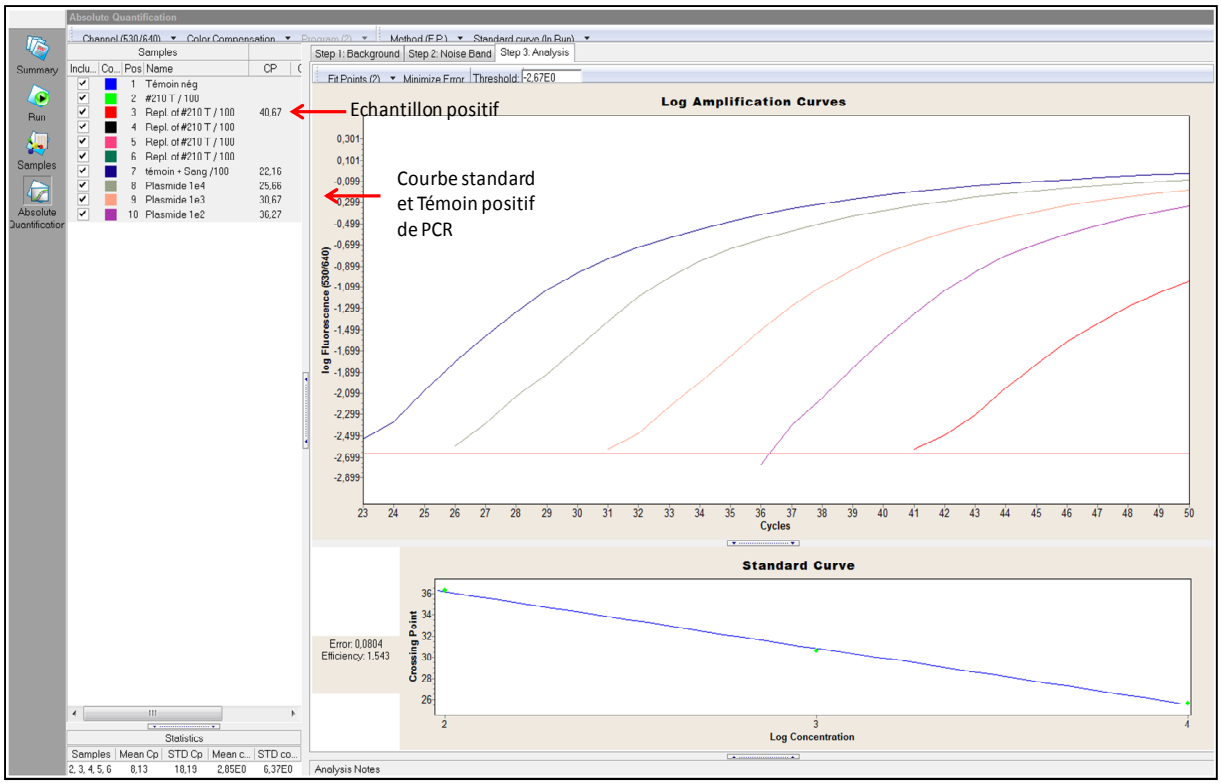


Figure 61 : Détection de l'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par la de WTA. L'échantillon #210T amplifié par la WTA est testé par PCR pour la présence du génome du VHC. Le test réalisé en 5 exemplaires. Un seul échantillon sur les cinq est positif pour le génome du VHC.

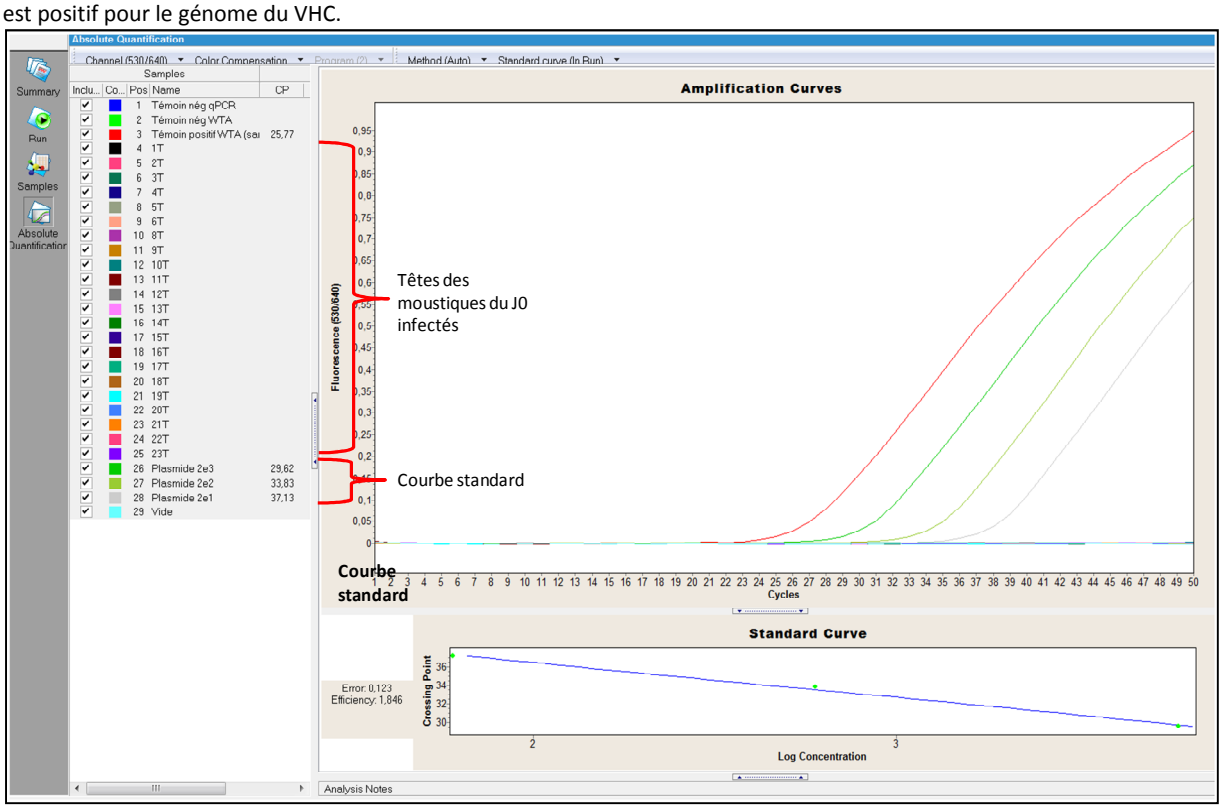


Figure 62 : Détection de l'ARN du VHC après amplification par WTA dans les têtes des moustiques (infectés) à J0. Une amplification par WTA a été réalisée sur les extraits des ARN totaux des têtes de moustiques (infectés) à J0. La détection de l'ARN du VHC a été ensuite réalisée par qPCR sur ces produits d'amplification dilués au 100ième. Les têtes des moustiques (infectés) à J0 ne contiennent pas d'ARN du VHC.

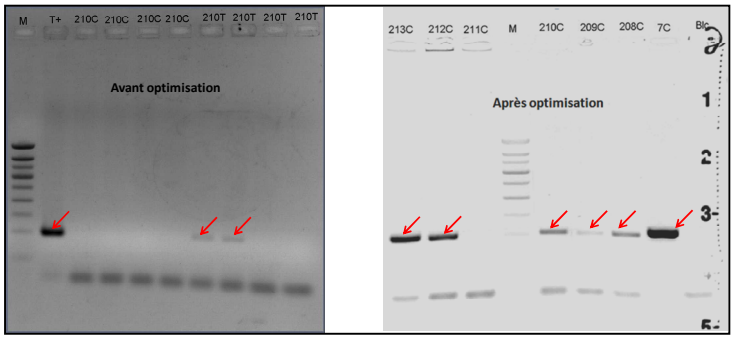


Figure 63 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC par PCR dans les échantillons amplifiés par WTA. A gauche : électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits de PCR effectuée sur les échantillons 210T et 210C dans un volume final de 20µl. Les échantillons 210T et 210C ont était amplifiés en quatre exemplaires. Seuls deux échantillons 210T sur les quatre amplifiaient la séquence désirée (220pb de l'IRES) matérialisée par une bande qui migre à la même distance que celle du témoin positif (T+). A droite : électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits de PCR effectuée sur les échantillons 7C (corps d'un moustique du J0 infecté), 208C à 213C (corps de moustiques du J15 infectés) dans un volume final de 50µl. le fait d'augmenter le volume final de PCR a permis de détecter de l'ARN du VHC dans d'autres échantillons du J15 (208C, 209C, 210C, 212C et 213C), l'échantillon 7C sert de témoins positif d'infection et de détection. M: marqueur de poids moléculaire. T: tête de moustique, C: corps de moustique, T+: témoin positif de PCR, Blc : Témoin négatif de PCR. Flèche rouge: bande d'intérêt.

Tableau 29 : Résultats de l'expérience 3

Expérience 3							
Espèces de moustiques testées		*Ae. caspius*				*Ae. Vexans*	
Méthode de détection		WTA-qPCR				WTA-qPCR	
Prise d'essai au jour J		0	4	8	15	8	15
Total		11	17	9	7	5	7
Nombre de positifs	Têtes	1	1	0	0	0	4
	Corps	11	1	0	0	0	6
Pourcentages	Têtes	9,1	5,9	0	0	0	57,1
	Corps	100	5,9	0	0	0	85,7

Tableau 30 : Les zones amplifiées du génome du VHC dans les échantillons positifs à 15 jours après infection.

Zone concernée du génome du VHC	Couple d'amorces	Taille de la bande attendue en pb	Numéro de l'échantillon	*Cf.* figure
5'UTR	1TS /2CH	220	208C, 209T, 209C, 210T, 210C, 212C, 213T, 213C	Figure 60, Figure 61, Figure 62, Figure 63
NS2	3b-f / 3b-r	483	210T	Figure 66
NS3	4c-f / 4b-r	199	209T, 209C, 208C, 212C, 213T, 213C	Figure 67
NS5B	7a-f / 7a-r	492	210T, 210C	Figure 66
NS5B	7c-f / PR2	348	210T, 210C, 212	Figure 72

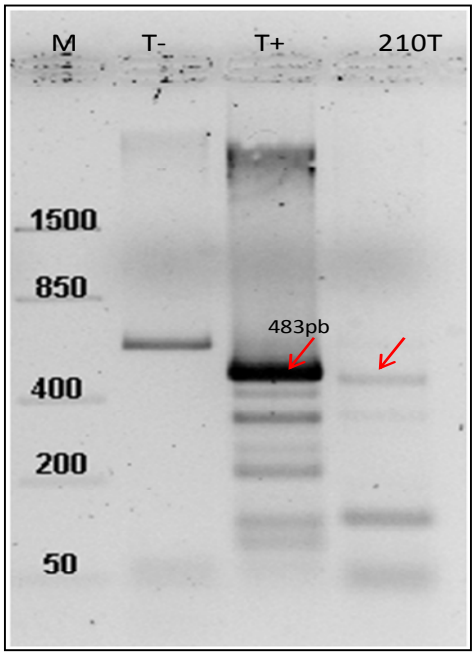


Figure 64 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur l'échantillon 210T en utilisant le couple d'amorces 3b-f / 3b-r. La flèche rouge montre la bande d'intérêt. M : marqueur de poids moléculaire, T+ : témoin positif.

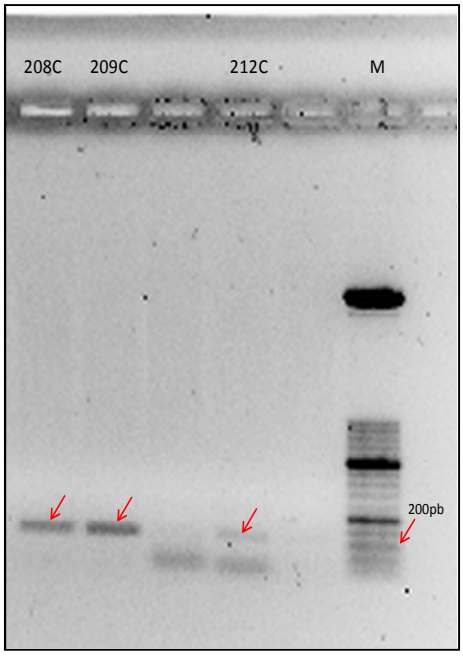


Figure 65 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur les échantillons 208C, 209C et 212C, en utilisant le couple d'amorces 4c-f / 4b-r. La flèche rouge montre la bande d'intérêt. M : marqueur de poids moléculaire, T+ : témoin positif.

A ce stade, il faut rappeler que toutes les amplifications de l'ARN du VHC (réalisées sous une forme ou une autre) ont été effectuées à l'aide d'amorces et sondes reconnaissant la région 5'NC (IRES) du VHC. La présence du génome du VHC a ensuite été confirmée sur d'autres régions du génome viral dans le but de reconstituer le maximum de la séquence génomique de l'ARN du VHC (*cf.* Tableau 30 et Tableau 32, Figure 64, Figure 65, Figure 66, Figure 67). Toutefois, même si nous avions réussi à amplifier différentes séquences du génome du VHC, il était très difficile d'obtenir des clones stables après transformation, la Figure 72 montre le faible rendement de transformation avec ces produits d'amplification, sur les 21 clones amplifiés, seuls 7 (33,33%) avait vraisemblablement intégré l'insert. De plus, ces inserts étaient perdus dès que les clones d'origines étaient mis en culture en vue de réaliser des miniprep. Ceci nous a empêchés d'obtenir les séquences de toutes les régions amplifiées. Le même protocole d'amplification et de clonage permettait par ailleurs d'obtenir des rendements de transformation plus élevés et des clones plus stables à condition d'utiliser des matrices qui n'étaient pas amplifiées par WTA (*cf.* Figure 74).

Tous les produits amplifiés n'ont pu être séquencés, néanmoins, le séquençage de la région très conservée de l'ARN viral (IRES) et détectée à J15 a montré la présence de deux mutations : une délétion en position 243 (C/A 243) et une substitution en position 203 (Δ203 U) comparé à l'ARN viral détecté à J0 (*cf.* Figure 63, Figure 68, Figure 69, Figure 70, Figure 71, et Figure 72). Les séquences sont disponibles pour consultation et téléchargement sur PubMed (numéros d'accès : FN398083 pour les séquences nucléotidiques du J0 et FN398082 pour les séquences nucléotidiques du J15). Il est intéressant de souligner le fait (i) que ces mutations étaient identiques dans 25 clones séquencés à partir de l'échantillon 210T (tête de moustique à J15) et (ii) qu'aucune d'elles n'était présente dans 25 clones réalisés pour les séquences du J0 (*cf.* Figure 69 et Figure 70). Une autre séquence du génome viral a été obtenue à partir du corps d'un autre moustique du J15 infecté (212C). Elle est située au sein du gène de la RdRp entre la position 2667 aa et 2771 aa. En revanche, il n'était pas possible de relever des mutations au niveau de cette séquence car nous n'avons pas réussi à séquencer la même région dans un témoin positif d'infection (moustique du J0 infecté) pour pouvoir effectuer la comparaison (*cf.* Figure 75).

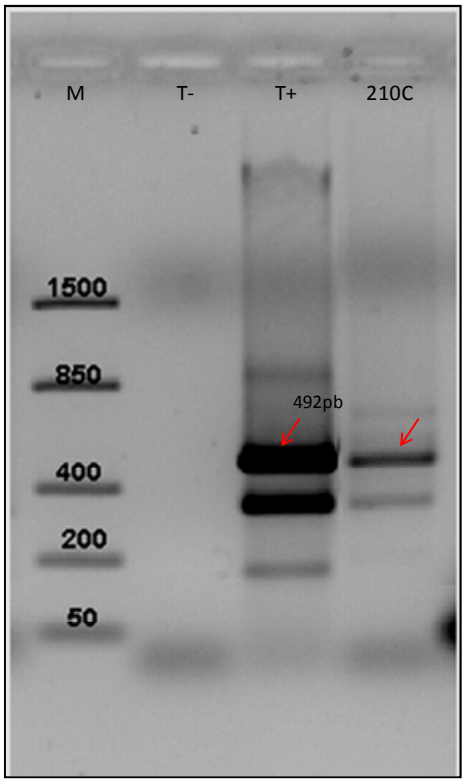


Figure 66 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur l'échantillon 210C en utilisant le couple d'amorces 7a-f / 7a-r. La flèche rouge montre la bande d'intérêt. M : marqueur de poids moléculaire, T+ : témoin positif.

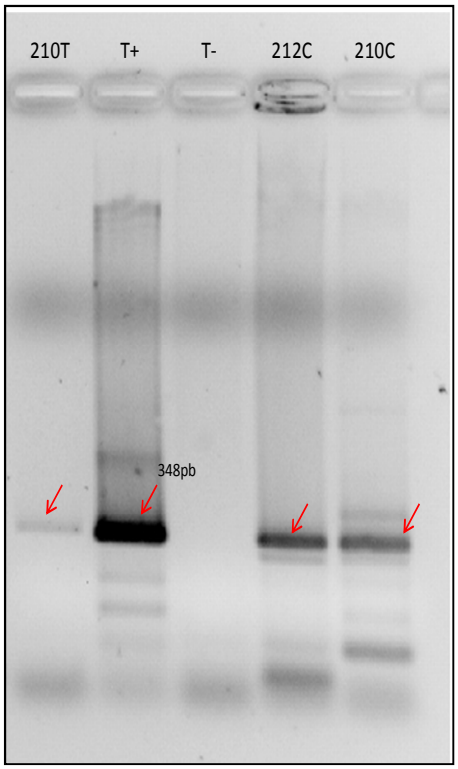


Figure 67 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR réalisée sur les échantillons 210T, 210C et 212C, en utilisant le couple d'amorces 7c-f / PR2. La flèche rouge montre la bande d'intérêt. M : marqueur de poids moléculaire, T+ : témoin positif.

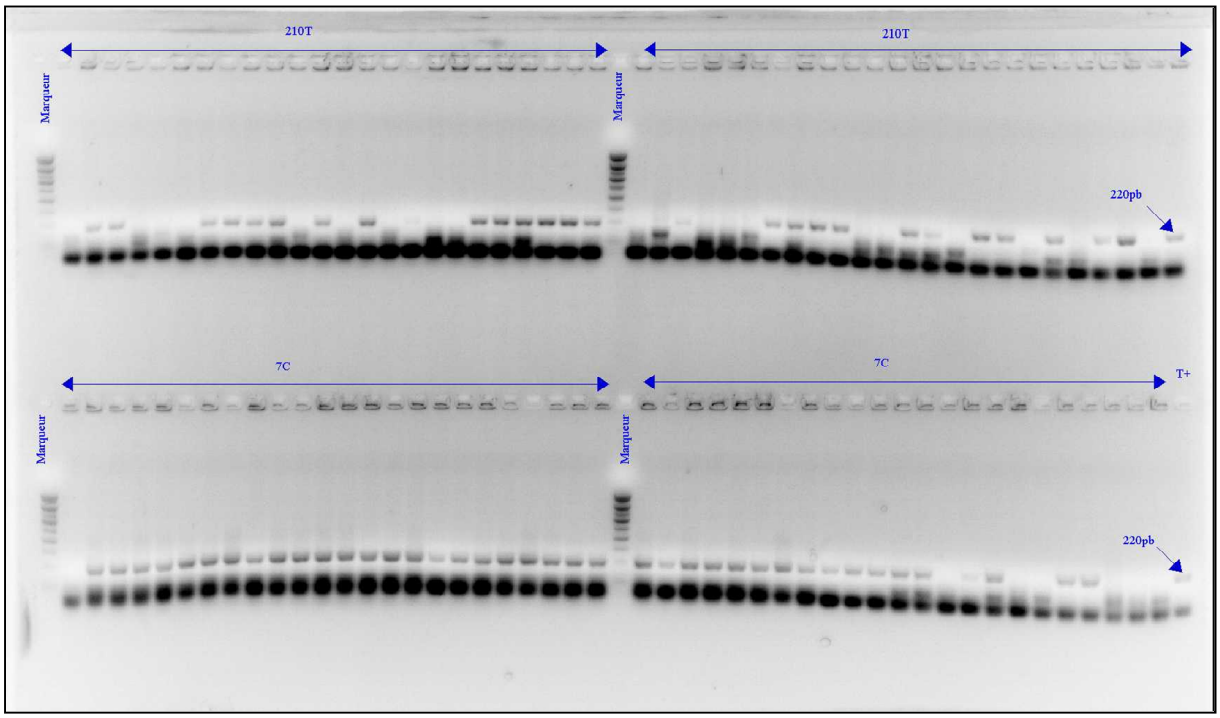


Figure 68 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des clones transformés. Après clonage, les bactéries ont été mise en culture pendant 16 heures dans des boites de Pétri. Un screening sur les clones ayant poussés a été effectué pour sélectionner les clones positifs. La migration sur gel des produits de la PCR montre les clones positifs (présence d'une seule bande à 220pb). T+ témoin positif de la PCR, 7C corps du moustique du J0 infecté (sert de référence), 210T: tête du moustique du J15 infecté.

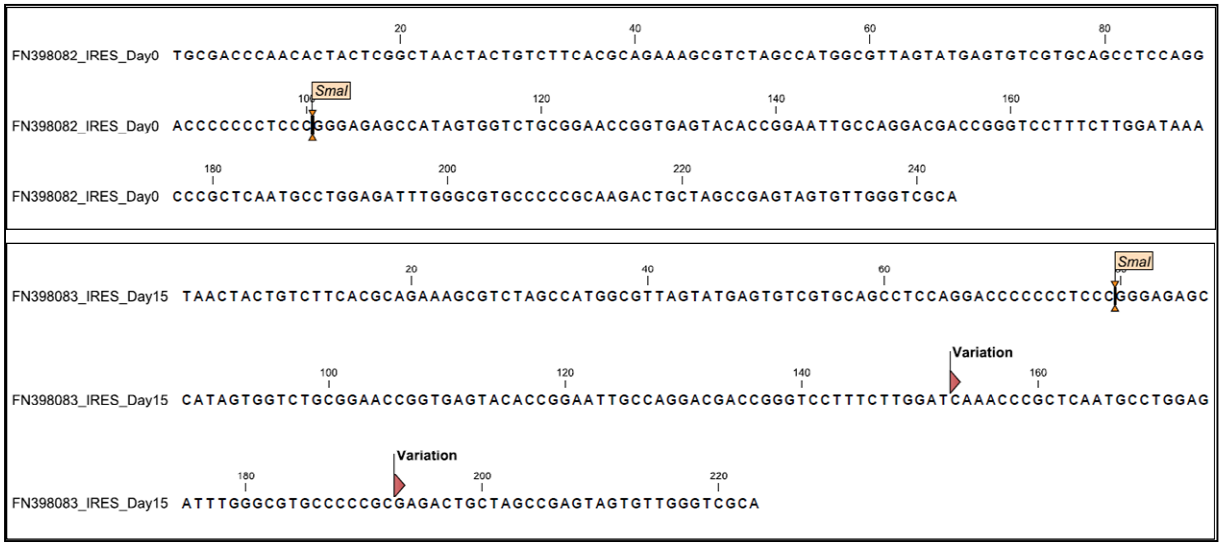


Figure 69 : Séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de l'IRES à J0 et J15 après infection. Les numéros commençant par FN sont les numéros d'accès dans les banques.

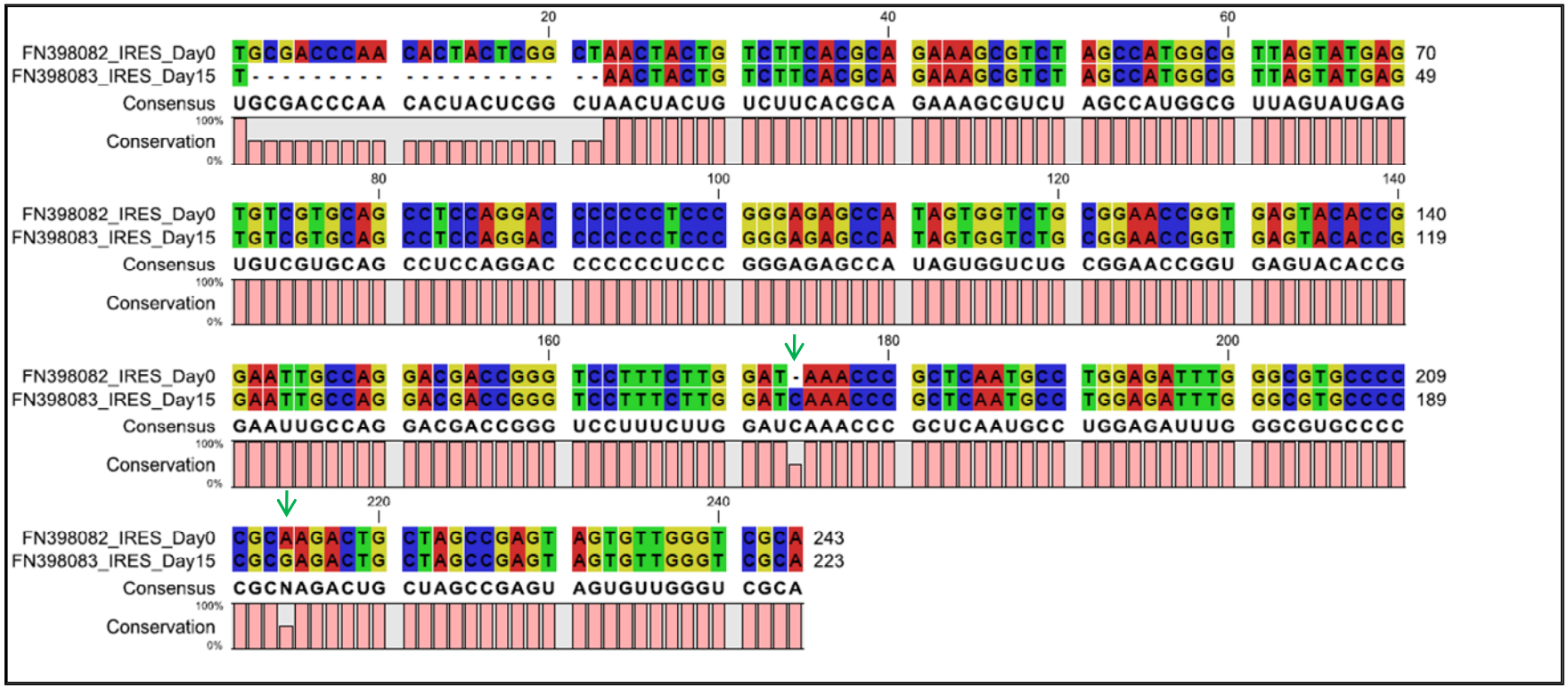


Figure 70 : Alignement des séquences consensus en nucléotides obtenues sur les fragments clonés de l'IRES à J0 et J15 après infection. Les numéros commençant par FN sont les numéros d'accès dans les banques. Le degré d'homologie entre les deux séquences est schématisé par un graphique sous chaque ligne d'alignement. Les flèches indiquent les positions des mutations : C/A 243 et D203 U.

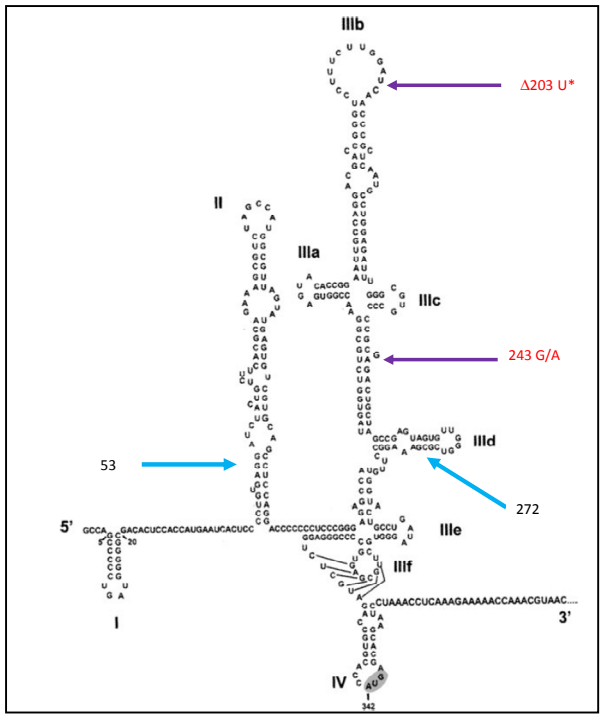


Figure 71 : Structure tridimensionnelle de l'IRES du VHC montrant les positions des mutations apparues à 15 jours après infection. Les mutations C/A 243 et D203 U sont indiquées par des flèches violettes. Sont indiquées également, par des flèches bleues, les positions des amorces sens et anti-sens délimitant la région amplifiée.

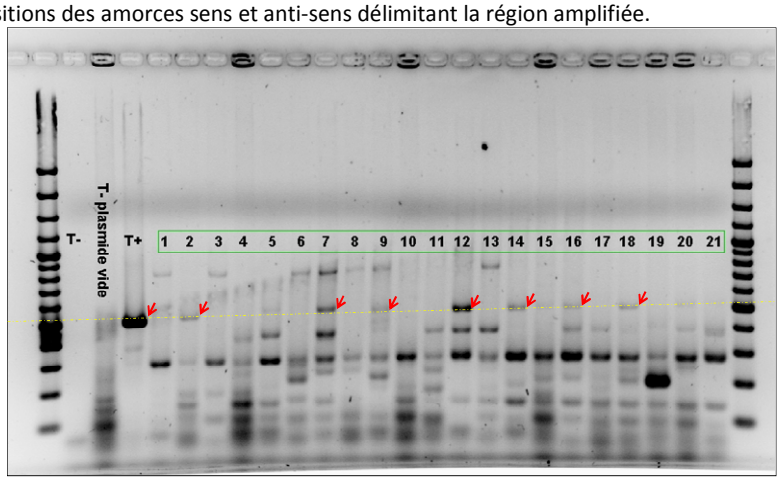


Figure 72 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des colonies ayant intégré la séquence amplifiée par le couple d'amorces 7a-f / 7a-r. Le rendement de clonage à partir des produits de WTA est très faible. Seuls quelques clones (désignés par les flèches rouges) ont *a priori* intégré la séquence d'intérêt. La ligne jaune en pointillés désigne le niveau horizontal de migration.

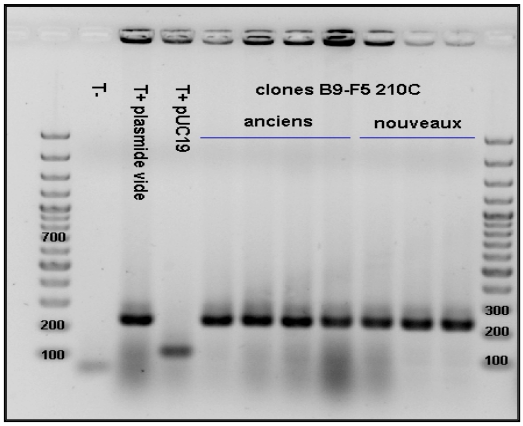


Figure 73 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des clones ayant intégré les séquences amplifiées par le couple d'amorces 7a-f / 7a-r (B9-F5) en utilisant les amorces M13 R/F. Les bandes amplifiées ont toutes la même taille, c'est la taille du vecteur vide. Test effectué deux fois (anciens clones et nouveaux clones) qui pose le problème de clonage des produits amplifiés par la WTA. T+ : témoin positif, T- : témoin négatif (clone vide).

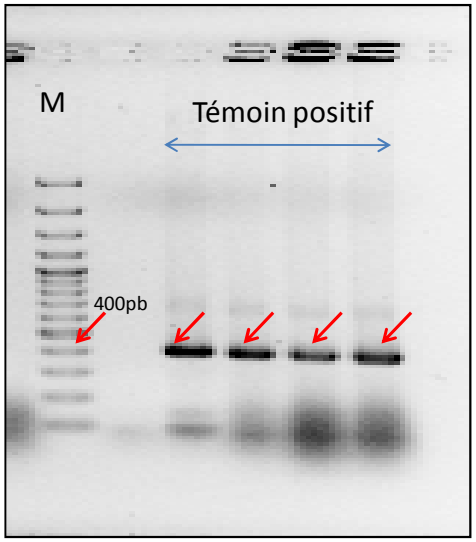


Figure 74 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits amplifiés par PCR en utilisant les amorces PR1 et PR2. Le clonage à partir de n'importe quel échantillon n'ayant pas été amplifié par WTA fonctionne normalement. M: marqueur de poids moléculaire.

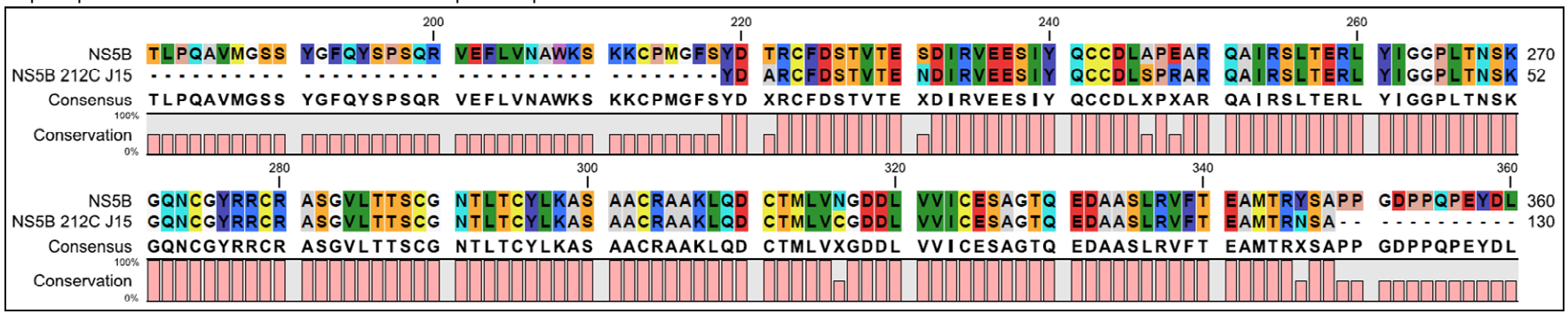


Figure 75 : Alignement de la séquence en acides aminés d'un fragment de la NS5B obtenu dans un moustique à 15 jours après infection par le VHC. La séquence d'acides aminés du fragment obtenu à partir du moustique du J15 est alignée avec une séquence de la littérature (NS5B). Le degré d'homologie entre les deux séquences est schématisé par un graphique sous chaque ligne d'alignement.

Tableau 31 : Résultats de l'expérience 4

Expérience 4				
Espèces de moustiques testées		***Ae. vexans***		
Méthode de détection		**qRT-PCR**		**HCV-GA**
Prise d'essai au jour J		**0**	**30**	**30**
Total		**7**	**42**	**12**
Nombre de positifs	**Têtes**	2	0	4
	Corps	5	1	8
Pourcentages	**Têtes**	28,6	0	33,33
	Corps	71,4	2,4	66,67

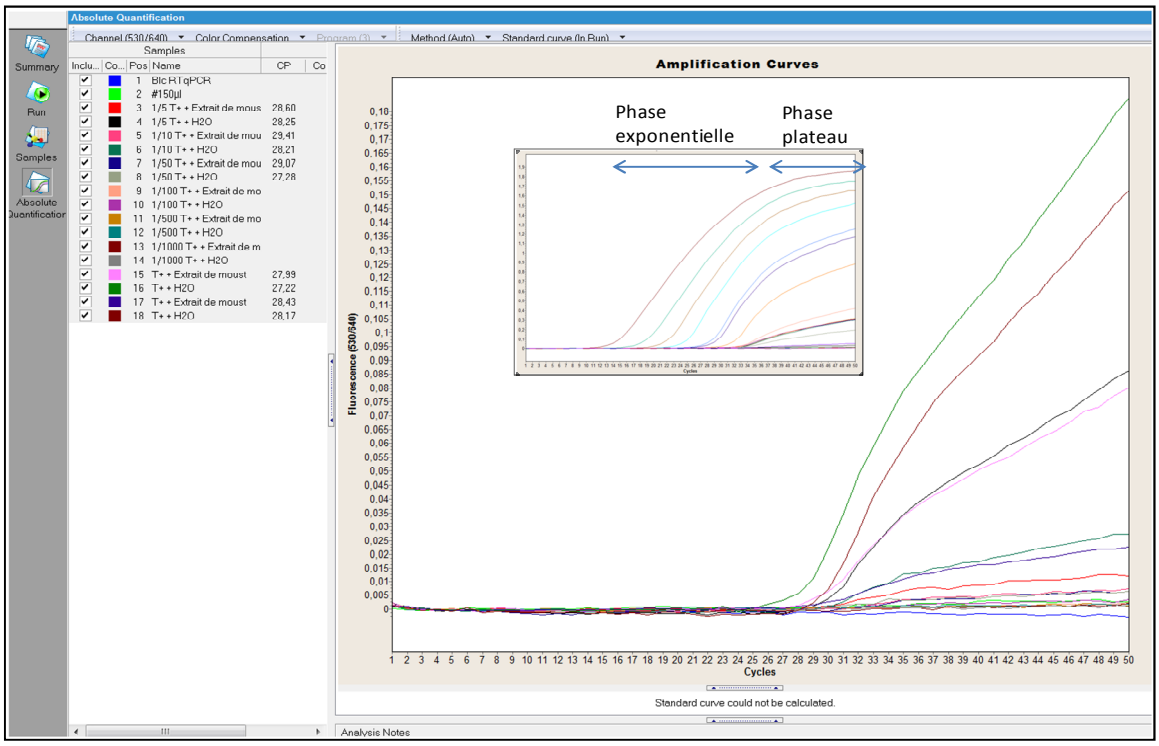


Figure 76 : Estimation de l'effet inhibiteur de l'extrait de moustiques sur la détection de l'ARN du VHC (région 5' non codante) par qRT-PCR. L'extrait d'ARN de sérum VHC-positif a été mélangé en différentes proportions avec de l'extrait d'ARN de moustiques VHC-négatifs *versus* avec de l'eau. L'extrait d'ARN de moustiques a un effet négatif sur la détection de l'ARN du VHC, cet effet est d'autant plus important que l'extrait de moustique est concentré ou que l'extrait d'ARN viral est dilué. Le profil d'amplification ne donne pas de courbe exponentielle, ce qui traduit une amplification non efficace. Le profil d'une amplification efficace est montré dans le petit cadran à titre démonstratif : on y distingue bien la partie linéaire correspondant à la phase exponentielle d'amplification et le plateau.

iv. Infection expérimentale 2009 (*cf.* Tableau 31)

L'infection expérimentale réalisée sur les moustiques *Ae*. *vexans* d'élevage a montré que ces derniers étaient beaucoup plus résistants aux conditions de laboratoire et résistaient plus longtemps après le gorgement (>30 jours) que les moustiques sauvages (ceux-ci atteignaient très difficilement 15 jours). Toutefois, dans cette expérience, tous les moustiques à J0, qui avaient gorgé du sang virémique, n'étaient pas détectés positifs pour l'ARN du VHC contrairement aux expériences précédentes. En effet, seuls 71% des corps étaient positifs (détections réalisées par qRT-PCR). Certains moustiques à J30 ont été trouvés positifs ; en revanche, pour d'autres, le signal n'était ni assez fort pour être considérés positifs, ni assez faible pour être considérés négatifs, ces échantillons ont été considérés comme douteux.

- Test de l'effet inhibiteur des extraits d'ARN de moustiques sur la qRT-PCR

Ce test réalisé sur des témoins positifs (ARN extrait du sérum HCV+) avec ou sans ajout d'extrait d'ARN de moustiques a montré que la présence de l'extrait de moustique avait un effet négatif sur l'amplification, cet effet est d'autant plus important que l'ARN du VHC est dilué (*cf.* Figure 76).

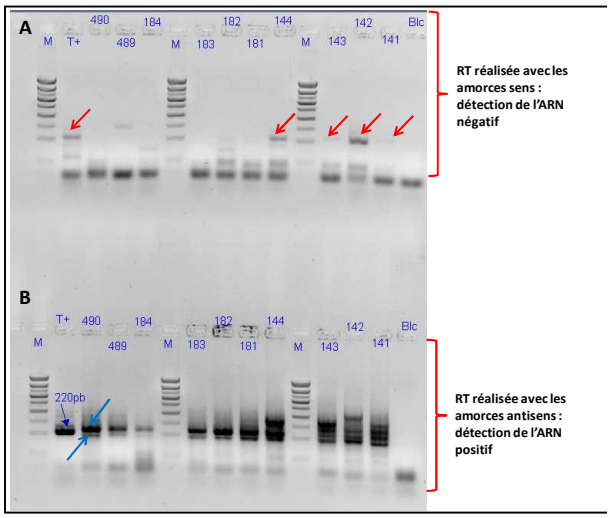


Figure 77 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC par RT-PCR en deux étapes. (A) Les extraits d'ARN des échantillons sont d'abord rétro-transcrits en utilisant les amorces sens (pour détecter l'ARN anti-sens négatif), une amplification par PCR est ensuite réalisée sur 5µl de l'ADNc synthétisé. De l'ARN anti-sens a été détecté dans les têtes des moustiques à J0 (échantillons #141 et #143). Les corps de ces moustiques contiennent également de l'ARN négatif du VHC (échantillons #142 et #144). (B) Les extraits d'ARN des échantillons sont d'abord rétro-transcrits en utilisant les amorces anti-sens (pour détecter l'ARN sens positif), une amplification par PCR est ensuite réalisée sur 5µl de l'ADNc synthétisé. L'amorce anti-sens s'hybride de façon non spécifique sur des ARN provenant du moustique ce qui donne des bandes supplémentaires ayant relativement la même taille (désignées par des flèches bleues) par rapport au témoin positif de RT-PCR composé d'ARN du sérum. Blc: témoin négatif de RT-PCR, M: marqueur de poids moléculaire. #141 et #143 : têtes des moustiques à J0, #142 et #143 : corps des moustiques à J0, #181 et #183 : têtes des moustiques témoins négatifs à J0, #182 et #184 : corps des moustiques témoins négatifs à J0, #489: tête d'un moustique à J30, #490: corps d'un moustique à J30, T+: sérum témoin positif de RT-PCR.

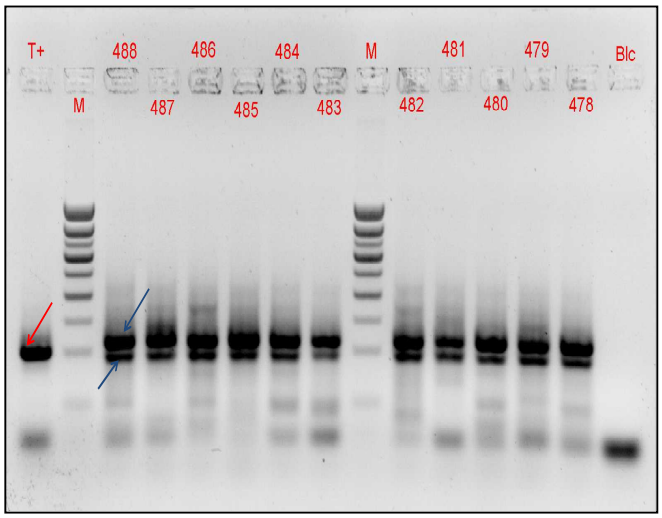


Figure 78 : Mise au point de la détection de l'ARN du VHC par RT-PCR en deux étapes. Les ARN extraits des échantillons à J30 (#478 à #488) sont rétro-transcrits en utilisant les amorces anti-sens (pour détecter l'ARN sens positif), une amplification par PCR est ensuite réalisée sur 5µl de l'ADNc synthétisé. Deux bandes sont présentes à chaque fois pour tous les échantillons, elles ont relativement la même taille (désignées par des flèches bleues) par rapport au témoin positif de RT-PCR composé d'ARN du sérum (flèche rouge: bande attendue). Blc: témoin négatif de RT-PCR, M: marqueur de poids moléculaire. T+: sérum témoin positif de RT-PCR.

- RT-PCR en deux étapes améliore la détection de l'ARN du VHC

Le fait de réaliser l'étape de RT séparément dans les conditions décrites dans le chapitre matériel et méthodes nous a permis d'augmenter la quantité d'ADNc produite, et donc le rendement de la PCR (*cf.* Figure 77 et Figure 78). La RT-PCR en deux étapes, s'est révélée très puissante ; en effet, nous sommes arrivés à détecter le brin négatif de l'ARN du VHC dans les têtes de moustiques à J0 (résultat confirmé également par qPCR *cf.* Figure 79). Cependant, ce protocole favorisait des hybridations non spécifiques : l'amorce anti-sens utilisée (1TS) s'hybridait également sur des séquences du génome du moustique puisque nous obtenions des bandes amplifiées aussi bien chez les moustiques infectés que les moustiques non infectés. Ces séquences non souhaitées (2) avaient quelques nucléotides différents l'une de l'autre et migraient quasiment à la même distance que la bande spécifique attendue (*cf.* Figure 80). Afin de confirmer qu'il s'agissait bien de séquences de moustiques nous avons séquencé d'une part le produit PCR, et d'autre part, les séquences extraites à partir du gel et purifiées. Les résultats étaient surprenants : les séquences obtenues à partir des bandes découpées et purifiées appartenaient au génome du moustique. D'autre part, le « blast » de l'amorce anti-sens 1TS vis-à-vis de la séquence d'*Ae. aegypti* a confirmé cette hybridation avec le génome du moustique (18/21 ntd avec 100% d'appariement). En ce qui concerne les séquences obtenues à partir du produit de PCR, le séquençage a révélé la présence de la séquence ciblée chez le VHC (*cf.* Figure 81, Figure 82 et Figure 83).

- HCV-GA

Cette hybridation « parasite » nous a poussés à utiliser d'autres amorces pour la détection de l'ARN viral. Par ailleurs, pour pouvoir séquencer le maximum du génome viral, il faudrait rétro-transcrire différentes régions du génome viral ; pour cela, il a fallu choisir plusieurs amorces anti-sens. Parmi toutes les amorces décrites dans la littérature, nous avons sélectionné 17 amorces anti-sens qui avaient le moins de chance de s'hybrider avec le génome d'*Aedes aegypti* et le génome humain. La sélection a été réalisée en utilisant un outil bioinformatique qui permet d'effectuer de multiples Blast à la fois (cet outil est disponible sur le lien : http://www.ensembl.org/index.html) (*cf.* Tableau 8). L'ADNc synthétisé a été ensuite amplifié par la polymérase Phi29 (la même enzyme utilisée pour l'amplification des ADNc dans le protocole de la WTA). Le test de validation de cette nouvelle

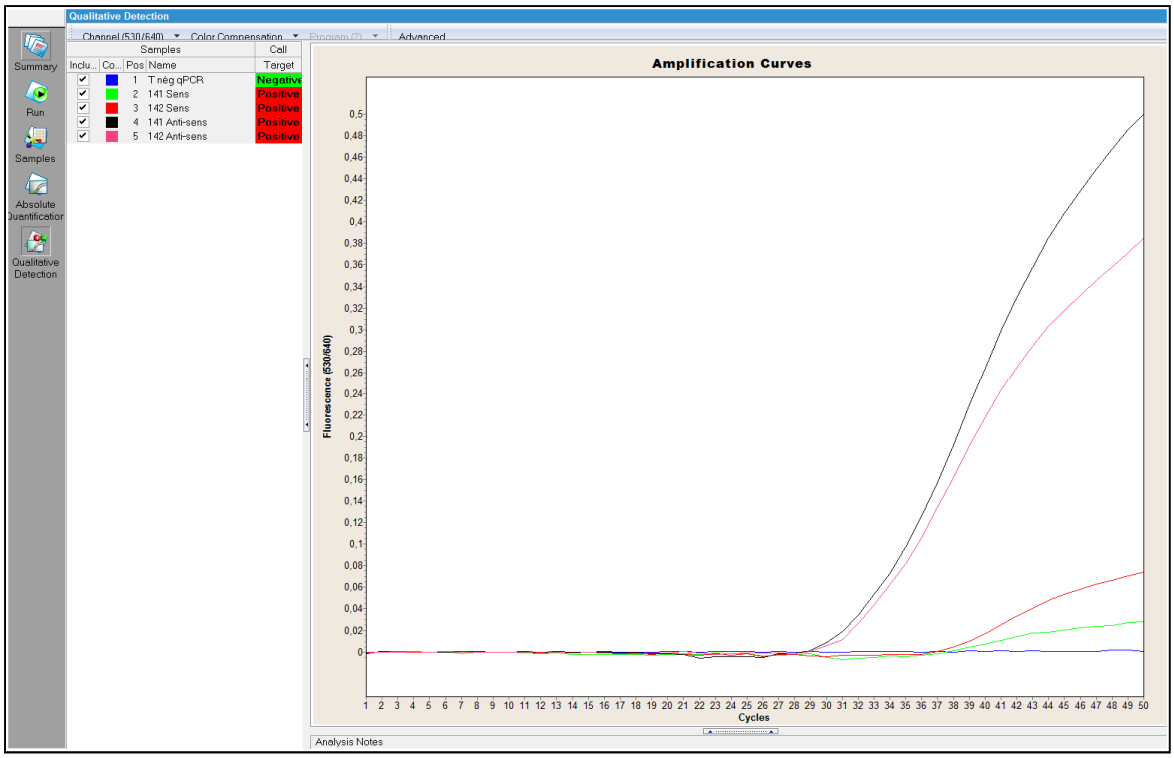


Figure 79 : Confirmation de la présence d'ARN viral négatif dans les échantillons à J0 par RT-qPCR en deux étapes. L'ARN extrait d'une tête et d'un corps à J0 sont rétro-transcrits en utilisant les amorces sens et anti-sens puis amplifiés par qPCR. Ces échantillons sont tous positifs, les ADNc synthétisés en utilisant les amorces anti-sens sont détectés plus tôt, donc contiennent plus d'ARN du VHC.

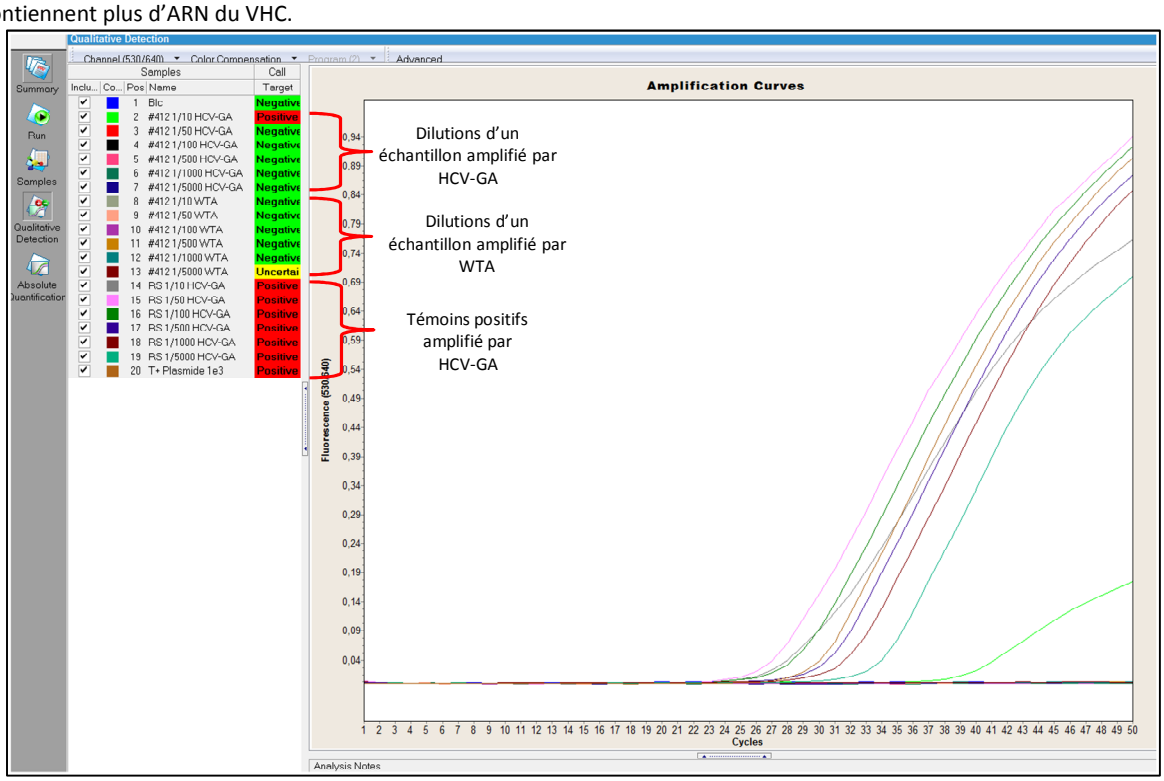


Figure 80 : Mise au point de la WTA spécifique au VHC (HCV-GA) et détection de l'ARN viral. Le témoin positif ainsi qu'un échantillon à J30 (corps #412) ont été amplifiés par HCV-GA et /ou et par WTA (voir matériel et méthodes). La détection du génome du VHC est ensuite effectuée sur les produits issus de cette amplification. Le témoin positif de HCV-GA est détectable de la dilution 1/10 jusqu'à la dilution 1/5000 preuve qu'une amplification a eu lieu. À la dilution 1/10, l'échantillon #412 est détecté positif pour le génome du VHC par HCV-GA. L'amplification par la WTA n'a pas réussi à détecter le génome du VHC dans le même échantillon. Blc: Témoin négatif de HCV-GA, T+: témoin positif de qPCR, RS: repas sanguin.

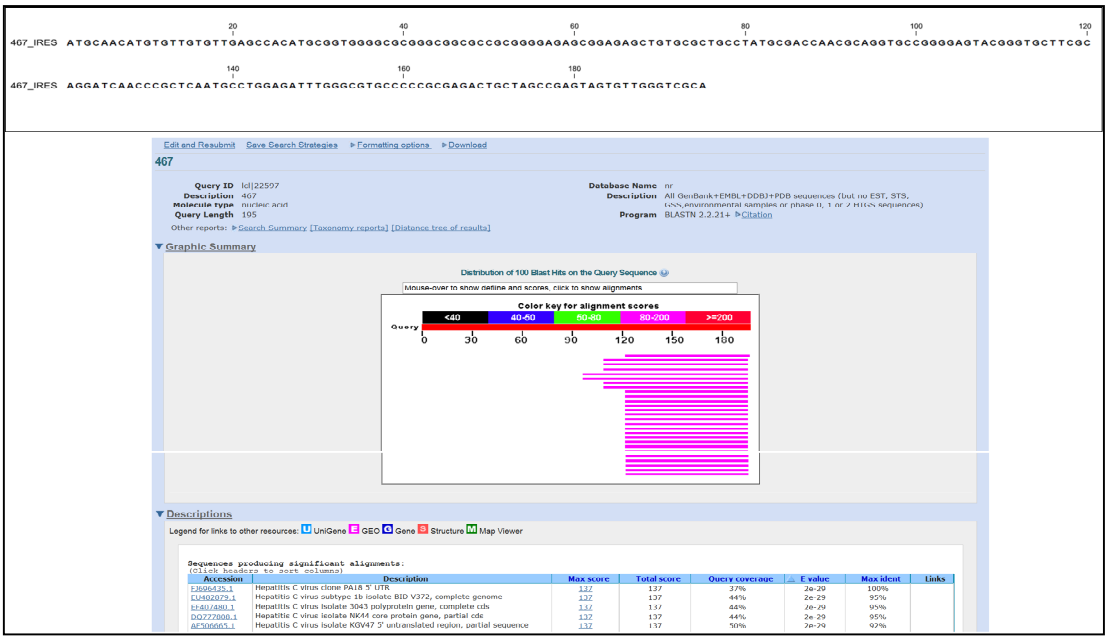


Figure 81 : Confirmation par séquençage de la présence d'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par RT-PCR. Le produit de la RT-PCR de l'échantillon #467, tête d'un moustique à J30 infecté, a été séquencé dans les deux sens. Le résultat de blast contre la toute les séquences nucléotidiques de la banque de séquences a révélé que ces séquences appartiennent au VHC (région 5' non codante). La séquence n'a pas été lue en entier (220pb), néanmoins, la E value est extrêmement faible (2e-29).

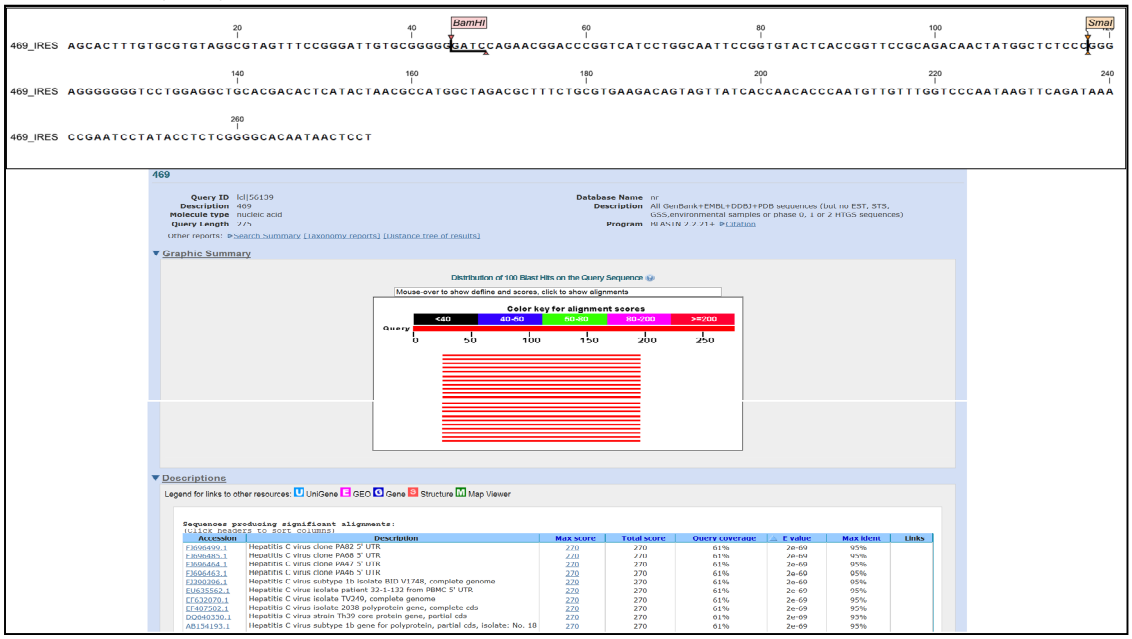


Figure 82 : Confirmation par séquençage de la présence d'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par RT-PCR. Le produit de la RT-PCR de l'échantillon #469, tête d'un moustique à J30 infecté, a été séquencé dans les deux sens. Le résultat de blast contre la toute les séquences nucléotidiques de la banque de séquences a révélé que ces séquences appartiennent au VHC (région 5' non codante). La séquence a été lue en entier (220pb) avec une E value est extrêmement faible (2e-69).

Figure 83 : Confirmation par séquençage de la présence d'ARN du VHC dans les échantillons amplifiés par RT-PCR. Le produit de la RT-PCR de l'échantillon #471, tête d'un moustique à J30 infecté, a été séquencé dans les deux sens. Le résultat de blast contre la toute les séquences nucléotidiques de la banque de séquences a révélé que ces séquences appartiennent au VHC (région 5' non codante). La séquence n'a pas été lue en entier (220pb), néanmoins, la E value est extrêmement faible (au moins 3e-37).

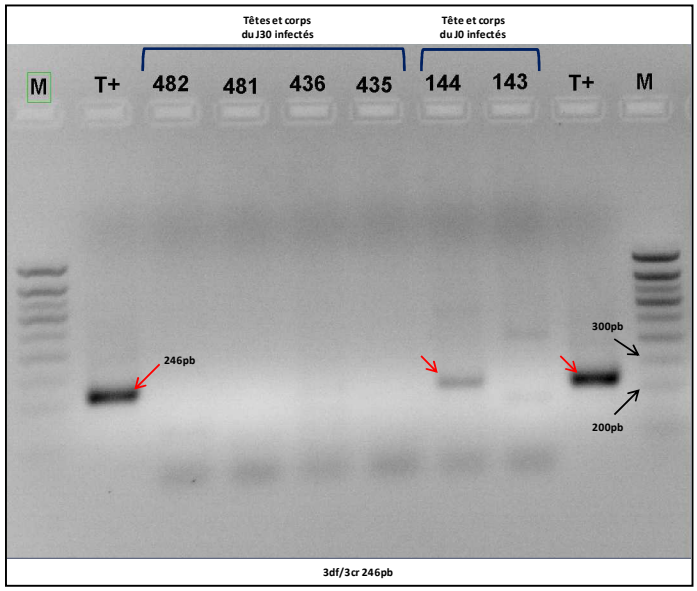


Figure 84 : Détection de l'ARN du VHC après HCV-GA. PCR réalisée sur les produits amplifiés par HCV-GA, les couples d'amorces utilisés sont 3df-3cr pour amplifier une séquence de 246pb. Les échantillons testés sont : #143 et #144 respectivement tête et corps d'un moustique à J0 infecté (témoin positif d'infection), #435 et #436 respectivement tête et corps d'un moustique du J30 infecté, #481 et #482 respectivement tête et corps d'un moustique du J30 infecté. Une bande spécifique a été détectée dans le corps de l'#144 seulement. M: marqueur de poids moléculaire. T+: témoin positif de PCR (repas sanguin). Flèches rouges: bandes d'intérêt.

technique de détection, HCV-GA, effectué sur un échantillon positif au VHC (repas sanguin) et un échantillon à J30 (échantillon #412) a montré (i) qu'il était possible de détecter de l'ARN du VHC après cette amplification aussi bien dans le témoin positif (repas de sang) que dans l'échantillon du J30 ; (ii) la détection dans le témoin positif était possible sur des dilutions allant au-delà de 1/5000 ; (iii) l'amplification était plus efficace qu'une WTA classique puisque l'échantillon #412 était positif après amplification par HCV-GA mais pas par WTA. Ainsi, cette technique d'amplification discriminante nous a permis de confirmer la présence d'ARN du VHC dans certains échantillons considérés avant comme douteux. Ainsi, parmi les neuf échantillons à J30, nous avons pu détecter à l'aide de cette nouvelle technique de l'ARN viral dans 7 corps et 4 têtes, soit 77,8% et 44,4% respectivement, nous avons confirmé ces résultats par PCR semi-nichées. (*cf.* Figure 85, Figure 86 et Figure 87).

La PCR réalisée avec le couple d'amorces 3df/3cr (*cf.* Tableau 32), a permis d'obtenir une bande de 246pb pour le témoin positif par HCV-GA et par PCR (repas de sang) ainsi que pour l'échantillon #144 (corps d'un moustique (infecté) à J0) (témoin positif d'infection confirmé par qRT-PCR). La tête du même moustique, #143, ainsi que d'autres échantillons du J30 infectés (#435/#436 et #481/#482) étaient négatifs (*cf.* Figure 84).

La PCR réalisée avec le couple d'amorces 3ef/3er (*cf.* Tableau 32), a permis d'obtenir une bande de 391pb pour le témoin positif de HCV-GA et de PCR (repas de sang) ainsi que pour l'échantillon #428, corps d'un moustique (infecté) à J30 ; l'échantillon (infecté) #482 à J30 était négatif (*cf.* Figure 85). Une PCR semi-nichée a été réalisée pour vérifier si la séquence produite était bien celle du VHC. Cette PCR réalisée avec le couple d'amorces 4af/3er produit une séquence à la taille attendue (265pb) pour les échantillons #427 et #428, respectivement tête et corps d'un moustique à J30 infecté, aucune bande n'a été détectée dans le cas de l'échantillon #454 corps d'un moustique à J30.

La PCR réalisée avec le couple d'amorces 1cf/1cr (*cf.* Tableau 32), a permis d'amplifier une séquence de 482pb, une bande de cette taille a été obtenue pour le témoin positif d'infection (corps d'un moustique à J0 infecté) ainsi que pour l'échantillon #404 (corps d'un moustique infecté du J30) mais pas pour la tête du même moustique (#403) ce qui confirme

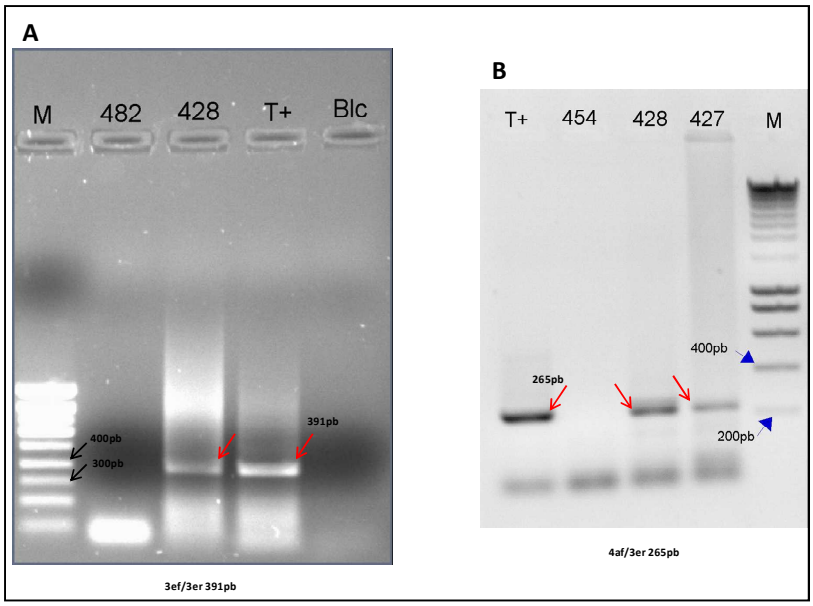


Figure 85 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% montrant la détection de l'ARN du VHC après HCV-GA. PCR réalisées sur les produits amplifiés par HCV-GA. À gauche (fig. 45A) : amplification d'une séquence de 391pb par le couple d'amorces 3ef-3er. L'échantillon #482 présente une bande à la taille attendue comparée au témoin positif. À droite (fig. 45B) : PCR semi-nichée de confirmation réalisée sur les produits purifiés de la PCR de la figure 47A, en utilisant le couple d'amorces 4af/3er. Les échantillons #427 et #428 respectivement tête et corps d'un moustique à J30 présentent une séquence à la taille attendue de 265pb. Aucune bande n'a été obtenue pour l'échantillon #454 corps d'un moustique à J30. M: marqueur de poids moléculaire. T+: témoin positif de PCR. Flèches rouges: bandes d'intérêt.

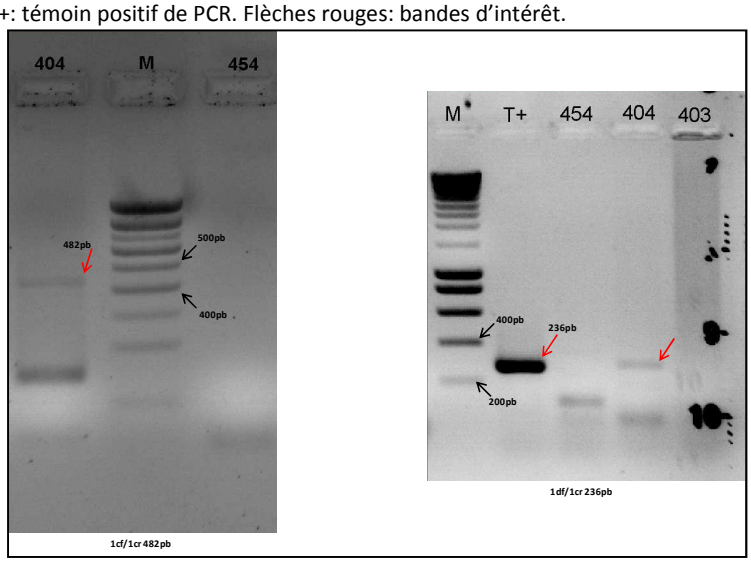


Figure 86 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% montrant la détection de l'ARN du VHC après HCV-GA. PCR réalisées sur les produits amplifiés par HCV-GA. À gauche : amplification d'une séquence de 482pb par le couple d'amorces 1cf-1cr. L'échantillon #404 présente une bande à la taille attendue. À droite : PCR semi-nichée de confirmation réalisée sur les séquences obtenues dans la PCR de gauche avec le couple d'amorces 1df-1cr. L'échantillon #404 corps d'un moustique à J30 présente une séquence à la taille attendue de 236pb. Aucune bande n'a été obtenue pour la tête du même moustique ni pour l'échantillon #454 corps d'un autre moustique à J30. M: marqueur de poids moléculaire. T+: témoin positif de PCR. Flèches rouges: bandes d'intérêt.

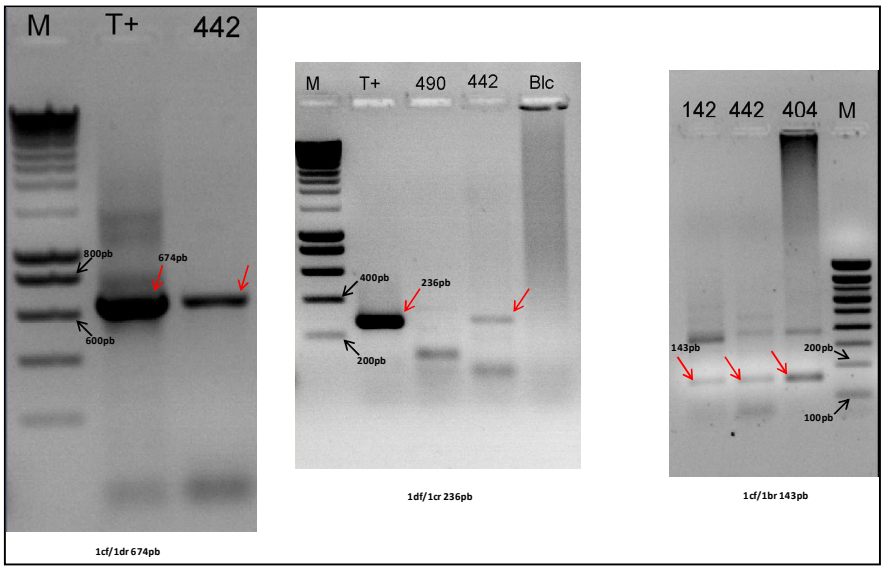


Figure 87 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% montrant la détection de l'ARN du VHC après HCV-GA. PCR réalisées sur les produits amplifiés par HCV-GA. À gauche : amplification d'une séquence de 674pb par le couple d'amorces 1cf-1dr. L'échantillon #442 présente une bande à la taille attendue. Au milieu : PCR nichée de confirmation réalisée sur les séquences obtenues dans la PCR de gauche avec le couple d'amorces 1df-1cr. L'échantillon #442 corps d'un moustique à J30 présente bien la séquence de la taille attendue de 236pb. Aucune bande n'a été obtenue pour l'échantillon #490 corps d'un autre moustique à J30. À droite : PCR semi-nichée de confirmation réalisée sur les séquences obtenues dans la PCR de gauche avec le couple d'amorces 1cf-1br. Les échantillons #404, #442 corps d'un moustique à J30 ainsi que l'échantillon #142 corps d'un moustique à J0 infecté, présentent tous une séquence à la taille attendue de 143pb. T+ : (repas de sang) témoin positif de HCV-GA et de PCR ; M : marqueur de poids moléculaire. Flèches rouges: bandes d'intérêt.

Tableau 32 : Les zones amplifiées du génome du VHC dans les échantillons positifs à 30 jours après infection.

Zone concernée du génome du VHC	Couple d'amorces	Taille de la bande attendue en pb	Numéro de l'échantillon	Confirmation de la séquence par	*Cf.* figure
5'UTR	1TS / 2CH	220	467, 469, 471	Séquençage	Figure 81, Figure 82, Figure 83
5'UTR	1TS / 2CH	220	412	qPCR	Figure 80
C – E1	1c-f / 1c-r	482	404	PCR semi-nichée	Figure 86
C – E1	1c-f / 1d-r	674	442	PCR semi-nichée	Figure 87
C	1c-f / 1b-r	143	442	PCR semi-nichée	Figure 87
E1	1d-f / 1c-r	236	442	PCR semi-nichée	Figure 86
NS3	3e-f / 3e-r	391	428	PCR semi-nichée	Figure 85
NS3	4a-f / 3e-r	265	427, 428	PCR semi-nichée	Figure 85

le résultat obtenu par qRT-PCR ; l'échantillon #454, corps d'un moustique à J30 était négatif pour cette séquence également (*cf.* Figure 86).

La PCR réalisée avec le couple d'amorces 1cf/1dr (*cf.* Tableau 32), a donné une séquence de 674pb, une bande de cette taille a été obtenue pour le témoin positif (repas sanguin) ainsi que pour l'échantillon #442 (corps d'un moustique à J30). Une PCR nichée réalisée avec le couple d'amorces 1df/1cr produit une bande de la taille attendue (236pb) pour les deux mêmes échantillons (T+ et #442), une autre PCR nichée réalisée avec le couple 1cf/1br donne également une bande à la taille attendue (143pb) pour le témoin positif d'infection (#142 corps d'un moustique à J0 infecté) ainsi que deux corps du J30 déjà testés (*cf.* plus haut).

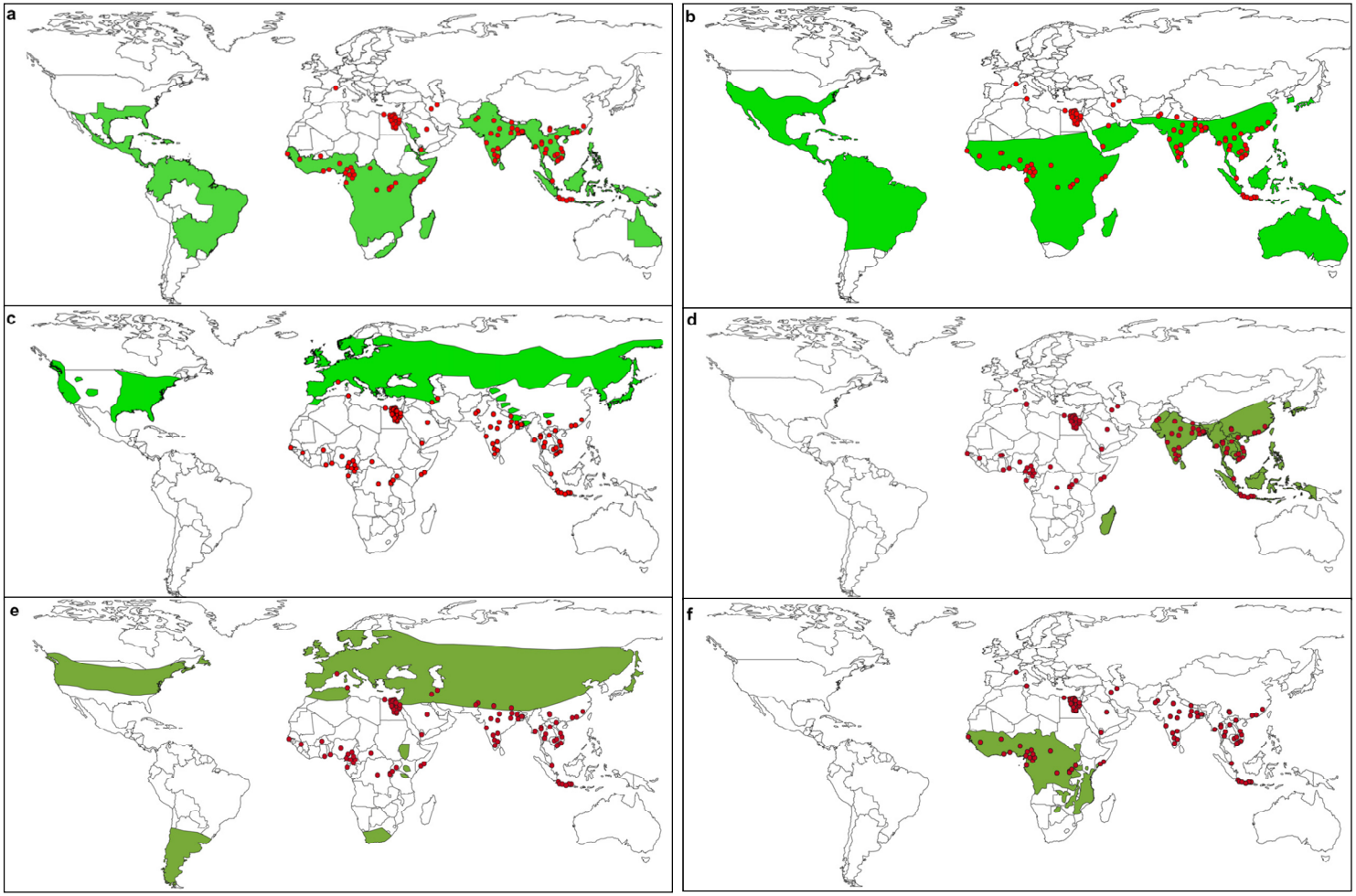


Figure 88 : Superposition de la localisation des souches endémiques du VHC et la distribution de différents vecteurs de maladies. Les cercles rouges montrent les localisations des souches du VHC. Les surfaces vertes montrent la distribution géographique des vecteurs. (a) *Aedes aegypti*, (b) *Culex pipiens quinquefasciatus*, (c) *Ixodes sp*. Vecteur de la maladie de Lyme. (d) *Aedes albopictus*, (e) *Culex pipiens*, (f) Mouches Tsetse (*Glossina sp*.), vecteurs des trypanosomes. Le chevauchement de la localisation des souches endémiques du VHC et les zones de distribution d'*Aedes aegypti*, de *Culex pipiens quinquefasciatus et d'Aedes albopictus*, suggère clairement une relation entre le virus et ces vecteurs, contrairement à d'autres vecteurs tels que *Ixodes sp.* et *Glossina sp.* La distribution géographique des vecteurs a été réalisée selon les données de l'OMS et du CDC.

VIII. DISCUSSION – 2IEME PARTIE

L'origine d'une infection au VHC est inconnue dans au moins 10 % des cas, soit chez 17 millions des personnes infectées par ce virus dans le monde. Certains auteurs ont commencé à imaginer d'autres moyens de transmission du VHC, notamment la possibilité de transmission par les arthropodes. Cette hypothèse suppose évidemment que certains arthropodes puissent être compétents pour le VHC, et établir un cycle viral complet de l'ingestion jusqu'à l'excrétion par les glandes salivaires, pour une transmission horizontale, et/ou vers les œufs pour une transmission verticale. En 2001, notre équipe avait démontré que le VHC pouvait se fixer sur les cellules AP61 (cellules de larves de moustique *Aedes pseudoscutellaris*) et s'y répliquer (191). Ce travail avait, à l'époque, constitué un argument fort en faveur d'une compétence vectorielle de certains moustiques (*Aedes*) pour le VHC. En effet, certains autres mécanismes de transmission ne peuvent être exclus, par le fait même que les moyens évoqués le plus souvent (toxicomanie, transfusion, sexe) n'apportent pas de réponse quant à la persistance de l'endémicité du VHC à travers les siècles et les continents, ce qui nécessiterait, d'après une étude récente, des mécanismes de transmission ubiquitaires et plus globalement distribués (3). Cette étude, réalisée par l'équipe d'Oliver Pybus à Oxford, est basée sur une approche épidémiologique et mathématique dont le but était d'apporter une explication à la distribution géographique des *Hepacivirus* et leur maintien, d'une part au fil des siècles, et d'autre part au travers des continents (depuis 500 à 2000 ans). Leur conclusion suggère clairement l'implication des arthropodes vecteurs comme moyen plausible de contamination.

Le chevauchement de la localisation des souches endémiques du VHC et les zones de distribution de certains vecteurs, montré par la Figure 88, soutient fortement l'hypothèse d'une transmission du VHC par des vecteurs tels que *Aedes aegypti* et/ou *Culex pipiens quinquefasciatus* et/ou *Aedes albopictus*. Cependant, la relation virus – vecteur semble être complètement exclue dans le couple VHC – *Ixodes sp.* D'autre part, l'absence de chevauchement des zones de distribution du VHC et de *Culex pipiens* fourni un bel exemple de la spécificité de la relation virus – vecteur. Nos expériences ont d'ailleurs confirmé que le VHC ne se répliquait pas dans *Culex pipiens.*

Nous apportons *via* ce travail de thèse les preuves directes de la réplication du VHC au sein de certaines espèces de moustiques après plusieurs séries d'infections expérimentales. La mise au point du protocole de détection fut primordiale pour pouvoir affirmer ou infirmer la présence du génome viral dans un échantillon. Le protocole général de détection du génome du VHC dans le moustique a fait l'objet d'un brevet qui est attaché à la fin de ce manuscrit (204) (*cf.* annexes).

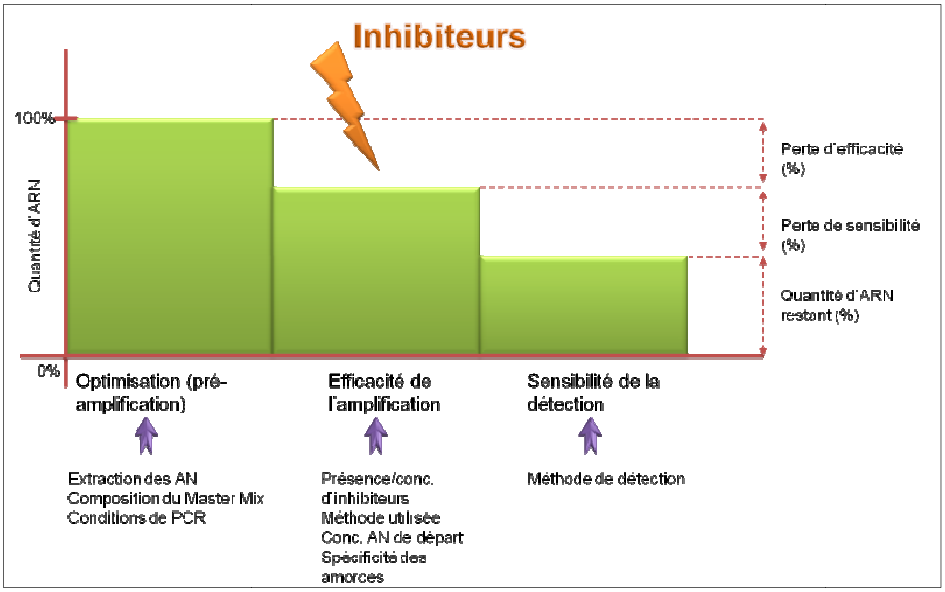


Figure 89 : Paramètres optimisés pour la détermination du seuil de détection de l'ARN du VHC. A chaque étape du protocole de détection correspond une efficacité et à chaque appareil une sensibilité qui doivent être optimisées. AN : acides nucléiques.

1. Comme il s'agissait de matériels complexes (ARN viral, en présence de tissus de moustique, de globules rouges de mammifères (lapin ou mouton) et des différents composants présents au niveau du sérum humain servant d'inoculum), la détection et la quantification de l'ARN se sont révélées très délicates. Ainsi, en utilisant différents tests d'extraction, de détection et de quantification, nous avons constaté que le seuil de sensibilité pour la détection du transcrit était quatre fois plus élevé que celui du sérum HCV+, et prés de vingt fois plus élevé que celui d'un extrait de moustique HCV+ (transcrit + extrait d'ARN total du moustique). Le seuil de détection de l'ARN viral dans l'extrait d'un moustique infecté s'est révélé *a fortiori* encore plus haut. Par ailleurs, cet effet n'est pas linéaire, et on ne peut pas dissocier les quantités d'ARN provenant du moustique et celles provenant du virus. Il faudra noter aussi que l'effet inhibiteur de certains composants, présents au sein de ces milieux, n'est pas le seul responsable de la perte de sensibilité ; il faudra ajouter l'efficacité du broyage, l'efficacité de l'extraction, l'efficacité de la RT et enfin celle de la PCR (*cf.* Figure 89). En résumé, pour que l'ARN viral puisse être détecté, il faut que le seuil de sensibilité de la méthode soit supérieur à la somme de toutes les pertes qu'il subit. Le recours à des méthodes d'amplification plus puissantes telles que le WTA a été fait, dans le but de compenser ces pertes ; cependant, la complexité du milieu et le caractère aléatoire de la méthode font que l'amplification touche principalement les molécules d'ARN les plus abondantes, au détriment des moins abondantes ; d'où la nécessité de rajouter une étape de discrimination. La technique HCV-GA est une variante de la technique WTA, qui a pour but d'orienter l'amplification vers les fragments d'intérêt, dans la mesure où les amorces utilisées pour la rétro-transcription sont spécifiques et contribuent ainsi à l'enrichissement du milieu en ADNc d'intérêt par rapport à la population globale d'ARN.

2. Le choix du génotype viral (inoculum), ainsi que de la souche de moustiques à utiliser, a été dicté par leur disponibilité. En effet, l'infection par le VHC de génotype 1b est la plus fréquente en France, et les moustiques des genres *Aedes* (*Aedes (Ochlerotatus) caspius* Pallas 1771, *Aedes (Aedimorphus) vexans* Meigen 1830) et *Culex* sont très abondants dans le sud de la France, notamment au niveau du littoral méditerranéen (domaine de la Tour du Vallat, Camargue) (205).

3. Lors de la première expérience, nous avons réussi à détecter le génome du VHC par RT-PCR en point final dans des *Ae. vexans* à 21 jours post-infection (JPI). Ceci montre que (i) d'une part le génome viral a pu persister dans le moustique pendant tout ce temps et que (ii) d'autre part, il était possible de le déceler par simple RT-PCR. Afin de confirmer ce résultat, nous avons entrepris d'autres séries d'infections mais nous étions à chaque fois confrontés à la difficulté de maintenir les espèces sauvages confinées dans des cages plus de 15 jours. Néanmoins, avec le peu d'individus testés lors de la seconde infection expérimentale, nous avons pu confirmer par qRT-PCR (méthode plus spécifique que la RT-PCR en point final) la présence d'ARN du VHC dans les moustiques à 21 JPI ; de plus, le séquençage d'une région de la RdRp virale a révélé la présence, au niveau de la séquence aminoacide, des mutations suivantes : $Val^{262} \rightarrow Ala^{262}$, $Pro^{265} \rightarrow Ser^{265}$, et $Asn^{316} \rightarrow Asp^{316}$.

Il est actuellement connu que la réplication efficace du VHC passe obligatoirement par une série de modifications au niveau de la structure primaire de son génome. Ces mutations touchent à la fois les gènes codant pour les protéines structurales et les gènes codant pour les protéines non structurales du VHC. De telles mutations, dites d'adaptation, s'accumulent au cours des cycles de réplication du virus et aboutissent à la génération de particules virales de mieux en mieux adaptées au système dans lequel elles se répliquent. Ceci a été démontré aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (54-56, 142, 206, 207), toutefois, les mutations qui augmenteront l'efficacité de la réplication dans un système donné (par exemple, le modèle réplicon) ne seront probablement pas les mêmes qui vont augmenter cette même efficacité dans un autre système. Ceci aura pour conséquence la génération de particules VHC spécifiques pour chaque « système » : (i) virus adaptées à la culture *in vitro* dans une lignée cellulaire spécifique, ou bien (ii) virus adaptées à la réplication dans les cellules hépatiques humaines *in vivo* ou dans les lymphocytes B *in vivo* etc.

Des mutations d'adaptation augmentant l'efficacité de réplication de réplicons *in vitro* ont été rapportées dans un travail dont le but était de produire des réplicons chimériques 1b contenant le gène NS5B du génotype 2b du VHC. les mutations relevées ($Thr^{5} \rightarrow Ser^{5}$, $Asn^{24} \rightarrow Ser^{24}$, $Met^{31} \rightarrow Ile^{31}$ et $Leu^{392} \rightarrow Ile^{392}$) ont fait l'objet d'un brevet publié en 2005 par des chercheurs de l'Institut de Recherche en Biologie Moléculaire P. ANGELETTI SPA. (Italie) (208).

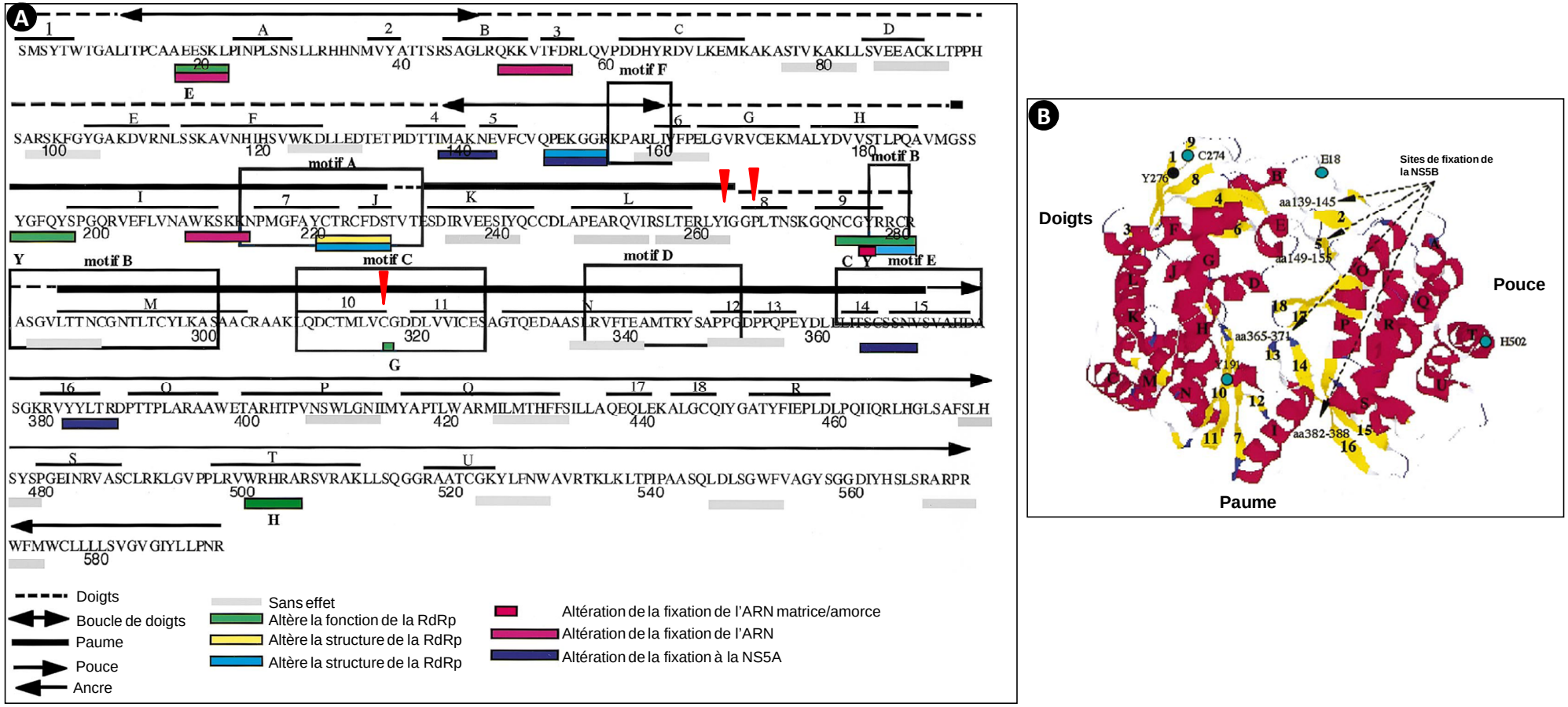


Figure 90 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la NS5B du VHC et des mutations Alanine dirigées. (A) La superstructure, la structure secondaires et les différents phénotypes des mutations de la NS5B de la souche HCV JK-1 sont désignés par des symboles au-dessous de la séquence linéaire. Les motifs connus de la polymérase, notés A à F, sont encadrés. Les numéros au-dessus de la séquence linéaire se réfèrent à l'hélice α et les lettres aux feuillets β. Les positions des trois mutations que nous avons identifiées sont désignées par des triangles rouges. (B) Structure tridimensionnelle de la RdRp du VHC. Les feuillets β sont colorés en jaune et les hélices α sont colorées en rouge et numérotés par des chiffres ou des lettres majuscules à partir de l'extrémité N terminale.

Les recherches dans les bases de données spécialisées (http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/ et http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/variability/HCV_variability.html) ont montré que les mutations identifiées dans le cadre de notre travail (Val^{262}→Ala^{262}, Pro^{265}→Ser^{265}, et Asn^{316}→ Asp^{316}) n'avaient jamais été décrites auparavant (recherche effectuée parmi plus de 850 séquence de RdRp disponibles). Nous pouvons suggérer que ces mutations pourraient augmenter l'efficacité de la réplication, d'autant plus qu'elles ont été sélectionnées *in vivo*, des études fonctionnelles peuvent être envisagées, dans le but de vérifier cette hypothèse. Les séquences nucléotidique et protéique portant ces mutations ont été déposées dans les bases de données (numéros d'accès FN396931 et CAZ61008 pour les séquences nucléotidiques et aminoacides respectivement), elles constituent aujourd'hui le premier résultat d'une requête de séquence associant le moustique au VHC. Ces mutations font l'objet d'un brevet en cours de publication attaché en annexe (N° provisoire U19-B-27 179 FR).

Du point de vue structurale, la mutation en position 265 se situe au niveau des « doigts » de la polymérase, alors que les deux mutations en positions 262 et 316 se situent au niveau de la « paume » de la RdRp : Plus précisément, la mutation Val262Ala est localisée entre le feuillet β L et l'hélice α 8, la mutation Pro265Ser est localisée au niveau de l'hélice α 8, alors que la mutation Asn316Asp se situe dans le motif C sur l'hélice α 10 à une position en amont du motif critique GDD (*cf.* Figure 90). Du point de vue fonctionnel (fonction putative), ces mutations ne semblent pas altérer la fonction de la polymérase selon des études de mutagénèse dirigée réalisées sur l'ensemble de la séquence de la polymérase (74, 207) (*cf.* Figure 90).

4. La présence de ces mutations ne pourrait être que le résultat de la multiplication du VHC dans les moustiques du genre *Aedes*, car un nombre plus important de moustiques du genre *Culex* testés dans les mêmes conditions se sont révélés constamment négatifs pour la présence du génome du VHC. Une autre preuve de la compétence du genre *Aedes* pour la réplication du VHC a été apportée par la troisième infection expérimentale. Dans cette expérience, nous avons réalisé une cinétique de l'infection de deux espèces d'*Aedes* (*Aedes vexans* et *Aedes caspius*) en sacrifiant les moustiques à différentes dates (0 JPI, 4 JPI, 8 JPI et 15 JPI), et effectué la détection séparément dans la tête et le reste du corps du moustique.

Il est très intéressant de remarquer que l'infection est espèce-dépendante. En effet, à 8 JPI, les deux espèces d'*Aedes* étaient négatives pour la détection du génome du VHC, aussi biendans les têtes que dans les corps (à l'exception d'une tête et d'un corps d'*Aedes caspius* du J4, qui semblent correspondre à du virus résiduel) alors qu'à 15 JPI, l'ARN viral a été détecté dans les moustiques de l'espèce *Ae*. *vexans* seulement, et cette détection ne correspond pas à du virus résiduel pour les raisons suivantes : (i) le virus était détecté dans 4 sur 7 (57%) têtes des moustiques à J15, alors que seulement une tête sur dix (9,1%) était positive à J0 ; ce qui peut traduire une dissémination du VHC depuis le mésentère vers d'autres tissus du moustique, conséquence d'une réplication (*cf.* Figure 28); (ii) différentes zones du génome viral ont pu être amplifiées (~20%) aussi bien à partir des têtes positives que des corps positifs (*cf.* Tableau 26) ; (iii) le séquençage d'une région amplifiée de l'IRES (bien que très conservée entre les différents sous-types) d'un échantillon positif à J15 a montré la présence de mutations (Δ203 U et C/A 243) conservées dans 25 clones, suggérant ainsi des mutations d'adaptation (apparition et multiplication d'une nouvelle quasi-espèce) ou enrichissement d'une quasi-espèce préalablement présente. Dans ces deux cas de figures, ce résultat suggère fortement une réplication virale au sein du moustique, même si l'on considère la notion de la variabilité génétique du VHC, étant donné qu'aucun des 25 clones d'un échantillon positif à J0 (servant de référence) ne contenaient ces deux mutations. En effet, l'analyse des 25 clones permet d'affirmer que l'on a identifié toutes les séquences représentant au moins 8% de la population de la quasi-espèce au risque 5% selon les lois de l'intervalle de confiance.

D'autre part, la position de ces deux mutations au niveau de la structure secondaire de l'IRES (*cf.* Figure 71) montre que les nucléotides concernés (positions 203 et 243) ne sont pas engagés dans une interaction de type Watson – Crick, ce qui pourrait suggérer un rôle particulièrement propice à l'interaction avec le complexe de réplication dans les cellules du moustique. Ces mutations font également partie du brevet en cours de publication attaché en annexe (N° provisoire #0854292 UJF).

Nous avions eu recours dans cette expérience à l'amplification par WTA car la qRT-PCR n'a rien pu détecter, sans doute parce que le délai de 15 jours n'est pas suffisant pour que le virus accomplisse son cycle extrinsèque. En effet, le VHC que nous utilisons pour les infections est d'origine humaine et a sans doute perdu (en partie) sa capacité à se répliquer

chez un hôte différent (moustique), de nombreux cycles de réplication étant nécessaires pour générer la souche (ou les souches) capable(s) de se répliquer de façon stable et efficace au sein du moustique. Cela est d'autant plus difficile que la durée de vie du moustique est courte. La différence relevée entre les corps ARN VHC positifs (85%) et les têtes ARN VHC positives (57%) serait due à la faible quantité de virus dans la tête (inférieure au seuil de détection) par rapport au reste du corps. Concernant le profil de la cinétique de détection, à J0, le génome viral a été détecté dans tous les corps des moustiques infectés (100%), et dans une seule des onze têtes (9,1%), ce qui suggère (i) que le virus serait passé dans le mésentère et (ii) que l'ARN détecté dans la tête proviendrait plutôt de résidus du repas sanguin (restés « collés » sur le versant extérieur de la tête du moustique). Jusqu'à J8 il n'y a pas eu de détection d'ARN VHC (si ce n'est la tête et corps d'*Aedes caspius* à J4 et qui serait du virus résiduel, comme cela été discuté plus haut). Cela correspondrait à une période d'éclipse, durant laquelle le virus est présent à une quantité si faible qu'il ne puisse pas être détectable. La phase d'éclipse se termine lorsque le génome viral a été suffisamment répliqué pour être détectable (209). Un tel phénomène d'éclipse avait également été observé dans les expériences d'infection *in vitro* des cellules AP61 (191). A 15 JPI, le virus (*via* son ARN amplifié) réapparaît, et est alors détecté aussi bien dans les têtes que dans les corps. Ceci pourrait traduire, comme décrit précédemment, une dissémination du mésentère vers d'autres tissus, dont les tissus de la tête. Sur la base de ces résultats, nous avons pu obtenir le profil de la cinétique d'une infection des moustiques du genre *Aedes vexans* par le VHC sur 30 jours, séparément dans les têtes et les corps (expériences 3 et 4) (*cf.* Figure 91). Dans les premières heures suivant le repas de sang virémique, l'ARN du VHC est détecté dans la quasi-totalité des corps (89%) et dans une partie des têtes des moustiques (17%). Après huit jours d'élevage, l'ARN viral devient indétectable aussi bien dans les têtes que les corps du moustique, cette phase correspondrait à la phase d'éclipse virale. A partir du 15ième jour et jusqu'au 30ième jour post-infection, l'ARN du VHC réapparait à la fois dans les têtes et les corps des moustiques avec des taux d'infection de 57% et 85%, respectivement, à J15 et 33% et 67%, respectivement, J30. A ce stade, le virus s'est vraisemblablement répliqué et disséminé dans différents tissus du moustique. Ainsi la période extrinsèque d'incubation (PEI) serait de 15 jours environs (des intervalles d'échantillonnages plus courts seraient nécessaires pour déterminer plus précisément la PEI).

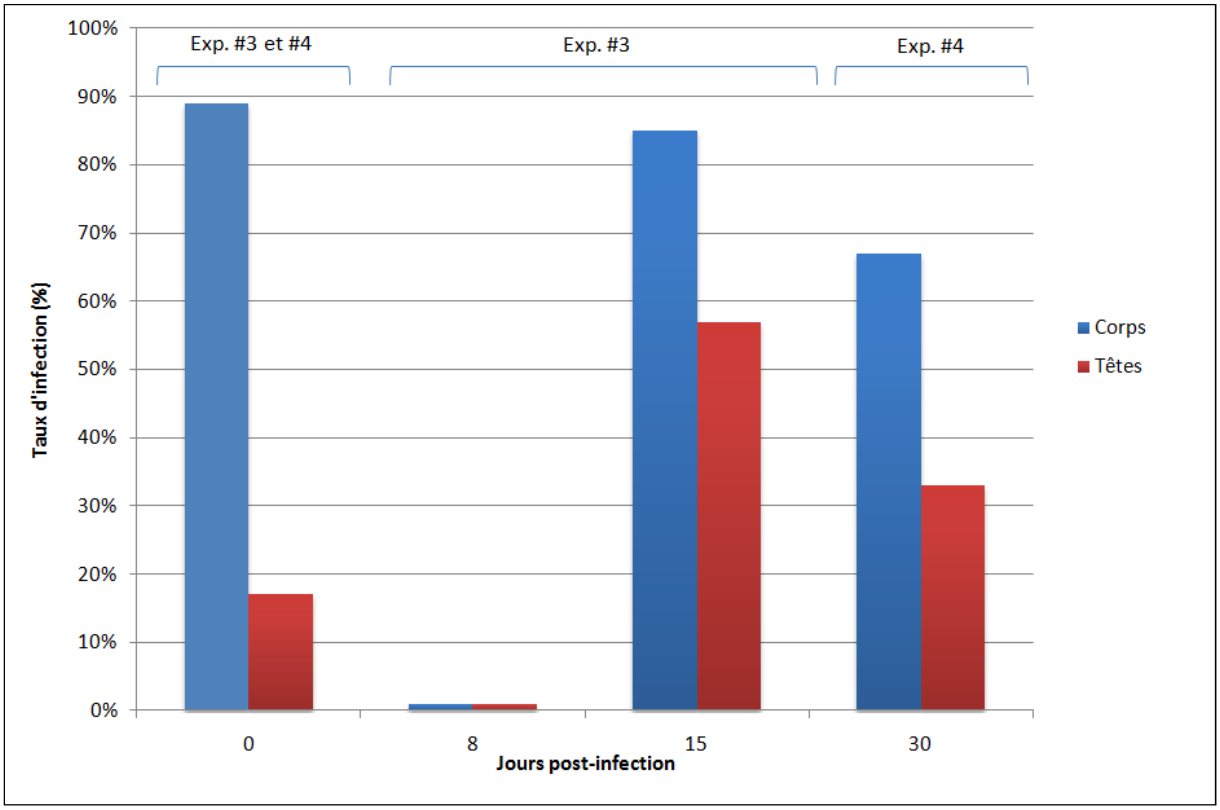


Figure 91 : Cinétique d'infection d'*Aedes vexans* par le VHC. L'infection est suivie de manière cinétique, séparément dans les têtes et les corps des moustiques. Le taux d'infection à J0 considère les échantillons des expériences #3 et #4, ceux du J8 et J15 considèrent les échantillons de l'expérience #3, enfin, ceux du J30 considère les échantillons de l'expérience #4.

Ce résultat est comparable à celui de la durée d'amplification des virus de la Dengue chez *Ae*. *aegypti*, chez qui le virus était retrouvé dans les glandes salivaires à 18 JPI à 24°C. Des périodes d'incubations plus courtes peuvent être observées pour l'amplification du virus du West Nile chez *Culex* (*Culex*) tarsalis Coquillet 1896, ou encore le virus de l'encéphalite japonaise chez (*Culex*) *tritaeniorhynchus* Giles 1901, avec 90% de moustiques positifs après 15 jours d'infection à 26°C, et 100% après 12 jours d'infection à 28°C. De plus, la PEI est étroitement liée à la charge virale dans le repas de sang, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les conditions les plus optimales pour l'amplification (210, 211). La quantité du virus serait plus importante dans les tissus des corps comparée aux tissus des têtes, ce qui expliquerait la différence dans les taux d'infection au niveau des têtes et des corps. Quant à la baisse du taux d'infection du J15 à J30, cela pourrait être dû au fait que le nombre d'échantillons traités est faible et le dénominateur différent. Pour corriger cela, il faudra infecter un nombre plus élevé de moustiques et traiter le même nombre à chaque de prélèvement.

5. L'utilisation de la souche d'élevage KK a permis de surmonter les limites relatives à la disponibilité des moustiques et leur fragilité dans les conditions de captivité. En effet, cette souche est entretenue en permanence dans le laboratoire de Génétique Moléculaire des Bunyaviridae (GMB), et le taux de survie après 30 jours d'élevage avait dépassé les 2/3. Dans cette infection, nous n'avons pas réussi à détecter l'ARN du VHC chez tous les moustiques testés à J0 (28,6% des têtes et 71,4% des corps seulement), contrairement aux expériences précédentes. D'après ces mêmes expériences, la qRT-PCR était assez sensible pour détecter des charges virales plus faibles que celles investiguées dans la dernière infection expérimentale (2400 copies/µl vs. 830 copies/µl pour l'expérience 2 et 1200 copies/µl pour l'expérience 3). Des hypothèses peuvent expliquer cela : (i) la durée de gorgement (16h) aurait suffit à cette souche d'Aedes pour digérer le repas sanguin et au virus de passer dans les tissus ; (ii) présence d'inhibiteurs liés à la nouvelle souche et/ou au sérum et/ou aux globules rouges de lapin. Néanmoins, la première hypothèse serait la plus plausible (nous avons réussi à détecter du génome viral dans les moustiques du J30 par qRT-PCR). La détection par qRT-PCR du génome du VHC est, comme constaté précédemment, soumise (en termes de sensibilité) à l'environnement très complexe des extraits. En effet, le signal détecté par LightCycler pour certains échantillons était dans la limite de sa sensibilité et ont

6. été considérés comme douteux (ni franchement positifs, ni complètement négatifs). Il a alors fallu mettre au point un autre protocole beaucoup plus sensible pour lever ce doute. Après plusieurs étapes de mise au point, nous sommes parvenus à optimiser la détection, au point d'arriver à détecter des brins ARN négatif (liés à la réplication) dans les têtes positives des moustiques à J0, signe d'un gain considérable en sensibilité.

7. Parallèlement à la détection de l'ARN VHC au sein des extraits de moustique, nous avions comme but d'obtenir des informations sur le maximum de séquences du génome du VHC à partir des échantillons positifs. Les expériences précédentes nous ont montré qu'il était particulièrement délicat (voire impossible) de cloner et de séquencer des produits issus d'une amplification par WTA lorsque le ratio (ARN $_{totaux}$) / (ARN $_{cible}$) est trop faible ; en effet, dans ce cas, les ARN les plus abondants, notamment les ARN ribosomaux, sont amplifiés majoritairement, et masquent, voire « noient », les ARN les moins représentés. Cet effet est dû au caractère aléatoire de la WTA. Pour contourner cet obstacle tout en conservant la puissance de l'amplification par la phi29, nous avons mis au point un protocole dérivé de la WTA et que nous avons appelé HCV-GA (HCV Genome Amplification). La HCV-GA est une amplification discriminante dans la mesure où elle favorise l'amplification des ARN cibles. Tout se joue au niveau de l'étape de rétro-transcription où l'on utilise des amorces anti-sens spécifiques du VHC et qui « croisent » le moins possible avec les séquences de génome humain (provenant du sérum) et celles du moustique. Cette variante de la WTA nous a permis de valider la positivité de certains échantillons « douteux » (sur les neuf échantillons testés, 44,4% des têtes et 77,8% des corps étaient positifs) ; ces résultats ont été confirmés par PCR semi-nichées. De même, nous espérons que ce nouveau protocole nous permettra de séquencer une grande partie du génome du VHC par l'approche du pyroséquençage.

8. Quant à la comparaison de nos résultats, vis-à-vis de ceux déjà effectués pour élucider la question de la capacité du VHC à se répliquer dans les moustiques, notre présent travail fournit une réponse par deux facettes : (i) la première caractéristique de notre travail est d'avoir réalisé un travail complémentaire au vu des souches de moustiques d'origines différentes (*Ae*. *vexans* et *Ae*. *caspius* n'avaient jamais été testés auparavant). En effet, il est connu que les interactions hôtes – vecteurs sont très spécifiques et la compétence vis-à-vis de l'infection peut être différente entre deux espèces du même genre de moustiques, de même qu'entre deux génotypes d'un même virus. (ii) Le second niveau concerne les

expériences en elles-mêmes. En effet, les travaux de Silverman *et al.* (188) (*Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762*, Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse 1894, and *Anopheles (Cellia) stephensi* Liston 1901) et Bellini *et al.(*moustique-tigre, *Ae. Albopictus)* (189) ont été effectués sur un nombre si faible de moustiques qu'il n'est pas possible d'infirmer ou de confirmer catégoriquement la possibilité qu'un moustique puisse répliquer le VHC. Les résultats de Chang *et al.* (*Culex (Culex) quinquefasciatus Say 1823)* nous semblent extravagants, dans la mesure où ils ne précisent pas les dates de sacrifice des 32 moustiques positifs (répartis entre le 2ième jour et le 30ième jour) ; en effet, il pourrait parfaitement s'agir de moustiques des tous premiers jours après infection, car il est invraisemblable que de l'ARN viral puisse rester dans le corps du moustique sans ni se répliquer ni être dégradé pendant toute cette période. Les résultats d'Hassan *et al.* apparaissent discutables, dans la mesure où les auteurs affirment avoir réussi à détecter de l'ARN viral dans les têtes des moustiques à J0, mais pas dans les corps de ces mêmes moustiques.

Les virus à ARN possèdent une plasticité intrinsèque qui leur confère la possibilité de changer d'hôte et de traverser la barrière inter-espèces, ce qui déclenche les épidémies (212). Cependant, les évolutions des processus favorisant de tels transferts sont assez mal connues notamment pour les arbovirus. En théorie, les transferts inter-espèces des arbovirus pourraient être contraints par leur alternance d'hôtes, avec une adaptation plus rapide dans l'hôte qui favorise le maximum de sélections (cycles de réplication) avec le minimum d'alternances. Dans un tel système, le primate fournit un modèle excellent. En d'autres termes, l'échappement de l'arbovirus de l'alternance entre différents hôtes d'une part, et sa concentration sur un hôte unique d'autre part, devrait accélérer son adaptation (212). Il est probable que le VHC ait été adapté à alterner entre deux hôtes, le moustique d'une part, et le vertébré (primate) d'autre part, à l'image d'autres virus de la famille des *Flaviviridae*. Au fil des années, le virus se serait adapté au primate, qui a l'avantage de vivre plus longtemps donc qui permet une sélection continue du virus au sein du même hôte sans avoir besoin de passer par l'autre hôte (le moustique). L'alternance a dû continuer tant qu'il existait dans la population virale suffisamment de sous-espèces, pour que le virus puisse se répliquer rapidement dans le moustique qui a une durée de vie très courte. Au fil du temps, la population virale adaptée au moustique se réduit et celle adaptée au primate prend l'avantage, jusqu'à ce qu'il ne reste plus suffisamment de sous-espèces virales capables de

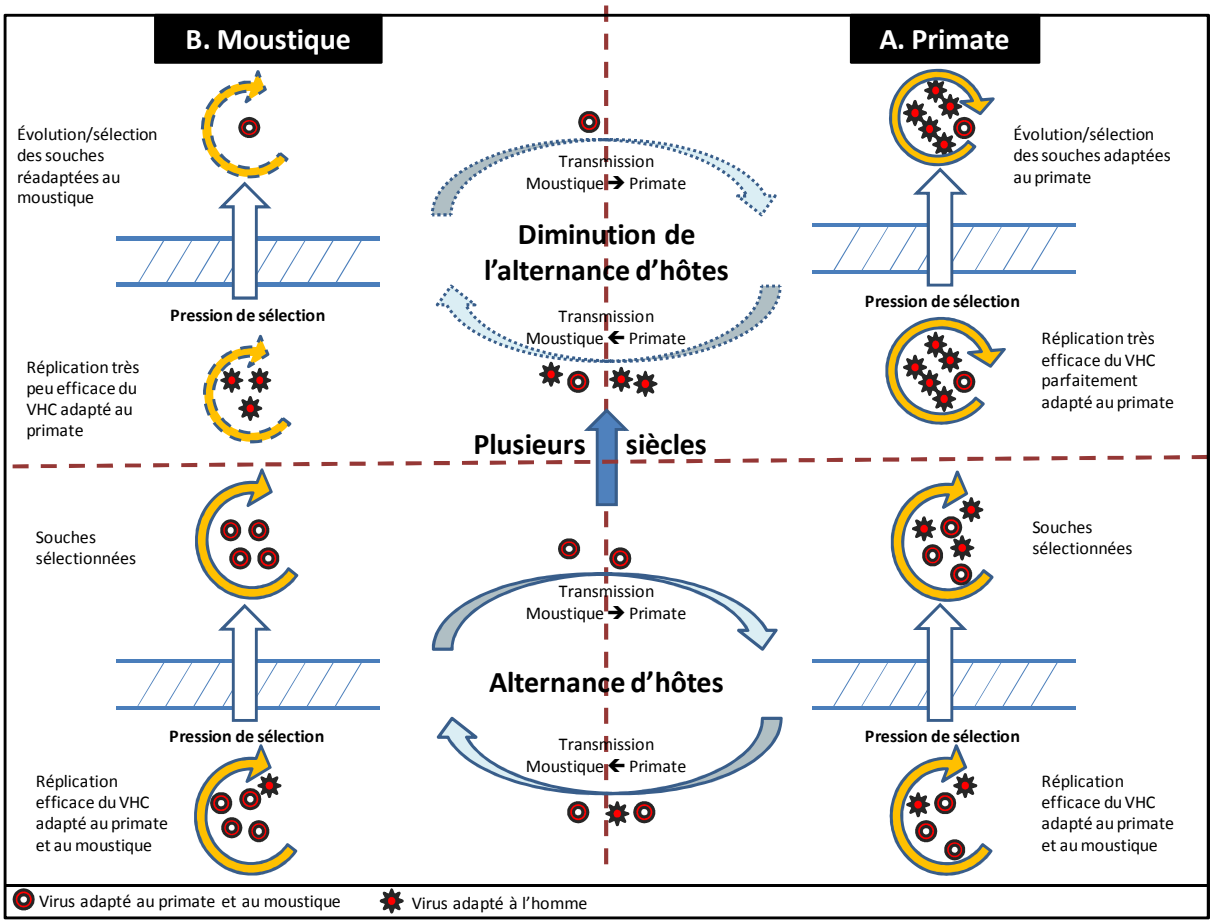


Figure 92 : Schéma explicatif de la notion d'alternance supposée dans le cas du VHC. Il y a 500 – 2000 ans le VHC aurait eu un cycle de vie impliquant deux hôtes, le primate et le moustique, vis-àvis desquels il aurait été adapté. Le moustique prendrait le VHC du primate lors de son repas sanguin, le virus se multiplierait ainsi chez le moustique et serait retransmis au primate lors d'un second repas sanguin. Le VHC recombinant pourrait évoluer chez les deux espèces, de deux façons différentes A) l'évolution au sein du primate serait plus efficace car il vit plus longtemps et les populations sélectionnées par la pression immunitaire peuvent entamer des cycles et des cycles de multiplication, durant la vie de leur hôte, ceci aboutirait, avec le temps, à une adaptation de plus en plus fine. B) L'évolution du VHC chez le moustique serait plus lente car les populations virales sélectionnées au fils des cycles de réplication ne pourraient pas accomplir suffisamment de cycles de réplication pour affiner leur adaptation au moustique. Au fil du temps (plusieurs siècles sans doute) l'équilibre dans le système Primate – VHC – Moustique aurait basculé en faveur du primate qui a fourni un environnement d'évolution plus efficace au virus. Cette adaptation privilégiée du VHC en la faveur du primate a fini par réduire sa capacité se répliquer de façon efficace dans le moustique.

se répliquer d'une façon efficace (correspondant à la durée de vie du moustique) (*cf.* Figure 92*)*. Cette relation inverse entre l'alternance d'hôtes et la vitesse d'adaptation a été testée par Coffey *et al.* sur le VEEV (virus de l'encéphalite équine du Venezuela), un alpha virus émergent en Amérique du sud. Ces auteurs ont démontré que le fait de passer le VEEV dans les moustiques de façon répétée augmentait son infectivité, alors que le fait de passer le même virus alternativement entre deux hôtes différents n'augmentait pas son infectivité. De là, ils ont conclu que l'adaptation et l'évolution d'un arbovirus sont limitées dans le cas d'une alternance obligatoire d'hôtes, de même, l'émergence de virus ayant plusieurs hôtes *via* le changement d'hôte serait moins fréquente que l'émergence de virus qui évoluent au sein d'un seul animal (212). La sélection de souches de VHC adaptées à se répliquer efficacement dans le moustique pourrait passer par différents moyens : (i) en réalisant des passages consécutifs (infections) dans le moustique de la première population virale (clones viraux) qui arrive à se répliquer dans le moustique, (ii) à défaut, en réalisant des infections de moustiques avec des clones moléculaires obtenus à partir des séquences amplifiées du génome viral, (iii) en adaptant des clones viraux à se répliquer en culture cellulaire.

CONCLUSION GENERALE

IX. CONCLUSION GENERALE

Il a fallu plusieurs années d'expériences d'infection expérimentales pour apporter la preuve de la réplication du VHC dans le moustique (séquences à l'appui). Cet exercice s'est avéré particulièrement difficile notamment par l'utilisation de souches de moustiques sauvages, dont la disponibilité dépend des conditions météorologiques (1 saison dans l'année), de la longueur de la durée d'élevage (20 à 30 jours) et de leur fragilité de ces souches dans les conditions d'élevage au laboratoire. L'utilisation de la souche d'élevage, KK, (unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus – IPP) a apporté une flexibilité énorme en termes de disponibilité en quantité d'individus, de disponibilité dans le temps (pas de contraintes des conditions météorologiques) mais aussi en terme de résistance aux conditions d'élevage en cages. Toutefois, malgré ces difficultés, nous avons réussi, dans chacune de ces quatre expériences, à montrer la présence de l'ARN du VHC dans les moustiques. Les moyens utilisés pour la détection ont évolué d'une expérience à l'autre en fonction des difficultés rencontrées et nous avons finalement réussi à mettre au point des protocoles d'amplification très sensibles et spécifiques. Ceux-ci nous permettront, à l'avenir, de procéder plus rapidement à l'amplification et le séquençage de l'ARN viral détecté.

Perspectives

Nos perspectives futures consistent à : (i) compléter l'étude trasncriptomique avec une étude protéomique de l'expression des protéines virales du VHC exprimées chez le moustique (*Aedes sp.*) ; (ii) à réaliser une étude protéomique quantitative des protéines de l'hôte (*Aedes sp.*) induites par l'infection par le VHC (hôtes : *Aedes aegypti,* dont la séquence est actuellement disponible (*cf.* http://aaegypti.vectorbase.org/SequenceData/Genome/) et secondairement *Aedes vexans*) ; (iii) tester d'autres génotypes viraux ; en effet, les génotypes endémiques devraient s'adapter plus rapidement à la réplication chez le moustique que les génotypes épidémiques, puisqu'il est supposé que le maintien du VHC dans les zones endémiques serait dû à des vecteurs hématophages ; (iv) tester d'autres moyens d'infection expérimentale, ex. infection intra-thoracique, ce qui réduira le nombre d'obstacles anatomiques pour la dissémination du virus chez le moustique, et donc réduira également la période extrinsèque d'incubation ; (v) tester la possibilité de transmission du VHC *via* la salive et vers la progéniture du moustique ; (vi) reconstituer la séquence complète

du génome viral en vue de construire des clones moléculaires infectieux qui pourraient éclaircir certains aspects encore obscurs du cycle viral ; et enfin (vii) étudier les interactions fines entre le « VHC du moustique » et les cellules hôtes du moustique.

Nous espérant que notre travail aura constitué une avancée scientifique considérable, car personne auparavant ne s'était « lancé » dans une telle étude, en essayant d'optimiser de manière itérative les paramètres critiques cités plus haut. Assurément ce travail est très loin d'être achevé et n'est qu'une étape dans le long chemin qui reste à parcourir. Nous souhaitons le continuer, en ayant comme objectif proche le séquençage complet de la souche de VHC amplifié chez Aedes. Enfin, ce travail se révèle fructueux, principalement par l'étroite collaboration que nous avons eue avec nos collègues entomologistes de l'Institut Pasteur, et avec les collègues qui ont eu l'audace de nous suivre à l'issue des premières expériences de 2005.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Fretz C *et al.* (1995) HCV infection in a rural population of the Central African Republic (CAR): evidence for three additional subtypes of genotype 4. *J Med Virol* 47**:** 435-437.
2. Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P (2005) The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 5**:** 131-139.
3. Pybus OG, Markov PV, Wu A, Tatem AJ (2007) Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. *Int J Parasitol* 37**:** 839-849.
4. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet infectious diseases* 5**:** 558-567.
5. Alter H (1999) Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *Am J Med* 107**:** 16S-20S.
6. Alter MJ *et al.* (1992) The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 327**:** 1899-1905.
7. Choo QL *et al.* (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244**:** 359-362.
8. Alter HJ *et al.* (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 321**:** 1494-1500.
9. Kuo G *et al.* (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244**:** 362-364.
10. Roy K *et al.* (2002) Monitoring hepatitis C virus infection among injecting drug users in the European Union: a review of the literature. *Epidemiology and infection* 129**:** 577-585.
11. Gheorghe L, Iacob S, Csiki IE (2008) Prevalence of hepatitis C in Romania: different from European rates? *J Hepatol* 49**:** 661-662; author reply 663.
12. Terrault NA (2002) Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 36**:** S99-105.
13. Mast EE *et al.* (2005) Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *The Journal of infectious diseases* 192**:** 1880-1889.
14. (2005) A significant sex--but not elective cesarean section--effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases* 192**:** 1872-1879.
15. Gibb DM *et al.* (2000) Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 356**:** 904-907.
16. Alter MJ (1997) Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26**:** 62S-65S.
17. Purcell R (1994) *Hepatitis C virus* (Academic Press Ltd, London).
18. Lemon SM BE (1995) *Hepatitis C virus* (New York, Churchill Livingstone).
19. Duane J. Gubler GK, Lewis Markoff (2007) in *Fields Virology*, ed. David M. Knipe PMH, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb, Malcolm A. Martin, Bernard Roizman, Stephen E. Straus (Lippincott Williams & Wilkins (LWW), Philadelphia), pp. 1155-1252.
20. Andre P *et al.* (2005) Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* 25**:** 93-104.

21. Petit MA *et al.* (2005) Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* 336**:** 144-153.
22. Rijnbrand R *et al.* (2001) The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* 7**:** 585-597.
23. Yi MLemon SM (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* 77**:** 3557-3568.
24. Yi M, Lemon SM (2003) Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA (New York, N Y)* 9**:** 331-345.
25. Friebe P, Bartenschlager R (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of virology* 76**:** 5326-5338.
26. Harada S *et al.* (1991) Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *Journal of virology* 65**:** 3015-3021.
27. Liu Q *et al.* (1997) Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *Journal of virology* 71**:** 657-662.
28. Yasui K *et al.* (1998) The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *Journal of virology* 72**:** 6048-6055.
29. Suzuki T, Ishii K, Aizaki HWakita T (2007) Hepatitis C viral life cycle. *Advanced drug delivery reviews* 59**:** 1200-1212.
30. Cocquerel L *et al.* (2002) Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *The EMBO journal* 21**:** 2893-2902.
31. Op De Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J (2001) Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *The Journal of general virology* 82**:** 2589-2595.
32. Nakai K *et al.* (2006) Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of virology* 80**:** 11265-11273.
33. Sakai A *et al.* (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100**:** 11646-11651.
34. Pavlovic D *et al.* (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100**:** 6104-6108.
35. Grakoui A *et al.* (1993) A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90**:** 10583-10587.
36. Hijikata M *et al.* (1993) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of virology* 67**:** 4665-4675.
37. Lohmann V *et al.* (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science (New York, N Y)* 285**:** 110-113.
38. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of virology* 74**:** 2046-2051.
39. Pietschmann T *et al.* (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103**:** 7408-7413.

40. Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM (2006) Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 442**:** 831-835.
41. Yao N *et al.* (1997) Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nature structural biology* 4**:** 463-467.
42. Kwong AD, Kim JL, Lin C (2000) Structure and function of hepatitis C virus NS3 helicase. *Current topics in microbiology and immunology* 242**:** 171-196.
43. Yao N *et al.* (1999) Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure (London, England : 1993)* 7**:** 1353-1363.
44. Frick DN, Rypma RS, Lam AMI, Gu B (2004) The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *The Journal of biological chemistry* 279**:** 1269-1280.
45. Meylan E *et al.* (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437**:** 1167-1172.
46. Kaukinen P *et al.* (2006) Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. *Virology journal* 3**:** 66.
47. Wolk B *et al.* (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of virology* 74**:** 2293-2304.
48. Kato J *et al.* (2002) Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 66**:** 187-199.
49. Lundin M *et al.* (2003) Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77**:** 5428-5438.
50. Egger D *et al.* (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76**:** 5974-5984.
51. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM (2004) Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78**:** 3480-3488.
52. Florese RH *et al.* (2002) Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus research* 90**:** 119-131.
53. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM (2004) The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *The Journal of biological chemistry* 279**:** 48576-48587.
54. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290**:** 1972-1974.
55. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R (2001) Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 75**:** 4614-4624.
56. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R (2001) Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *Journal of virology* 75**:** 1437-1449.
57. Shimakami T *et al.* (2004) Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 78**:** 2738-2748.
58. Shirota Y *et al.* (2002) Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 277**:** 11149-11155.

59. Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C (2003) Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 77**:** 5401-5414.
60. Gale MJ, Jr. *et al.* (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230**:** 217-227.
61. Moradpour D *et al.* (2004) Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78**:** 13278-13284.
62. Schmidt-Mende J *et al.* (2001) Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 276**:** 44052-44063.
63. Lesburg CA *et al.* (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature structural biology* 6**:** 937-943.
64. Ago H *et al.* (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure (London, England : 1993)* 7**:** 1417-1426.
65. Bressanelli S *et al.* (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96**:** 13034-13039.
66. Butcher SJ *et al.* (2001) A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410**:** 235-240.
67. Zhong W *et al.* (2000) De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *Journal of virology* 74**:** 2017-2022.
68. Luo G *et al.* (2000) De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *Journal of virology* 74**:** 851-863.
69. Reigadas S *et al.* (2001) HCV RNA-dependent RNA polymerase replicates in vitro the 3' terminal region of the minus-strand viral RNA more efficiently than the 3' terminal region of the plus RNA. *European journal of biochemistry / FEBS* 268**:** 5857-5867.
70. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO journal* 8**:** 3867-3874.
71. Cheney IW *et al.* (2002) Mutations in NS5B polymerase of hepatitis C virus: impacts on in vitro enzymatic activity and viral RNA replication in the subgenomic replicon cell culture. *Virology* 297**:** 298-306.
72. Ishii K *et al.* (1999) Expression of hepatitis C virus NS5B protein: characterization of its RNA polymerase activity and RNA binding. *Hepatology* 29**:** 1227-1235.
73. Lohmann V, Korner F, Herian U, 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.
74. Qin W *et al.* (2001) Mutational analysis of the structure and functions of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatology* 33**:** 728-737.
75. Lohmann V, Korner F, Herian U, 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. *Journal of virology* 71**:** 8416-8428.
76. Neumann AU *et al.* (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282**:** 103-107.

77. Simmonds P *et al.* (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology (Baltimore, Md)* 42**:** 962-973.
78. Thiel HJ (2005) in *Virus taxonomy*, ed. Fauquet CM, Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. (Academic Press, L.A.), pp. 979–996.
79. Simmonds P (1999) Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 31 Suppl 1**:** 54-60.
80. Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5**:** 453-463.
81. Helle FDubuisson J (2008) Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* 65**:** 100-112.
82. Boucheix C, Rubinstein E (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58**:** 1189-1205.
83. Levy SShoham T (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5**:** 136-148.
84. Levy S, Shoham T (2005) Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)* 20**:** 218-224.
85. Rocha-Perugini V *et al.* (2009) The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol* 9**:** 111.
86. Pileri P *et al.* (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282**:** 938-941.
87. Bartosch B *et al.* (2003) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *The Journal of biological chemistry* 278**:** 41624-41630.
88. Zhang J *et al.* (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78**:** 1448-1455.
89. Zhong J *et al.* (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102**:** 9294-9299.
90. Wakita T *et al.* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* 11**:** 791-796.
91. Bartosch B *et al.* (2005) An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79**:** 8217-8229.
92. Bartosch B *et al.* (2005) An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *Journal of virology* 79**:** 8217-8229.
93. Lavillette D *et al.* (2005) Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md)* 41**:** 265-274.
94. Cormier EG *et al.* (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101**:** 7270-7274.
95. Lindenbach BD *et al.* (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309**:** 623-626.
96. Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J (2006) Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 87**:** 1075-1084.
97. Lerat H *et al.* (1996) Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *The Journal of clinical investigation* 97**:** 845-851.

98. Lamelin JP, Zoulim, F Trepo C (1995) Lymphotropism of hepatitis B and C viruses: an update and a newcomer. *International journal of clinical & laboratory research* 25**:** 1-6.
99. Bain C *et al.* (2001) Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 120**:** 512-524.
100. Peng Y *et al.* (2004) Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol Biol Cell* 15**:** 384-396.
101. Dreux M *et al.* (2009) Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS pathogens* 5**:** e1000310.
102. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB (2003) DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3**:** 697-709.
103. Koppel EA, van Gisbergen KP, Geijtenbeek T, Bvan Kooyk Y (2005) Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol* 7**:** 157-165.
104. Cormier EG *et al.* (2004) L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101**:** 14067-14072.
105. Saunier B *et al.* (2003) Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 77**:** 546-559.
106. Andre P *et al.* (2002) Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76**:** 6919-6928.
107. Agnello V *et al.* (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96**:** 12766-12771.
108. Villanueva RA, Rouille YDubuisson J (2005) Interactions between virus proteins and host cell membranes during the viral life cycle. *Int Rev Cytol* 245**:** 171-244.
109. Barth H *et al.* (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry* 278**:** 41003-41012.
110. Callens N *et al.* (2005) Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 79**:** 15331-15341.
111. Evans MJ *et al.* (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446**:** 801-805.
112. Benedicto I *et al.* (2009) Tight junction-associated protein occludin is required for a post-binding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol*.
113. Koutsoudakis G *et al.* (2006) Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80**:** 5308-5320.
114. Tscherne DM *et al.* (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80**:** 1734-1741.
115. Blanchard E *et al.* (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80**:** 6964-6972.
116. Levrero M (2006) Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25**:** 3834-3847.

117. Meertens L, Bertaux C, Dragic T (2006) Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 80**:** 11571-11578.
118. Otto GA, Puglisi JD (2004) The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119**:** 369-380.
119. Gontarek RR *et al.* (1999) hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res* 27**:** 1457-1463.
120. Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* 296**:** 2218-2222.
121. Schwartz M *et al.* (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 9**:** 505-514.
122. Moradpour D *et al.* (2003) Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* 60**:** 103-109.
123. Gosert R *et al.* (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77**:** 5487-5492.
124. Watashi K *et al.* (2005) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19**:** 111-122.
125. Okamoto T *et al.* (2006) Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 25**:** 5015-5025.
126. Nielsen SU *et al.* (2006) Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 80**:** 2418-2428.
127. Huang H *et al.* (2007) Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104**:** 5848-5853.
128. Gastaminza P, Kapadia SBChisari FV (2006) Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 80**:** 11074-11081.
129. Gastaminza P *et al.* (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 82**:** 2120-2129.
130. Xie ZC *et al.* (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244**:** 513-520.
131. Mercer DF *et al.* (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature medicine* 7**:** 927-933.
132. Furutani T *et al.* (2006) Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* 130**:** 2087-2098.
133. Moriya K *et al.* (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature medicine* 4**:** 1065-1067.
134. Brass V, Moradpour D, Blum HE (2006) Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *International journal of medical sciences* 3**:** 29-34.
135. Lavie M, Goffard A, Dubuisson J (2007) Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current issues in molecular biology* 9**:** 71-86.
136. Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ (1998) Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *Journal of virology* 72**:** 3827-3836.

137. Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews Microbiology* 5**:** 453-463.
138. Kato T *et al.* (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125**:** 1808-1817.
139. Kato N *et al.* (2003) Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 306**:** 756-766.
140. Duverlie G, Wychowski C (2007) Cell culture systems for the hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 13**:** 2442-2445.
141. Miyamoto M *et al.* (2006) Comparison between subgenomic replicons of hepatitis C virus genotypes 2a (JFH-1) and 1b (Con1 NK5.1). *Intervirology* 49**:** 37-43.
142. Dustin LB, Rice CM (2007) Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 25**:** 71-99.
143. Seeff LB (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 36**:** S35-46.
144. Myrmel H, Ulvestad E, Asjo B (2009) The hepatitis C virus enigma. *APMIS* 117**:** 427-439.
145. Gale M, Jr.Foy EM (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436**:** 939-945.
146. Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, Glenn JS (2009) Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6**:** 217-227.
147. Foy E *et al.* (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300**:** 1145-1148.
148. Wang C *et al.* (2003) Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 77**:** 3898-3912.
149. Stanley M. Lemon CW, Miriam J. Alter, MinKyung Yi (2007) in *Fields Virology*, ed. Knipe DMH, Peter M. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadeliphia), pp. 1253-1304.
150. Doherty DG *et al.* (1999) The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 163**:** 2314-2321.
151. Doherty DG, O'Farrelly C (2000) Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 174**:** 5-20.
152. Munz C, Steinman RM, Fujii S (2005) Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 202**:** 203-207.
153. Herzer K *et al.* (2003) Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol* 77**:** 8299-8309.
154. Nattermann J *et al.* (2005) The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 166**:** 443-453.
155. Crotta S *et al.* (2002) Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 195**:** 35-41.
156. Tseng CT, Klimpel GR (2002) Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 195**:** 43-49.
157. Szabo G, Chang S, Dolganiuc A (2007) Altered innate immunity in chronic hepatitis C infection: cause or effect? *Hepatology* 46**:** 1279-1290.

158. Szabo G, Dolganiuc A (2008) Hepatitis C core protein - the "core" of immune deception? *J Hepatol* 48**:** 8-11.
159. Dolganiuc A *et al.* (2006) Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 177**:** 6758-6768.
160. Farci P *et al.* (1994) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91**:** 7792-7796.
161. Farci P *et al.* (1996) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93**:** 15394-15399.
162. Petit MA *et al.* (2003) Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J Biol Chem* 278**:** 44385-44392.
163. Lavillette D *et al.* (2005) Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol* 79**:** 6023-6034.
164. Logvinoff C *et al.* (2004) Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101**:** 10149-10154.
165. Mondelli MU, Cerino A, Meola A, Nicosia A (2003) Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *J Biosci* 28**:** 305-310.
166. Shimizu YK *et al.* (1996) A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 223**:** 409-412.
167. Hadlock KG *et al.* (2000) Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol* 74**:** 10407-10416.
168. Keck ZY *et al.* (2004) Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. *J Virol* 78**:** 9224-9232.
169. Schofield DJ *et al.* (2005) Human monoclonal antibodies that react with the E2 glycoprotein of hepatitis C virus and possess neutralizing activity. *Hepatology* 42**:** 1055-1062.
170. Rothwangl KB, Manicassamy B, Uprichard SL, Rong L (2008) Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. *Virol J* 5**:** 46.
171. Yagnik AT *et al.* (2000) A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40**:** 355-366.
172. Olenina LV *et al.* (2005) Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2*. *J Viral Hepat* 12**:** 584-593.
173. Ndongo N *et al.* (2009) Inhibition of the binding of HCV serum particles to human hepatocytes by E1E2-specific D32.10 monoclonal antibody. *J Med Virol* 81**:** 1726-1733.
174. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG (2007) The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132**:** 1979-1998.

175. Tanabe Y *et al.* (2004) Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis* 189**:** 1129-1139.
176. Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C (2007) Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 20**:** 23-38.
177. Deutsch M, Hadziyannis SJ (2008) Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. *J Viral Hepat* 15**:** 2-11.
178. Dienstag JL, McHutchison JG (2006) American Gastroenterological Association medical position statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 130**:** 225-230.
179. Hezode C *et al.* (2009) Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360**:** 1839-1850.
180. Weaver SC, Barrett AD (2004) Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* 2**:** 789-801.
181. Borror DJ TC, Johnson NF (1989) *An Introduction to the Study of Insects* (Saunders College Publishing, Philadelophia).
182. Rodhain F (2001) *Fièvre jaune, dengue et autres arboviroses* (Encycl. Med. Chir., Paris).
183. Sutherst RW (2004) Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev* 17**:** 136-173.
184. Goddard J (2008) *Infectious diseases and arthropods* (Humana Press, New Jersey).
185. Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45**:** 307-340.
186. Chamberlain RW, Sudia WD (1961) Mechanism of transmission of viruses by mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 6**:** 371-390.
187. Lane R (1994) *Competence of ticks as vectors of micronial agents with an emphasis on Borrelia burgdorferi* (Oxford University Press, New York).
188. Silverman AL *et al.* (1996) Experimental evidence against replication or dissemination of hepatitis C virus in mosquitoes (Diptera:Culicidae) using detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Med Entomol* 33**:** 398-401.
189. Bellini R *et al.* (1997) Aedes albopictus (Diptera:Culicidae) is incompetent as a vector of hepatitis C virus. *APMIS* 105**:** 299-302.
190. Chang TT *et al.* (2001) Existence of hepatitis C virus in Culex quinquefasciatus after ingestion of infected blood: experimental approach to evaluating transmission by mosquitoes. *J Clin Microbiol* 39**:** 3353-3355.
191. Germi R *et al.* (2001) Mosquito cells bind and replicate hepatitis C virus. *J Med Virol* 64**:** 6-12.
192. Hassan MI *et al.* (2003) Experimental demonstration of hepatitis C virus (HCV) in an Egyptian strain of *Culex pipiens* complex. *J Egypt Soc Parasitol* 33**:** 373-384.
193. Woelk CH, Holmes EC (2002) Reduced positive selection in vector-borne RNA viruses. *Mol Biol Evol* 19**:** 2333-2336.
194. Telenius H *et al.* (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13**:** 718-725.
195. Zhang L *et al.* (1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89**:** 5847-5851.
196. Berthet N *et al.* (2008) Phi29 polymerase based random amplification of viral RNA as an alternative to random RT-PCR. *BMC Mol Biol* 9**:** 77.

197. Kuntzen T *et al.* (2007) Viral sequence evolution in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 81**:** 11658-11668.
198. Moutailler S (2007) in *Institut Pasteur de Paris* (Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris), p. 144.
199. Rutledge LC, A. R. Ward, and D. J. Gould (1964) Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq News* 24**:** 407–419.
200. Vazeille M *et al.* (2007) Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, Aedes albopictus. *PLoS ONE* 2**:** e1168.
201. Flint M *et al.* (1999) Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 73**:** 6235-6244.
202. Roccasecca R *et al.* (2003) Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* 77**:** 1856-1867.
203. Law M *et al.* (2008) Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nature medicine* 14**:** 25-27.
204. Drouet E, Rechoum Y, Fouque F (2008) in *WO/2008/078056*, ed. UJF (France).
205. Poncon N *et al.* (2007) Population dynamics of pest mosquitoes and potential malaria and West Nile virus vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue, France. *Med Vet Entomol* 21**:** 350-357.
206. Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM (2002) Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 76**:** 2997-3006.
207. Watanabe K *et al.* (2005) Mutations in the nonstructural region 5B of hepatitis C virus genotype 1b: their relation to viral load, response to interferon, and the nonstructural region 5A. *J Med Virol* 75**:** 504-512.
208. LUDMERER S, W., GRAHAM, Donald, J., LAFEMINA, Robert, FLORES, Osvaldo, A., PIZZUTI, Maura, TRABONI, Cinzia (2005) in *WO/2005/047463*, ed. SPA. IDRDBMPA (Italy).
209. Flint SJ, Enquist, L. W., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2004) *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*.
210. Watts DM *et al.* (1987) Effect of temperature on the vector efficiency of Aedes aegypti for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 36**:** 143-152.
211. Turell MJ *et al.* (2006) Laboratory transmission of Japanese encephalitis, West Nile, and Getah viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected near Camp Greaves, Gyeonggi Province, Republic of Korea 2003. *J Med Entomol* 43**:** 1076-1081.
212. Coffey LL *et al.* (2008) Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105**:** 6970-6975.

ANNEXE – 1

Procédé d'amplification du VHC chez les moustiques *Aedes*

R É P U B L I Q U E F R A N Ç A I S E

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

Brevet d'invention

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉCISION DE DÉLIVRANCE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle décide que le brevet d'invention n° **06 55935** dont le texte est ci-annexé est délivré à :
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 Etablissement public - FR

La délivrance produit ses effets pour une période de vingt ans à compter de la date de dépôt de la demande, sous réserve du paiement des redevances annuelles.

Mention de la délivrance est faite au Bulletin officiel de la propriété industrielle n° 09/07 du 13.02.09 (n° de publication 2 910 491).

Fait à Paris, le 13.02.09

Le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle

Benoît BATTISTELLI

SI 20/06112007

Siège : 26*bis*, rue de Saint-Pétersbourg - 75800 PARIS Cedex 08 - Téléphone : 0 820 213 213 - Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23 - www.inpi.fr - contact@inpi.fr
Établissement public national créé par la loi n°51-444 du 19 avril 1951

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 910 491**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **06 55935**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 N 7/00*** *(2006.01), C 12 N 5/16, A 61 K 35/64, 35/76, 39/29, 39/42, A 61 P 31/14, 37/04*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

(54) PROCEDE D'AMPLIFICATION DU VHC CHEZ LES MOUSTIQUES AEDES.

(22) **Date de dépôt :** 22.12.06.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 27.06.08 Bulletin 08/26.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 13.02.09 Bulletin 09/07.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 Etablissement public* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** DROUET EMMANUEL, RECHOUM YASSINE et FOUQUE FLORENCE.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** CABINET LAURENT ET CHARRAS.

FR 2 910 491 - B1

PROCEDE D'AMPLIFICATION DU VHC CHEZ LES MOUSTIQUES *Aedes*

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne l'identification de nouveaux systèmes permettant l'amplification du virus de l'Hépatite C (VHC). Ainsi, il a été mis en évidence que certains moustiques du genre *Aedes* permettaient la réplication efficace *in vivo* du VHC. Ceci offre des perspectives prometteuses, notamment en termes de vaccinologie et de développement de médicaments contre cette infection.

ETAT ANTERIEUR DE LA TECHNIQUE

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié comme étant responsable de l'hépatite non A non B pouvant évoluer en pathologies chroniques malignes, du type par exemple cirrhose du foie ou encore carcinome hépato-cellulaire.

Le VHC, membre du genre *Hepacivirus*, appartient à la famille des *Flaviviridae* qui sont des virus à ARN monobrin enveloppés, parmi lesquels on rencontre les virus responsables de maladies épidémiques majeures telles que la Fièvre Jaune (YF), la Dengue (DEN) et la Dengue Hémorragique (DHF), l'Encéphalite Japonaise (JE), l'Encéphalite de Saint-Louis (SLE), la fièvre de West Nile (WN) et l'Hépatite C (HC) pour ne citer que les plus importantes.

Les *Flavivirus* sont transmis par des insectes vecteurs, selon des modalités épidémiologiques très différentes. Certaines maladies sont typiquement humaines (ou liées aux primates) et ne touchent jamais les animaux comme la DEN et la DHF ; d'autres infections sont plutôt zoonotiques et touchent plus ou moins accidentellement l'être humain, comme la JE, la SLE et le WN. Enfin, certains *Flavivirus* peuvent circuler de façon épidémique aussi bien dans des populations humaines qu'animales (YF). Ces modalités épidémiologiques différentes ont pourtant des bases communes telles qu'une amplification virale dans des cellules d'insectes.

Concernant le VHC, les voies de transmission aujourd'hui bien établies sont : transmission par les produits sanguins, toxicomanie, transmission sexuelle et contexte nosocomial. Toutefois, 30 à 40% des infections à VHC aujourd'hui répertoriées chez l'homme ont une origine inexpliquée, dans la mesure où aucune des conditions listées ci-dessus n'est réunie. Par ailleurs, il a été noté une forte prévalence de l'infection à VHC

dans des régions chaudes et humides, telles que l'Egypte, ainsi que dans le Japon Sud, à proximité du JEV. A ce jour, aucune explication n'a pu être donnée quant à cette répartition géographique de la maladie.

Concernant les stratégies vaccinales anti-VHC, elles sont aujourd'hui basées sur deux procédés usuels dans le domaine : d'une part des recombinants *Vaccinia* ou AAV (Adeno-Associated Virus) ; d'autre part, les stratégies de vaccinothérapie anti-VHC sont développées sur la base de polypeptides dérivés des protéines du VHC.

Dans la lutte menée contre les hépatites virales de type C, un obstacle majeur, entravant le développement d'un traitement et d'un vaccin efficace, est l'absence d'un système permettant la multiplication à haut niveau du virus *in vitro*. Ceci pourrait s'expliquer par une mauvaise adaptation du virus chez l'homme, le rendant incapable de se répliquer *in vitro* sur des modèles cellulaires conventionnels, tels que la lignée d'hépatocarcinome ou les cellules hépatiques primaires.

Des constructions moléculaires ont été proposées pour pallier ce problème, notamment le modèle des réplicons, mais elles partagent toutes le défaut d'être des formes alternatives assez éloignées des particules C naturelles.

De manière plus exhaustive, les modèles actuellement disponibles pour l'amplification du VHC sont les suivants :

Les modèles *in vivo* d'infection et de réplication virale sont répertoriés dans la revue de Bartenschlager *et al.* (**1**). Concernant les modèles animaux conventionnels, le seul animal susceptible à l'infection par le VHC est le chimpanzé (*P. troglodytes*), chez qui les virémies sont à haut titre. D'autres primates (*Tupaia belangeri chinensis*) sont infectables, mais avec des virémies faibles et intermittentes. Un autre modèle animal disponible est la souris beige/nude/immunodéficiente avec xénotransplantation d'hépatocytes humains (souris trimera®), qui présente une virémie importante mais dont le succès est lié à la durée de vie du transgène.

La revue de Bartenschlager *et al.* (**1**) rapporte également l'existence de systèmes de cultures cellulaires. Aucune lignée cellulaire autorisant un cycle permissif complet et la production de particules virales, après infection conventionnelle, n'a été décrite (**8**). Le seul système efficace permettant la réplication est celui décrit par Bartenschlager et Lohmann (**2**) : il s'agit d'un système de réplicon subgénomique permettant, après transfection de cellules Huh-7 par du réplicon cloné, la réplication de l'ARN génomique VHC et l'expression des protéines non structurales (en particulier la protéase-hélicase et

l'ARN polymérase). Ce système est utilisé dans les criblages antiviraux. Une amélioration importante a été apportée par Wakita *et al.* (**11**). Ce dernier système de réplicon (clone HCV-JFH1) permet la production de particules virales complètes infectieuses (après transfection en cellules Huh-7). Toutefois et à l'heure actuelle, le système n'est pas adapté à la production de biomasse importante.

Enfin, des systèmes d'expression hétérologues ont été développés. Il s'agit, d'une part, des « Virus Like Particles » (VLPs), obtenues grâce à un baculovirus exprimant les glycoprotéines d'enveloppe hétérodimériques E1E2 (**4**). Récemment, le système baculovirus a été exploité sur la base d'un recombinant contenant un ADNc des protéines core + gp E1E2, dans une expérience d'immunisation de chimpanzés à visée vaccinale. D'autre part, des pseudotypes ou pseudo particules (pp) rhabdoviraux (VSV, **6**) ou rétroviraux (HIV ou MLV, **3**) ont été obtenus. Ces systèmes, d'intérêt fondamental, sont utilisés pour l'étude de l'entrée virale *via* les gp E1E2. Ils ne sont utilisables que pour l'étude des anticorps neutralisants anti-enveloppe VHC et ne présentent donc aucun intérêt en vaccinologie.

Il apparaît donc qu'aucun des systèmes décrits ne donne entièrement satisfaction et qu'il persiste le besoin de développer de nouveaux modèles permettant une amplification efficace du VHC.

EXPOSE DE L'INVENTION

Ainsi et pour répondre à ce besoin, l'invention concerne un procédé d'amplification *in vivo* du virus de l'hépatite C (VHC) comprenant les étapes suivantes :

a/ ingestion de la source virale par des moustiques femelles du genre *Aedes* ;

b/ élevage des moustiques pendant le temps nécessaire à l'amplification du virus.

La première étape consiste donc à « faire passer » le virus dans le moustique de la manière la plus efficace possible, en l'occurrence par ingestion. Après ingestion par le moustique, le virus arrive dans l'estomac où il va franchir la paroi stomacale, puis se disperser dans l'hémocèle et atteindre différents organes, tels que les ovaires et les glandes salivaires, où il est susceptible de se multiplier. Le virus peut par conséquent être transmis aux générations suivantes de moustiques ou à l'homme lors d'une piqûre.

Les moustiques du genre *Aedes* sont des Diptères, Nématocères, de la famille des *Culicidae*, sous-famille *Culicinae*, Tribu *Aedini*. Les femelles sont caractérisées par des palpes courts et des antennes non plumeuses.

Dans le cadre de la présente invention, les espèces *Aedes vexans* et *Aedes caspius* ont été utilisées.

De manière avantageuse, ce sont des souches sauvages de ces espèces qui sont utilisées dans le cadre de l'invention. Ainsi, la population mise en oeuvre dans le procédé provient d'un élevage réalisé à partir de matériel (œufs, larves ou adultes) prélevé directement sur le terrain, dans le biotope privilégié de ces deux espèces. Les individus utilisés appartiennent avantageusement aux générations F0, F1 ou F2.

Comme déjà dit, la mise en contact entre la source virale et les moustiques se fait par ingestion. Avantageusement, la source virale est conditionnée à l'aide de globules rouges par exemple de mouton, éventuellement supplémentés avec de l'ATP, pour augmenter l'appétence des moustiques femelles.

En pratique, l'ingestion se fait donc au cours d'un repas sanguin pris par les moustiques femelles.

Avantageusement, l'ingestion est réalisée à l'aide de la technique du gorgement. Cette technique particulièrement efficace est bien connue des entomologistes et décrite par exemple dans Fouque *et al.* (**7**). Dans le principe, un repas sanguin est proposé à des moustiques femelles dans un gorgeoir qui permet de maintenir le repas à 37°C. Le gorgeoir est recouvert d'une peau au travers de laquelle les moustiques insèrent leur proboscis et prennent le repas.

Dans un mode de réalisation avantageux de cette technique, il est mis en œuvre une peau de poulet.

Selon l'invention, la source virale comprend un virus « natif » (virulent), ou avantageusement atténué. Un virus virulent permet de reproduire l'infection et donc offre un modèle expérimental de premier choix. De manière plus appliquée, un virus atténué présente un intérêt particulier dans la production de vaccins ou d'anticorps.

Selon un mode de réalisation privilégiée de l'invention, la charge virale provient d'un sérum, avantageusement d'origine humaine, par exemple celui d'un porteur

d'hépatite chronique VHC de génotype 1b. Le titre classique d'un tel sérum est généralement autour de $2^{E}6$ copies / ml.

Dans le cadre de l'invention, il a été déterminé que la mise en contact devait avoir lieu à hauteur d'au moins 1000 copies du virus par moustique, avantageusement 1500 copies du virus par moustique.

La seconde étape du procédé selon l'invention consiste à élever les moustiques pendant une durée déterminée. L'élevage est réalisé dans des conditions contrôlées, notamment de température et d'humidité. La durée de l'élevage est déterminée en fonction des critères suivants :

- elle doit être inférieure à la durée de vie moyenne de l'espèce de moustiques en captivité ;
- elle doit permettre de réaliser au moins un cycle d'amplification extrinsèque chez le moustique et préférentiellement d'obtenir un taux de réplication maximal du virus.

Dans le cadre de l'invention, l'amplification apparaît optimale entre 15 et 30 jours d'élevage pour les *Aedes* testés, avec comme valeur moyenne avantageuse une durée d'élevage d'environ 20 jours.

La récupération du virus, notamment sous forme de particules virales, peut nécessiter leur extraction des tissus de moustiques. Des tissus privilégiés sont les ovaires et les glandes salivaires.

L'invention offre donc un procédé d'amplification du VHC, se déroulant *in vivo* chez des espèces de moustiques spécifiques, donnant des résultats tout à fait inattendus et remarquables.

Il était certes connu de FR 2793 258 et Germi *et al.* (**9**) de produire *in vitro* du VHC dans de cellules d'insectes, mais avec des résultats insuffisants.

Par ailleurs, des expériences antérieures, réalisées *in vivo* sur des moustiques appartenant aux espèces *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles stephensi* et *Culex quinquefasciatus*, respectivement, se sont révélées négatives (**10**, **5**). Ces résultats sont cohérents avec le concept d'une longue coadaptation et d'une grande spécificité entre virus et moustique vecteur, mettant en lumière le mérite de la présente invention.

Comme déjà dit, le procédé selon l'invention offre des perspectives très prometteuses, y compris pour la production massive *in vitro* du VHC.

Ainsi, le procédé selon l'invention donne accès à des tissus, notamment d'ovaire ou de glande salivaire, ou des cellules d'*Aedes*, avantageusement d'*Ae. Caspius* ou *vexans*, porteurs du VHC.

Ces cellules peuvent être utilisées en tant que telles pour la production massive du VHC *in vitro*.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également un procédé d'obtention de cellules productrices *in vitro* de VHC. Il s'agit alors de cocultiver les cellules d'*Aedes*, porteuses du VHC, obtenues à l'aide du procédé selon l'invention, et des cellules de type AP61 ou C6/36. Les cellules de type AP61 et C6/36 ont été décrites par Germi et al. (**9**). Il s'agit de lignées cellulaires de moustique, en particulier *d'Aedes pseudoscutellaris*, continues et bien définies. La coculture a pour but de transférer le VHC dans ces lignées cellulaires. L'invention concerne donc également des cellules de moustique productrices *in vitro* de VHC, obtenues à l'issu de ce procédé.

Ces deux sources cellulaires de VHC offrent d'importantes perspectives, notamment pour la production de particules virales d'une nouvelle nature (issues d'*Aedes*), d'anticorps et de vaccins.

EXEMPLES DE REALISATION

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation suivants, à l'appui des figures annexées. Ceux-ci ne sont cependant en aucun cas limitatifs.

La figure 1 correspond à un gel illustrant la détection de l'ARN viral au sein des moustiques *Aedes vexans* infectés par le VHC, après extraction des ARN totaux et RT-PCR classique avec révélation de l'ADN au bromure d'éthidium. Piste 1). Témoin négatif de la PCR ; piste 2) Témoin négatif moustique; pistes 3, 4) jour 0; piste 5) jour 14; pistes 6, 7, 8) jour 21.

La figure 2 illustre la détection de l'ARN viral par qRT-PCR, après extraction des ARN totaux des moustiques *Aedes (vexans + caspius)* après 24 jours d'élevage. La courbe standard a été réalisée sur une dilution logarithmique d'un extrait d'ARN viral de titre connu (120 000 copies/run à 1 200 copies/run) (Fig. 2A). Dans la figure 2B, les témoins positifs sont identifiés par (J0, T+), et les individus susceptibles d'avoir répliqué le VHC

après 24 jours par (J20). Pour chaque échantillon, sont indiqués (i) le nombre de cycles au bout desquels l'ARN viral a été détecté (ii) ainsi que sa concentration au départ par rapport à la courbe standard. La courbe de la figure 2B montre l'évolution de la détection du signal pour chaque échantillon.

La figure 3 illustre la détection de l'ARN viral par qRT-PCR, après extraction des ARN totaux des moustiques *Culex* (*pipiens*) après 28 jours d'élevage La courbe standard a été réalisée sur une dilution logarithmique d'un extrait d'ARN viral de titre connu (800 000 copies/run a 8 000 copies/run) (Fig. 3A). Pour chaque échantillon, sont indiqués (i) le nombre de cycles au bout desquels l'ARN viral a été détecté (ii) ainsi que sa concentration au départ par rapport à la courbe standard. La courbe de la Fig. 3B montre l'évolution de la détection du signal pour chaque échantillon.

PARTIE EXPERIMENTALE

I - Infections expérimentales

1. Elevage des espèces testées

Les individus testés proviennent d'un élevage réalisé à partir de moustiques (oeufs, larves et adultes) collectés sur le terrain dans la zone urbaine de Marseille pour l'espèce *Culex pipiens* et dans la réserve de la Tour du Valat en Camargue pour les espèces *Aedes vexans* et *Aedes caspius.* Ces élevages ont été réalisés dans les locaux de l'ENSAM situés au Domaine du Merle, à Salon de Provence. Ces élevages sont réalisés dans un insectarium classique, aux normes d'élevage. Les larves sont nourries avec de la levure de bière et de l'alimentation pour poisson et les adultes sont nourris avec une solution de sucrose. Les repas sanguins des *Culex* et *Aedes* sont composés de globules rouges lavés de mouton, le but du lavage étant d'éliminer l'interférence des éléments du sang.

2. Introduction des moustiques dans le Laboratoire Sécurisé (niveau 2+)

Au jour J-1, les moustiques femelles sont répartis en lots, placés dans les boites de gorgement avec un coton humide sur chaque boite et introduits dans le laboratoire sécurisé. Les moustiques sont conservés à température et humidité contrôlées (T = 25°C ± 2, RH 80% ± 10).

3. Introduction du virus VHC dans le Laboratoire L2+

Au jour J0, la solution virale contenant du virus VHC (sérum de patient porteur d'hépatite chronique à $2^{E}6$ copies/ml) est transportée par transporteur spécial jusqu'au L2+ où sont placés les moustiques. La solution virale est fournie par le Laboratoire de Virologie

moléculaire et structurale de la Faculté de Médecine de Grenoble. La solution virale est conservée dans le congélateur à -80°C du L2+.

4. Préparation de la solution sanguine infectée

Au jour J0, le mélange globules rouges lavés (sang de mouton) non-infectés et solution virale est réalisé, de manière à obtenir un titre suffisant pour infecter des moustiques (~1500 copies / moustique). De l'ATP est rajouté pour rendre le sang plus attractif et augmenter l'appétence des femelles. Chaque moustique prend entre 3 et 5 µl par repas de sang.

5. Infection des lots de femelles

Au jour J0, le gorgeoir contenant le sang infecté et chauffé à 37°C est présenté aux femelles, privées de glucose depuis 24 heures. Le gorgeoir est posé sur chaque boite et laissé sur place environ 4 heures pour la prise de repas sanguin. En parallèle, le gorgeoir avec du sang non contaminé est présenté au lot de femelles témoins négatifs. Au bout de la durée de gorgement des femelles, celles-ci sont récupérées par l'aspirateur à bouche, endormies par les vapeurs de chloroforme puis triées sous loupe binoculaire. Les femelles ayant gorgé du sang sont remises dans les cages. Un gîte artificiel est laissé dans chaque cage métallique à la disposition des femelles pour la ponte (bac d'eau pour les femelles *Aedes* et terre humide pour les femelles *Culex).* A partir de ce jour, les cages métalliques contenant les femelles gorgées ne sont ni ouvertes, ni manipulées jusqu'au sacrifice des moustiques.

6. Entretien des lots de femelles

Les lots de femelles sont maintenus à une température constante d'environ 28°C et avec une humidité contrôlée d'au moins 70%. Chaque jour, les femelles sont nourries grâce à du coton imbibé d'une solution de glucose à 10 % déposé sur la cage métallique. Les gîtes de ponte sont humidifiés à travers la cage avec une pissette.

7. Traitement des femelles

Aux jours de prélèvement, les moustiques sont sacrifiés en plaçant la cage métallique au froid. Les moustiques sont ensuite placés dans des tubes 1,5 ml, identifiés et remis au congélateur jusqu'à l'étape d'extraction d'ARN avant les PCR. Les témoins négatifs, gorgés sur sang non virémique sont aussi sacrifiés. Le lot de moustiques, sacrifié au jour J0 et mis au congélateur à -80°C, constitue les témoins positifs J0 de gorgement, d'extraction et d'amplification de l'ARN viral.

II – Recherche d'ARN viral

8. Extraction de l'ARN pour les organes infectés

L'extraction de l'ARN viral du VHC à partir de tissus de moustiques a été réalisée sous hotte, à l'aide du kit « High Pure RNA Tissue Kit » commercialisé par Roche.

9 Amplification de l'ARN viral

Les amorces utilisées ainsi que la sonde (pour la qPCR) ont été conçues pour l'amplification de la région conservée de l'extrémité 5' non codante du génome viral. Nous avons utilisé l'amorce sens 2CH (5'-AAC TAC TGT CTT CAC GCA GAA-3') (SEQ ID 1), localisée entre les nucléotides -289 et -269, et l'amorce antisens 1TS (5' GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT-3') (SEQ ID 2), localisée entre les nucléotides -70 et -90. La sonde utilisée pour la qPCR est la TM416 (5'-6Fam-AAC CCG CTC AAT GCC TGG A-Tamra-3') (SEQ ID 3) située entre les nucléotides -137 et-119.

La composition du mélange réactionnel pour la RT PCR classique et la qRT PCR est résumée dans le tableau suivant :

	RT-PCR classique			RT-PCR en temps réel		
	Conc. Initiale	Conc. Finale	Volume par tube (µl)	Conc. Initiale	Conc. Finale	Volume par tube (µl)
Tampon	5 X	1 X	12.5	5 X	1 X	4.8
dNTP	10mM		2	10mM		0.8
Amorce sens	10µM	0.6µM	0.75	10µM	0.6µM	0.3
Amorce antisens	10µM	0.6µM	0.75	10µM	0.6µM	0.3
Sonde	-	-	-	25µM	0.312µM	0.05
Eau qsp volume final	-	-	19.8	-	-	7.95
RNase OUT			1.2			0.4
RNA master Mix			3			1.2
Matrice (ARN)	-	-	10	-	-	4
	Volume final : 50µl			Volume final : 20µl		

La RT-PCR a été réalisée dans les conditions suivantes: La rétrotranscription se déroule pendant 30 minutes à 50°C, suivie par une étape de désactivation de la rétrotranscriptase (15 minutes à 95°C), puis 45 cycles de PCR alternant une étape d'élongation (1 minute à 63°C) et une étape de dénaturation (30 secondes à 90°C).

RESULTATS

Une première série d'expériences a révélé la présence de l'ARN viral chez *Aedes vexans* après 21 jours d'élevage. Les résultats sont illustrés à la figure 1, qui montre des quantités détectables du virus au jour 21.

Une seconde série d'expériences a été réalisée en parallèle sur *Culex pipiens* (Fig. 3), *Aedes vexans et Aedes caspius* (Fig. 2). Pour *Aedes*, les résultats obtenus dans l'expérience précédente sont confirmés. L'analyse par RT-PCR en temps réel de l'ARN total extrait des moustiques gorgés au sang virémique après 24 jours d'élevage montre clairement la présence d'ARN viral du VHC génotype lb, alors qu'il est totalement absent dans les individus témoins négatifs (Fig. 2).

Ces expériences montrent que :

a. Il est possible de détecter l'ARN viral présent dans les moustiques ; ceci valide le procédé d'extraction de l'ARN total à partir des moustiques complets et l'amplification par RT-PCR en temps réel du génome viral (capillaires 14, 15 et 16, Fig. 2).

b. L'ARN viral est totalement absent au sein des individus du genre *Culex* élevé jusqu'au 28ème jour (Fig. 3).

c. Enfin, il est totalement exclu que l'ARN détecté soit de l'ARN résiduel du fait de l'absence totale de cet ARN dans les moustiques *Culex* au J28 (Fig. 3, capillaires 6 à 17), comme il est exclu qu'il puisse s'agir d'une contamination, vu l'absence de tout ARN viral détectable au sein des témoins négatifs.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. Advances in Virus Research. 63 : 71-180.

(2) Bartenschlager R, Lohmann V (2001). Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. Antiviral Research. 52(1):1-17.

(3) Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. Journal of Experimental Medicine. 197(5) : 633-42.

(4) Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. Journal of Virology. 72(5) : 3827-36.

(5) Chang TT, Chang TY, Chen CC, Young KC, Roan JN, Lee YC, Cheng PN, Wu HL (2001). Existence of hepatitis C virus in *Culex quinquefasciatus* after ingestion of infected blood: experimental approach to evaluating transmission by mosquitoes. Journal of Clinical Microbiology. 39 (9) : 3353-5.

(6) Flint M, Quinn ER, Levy S (2001). In search of hepatitis C virus receptor(s). Clinical Liver Diseases. 5(4) : 873-93.

(7) Fouque F., Vazeille M, Mousson L, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Rodhain F, Failloux AB (2001). *Aedes aegypti* susceptibility to a Dengue virus. Tropical Medicine and International Health 6 (1) : 76-82.

(8) Germi R, Crance JM, Garin D, Zarski JP, Drouet E (2001). Hepatitis C virus culture systems. Pathologie-Biologie. (Paris). 49(3) : 255-61.

(9) Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Thelu MA, Jouan A, Zarski JP, Drouet E (2001). Mosquito cells bind and replicate hepatitis C virus. Journal of Medical Virology. 64 (1) : 6-12.

(10) Silverman AL, McCray DG, Gordon SC, Morgan WT, Walker ED (1996). Experimental evidence against replication or dissemination of hepatitis C virus in mosquitoes (*Diptera:Culicidae*) using detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Journal of Medical Entomology. 33 (3) : 398-401.

(11) Wakita T *et al.* (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nature Medicine. 11(7) : 791-6.

REVENDICATIONS

1/ Procédé d'amplification *in vivo* du virus de l'hépatite C (VHC) comprenant les étapes suivantes :

a/ ingestion de la source virale par des moustiques femelles *Aedes vexans ou Aedes caspius* ;

b/ élevage des moustiques pendant le temps nécessaire à l'amplification du virus.

2/ Procédé selon la revendication 1, ***caractérisé*** en ce que les moustiques sont issus de souches sauvages.

3/ Procédé selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce que la source virale est supplémenté en globules rouges, et éventuellement en ATP.

4/ Procédé selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce que l'ingestion de la source virale par les moustiques est réalisée par repas sanguin, avantageusement à l'aide de la technique de gorgement.

5/ Procédé selon la revendication 4, ***caractérisé*** en ce que la technique de gorgement met en œuvre une peau de poulet.

6/ Procédé selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce que la source virale est du sérum, avantageusement d'origine humaine.

7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, ***caractérisé*** en ce que la source virale comprend du virus atténué.

8/ Procédé selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce que l'ingestion se fait à hauteur d'au moins 1000 copies du virus / moustique.

9/ Procédé selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce que l'élevage des moustiques est réalisé pendant un temps allant de 15 à 30 jours, avantageusement pendant environ 20 jours.

10/ Procédé selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce qu'à la fin du temps d'élevage, le virus est récupéré à partir des tissus de moustique.

11/ Tissu d'*Aedes* porteur du VHC susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 10.

12/ Cellule d'*Aedes* porteuse du VHC susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 10.

13/ Procédé d'obtention de cellules productrices *in vitro* de VHC comprenant la culture de cellules selon la revendication 12 en présence de cellules de type AP61 ou C6/36.

14/ Cellule de moustique productrice *in vitro* de VHC susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 13.

15/ Utilisation des cellules selon les revendications 12 ou 14 pour la production de particules virales, pour la production d'anticorps ou pour la préparation d'un vaccin.

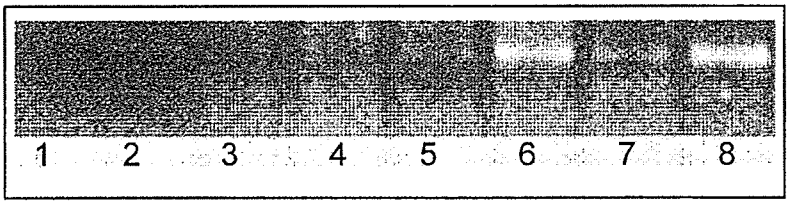
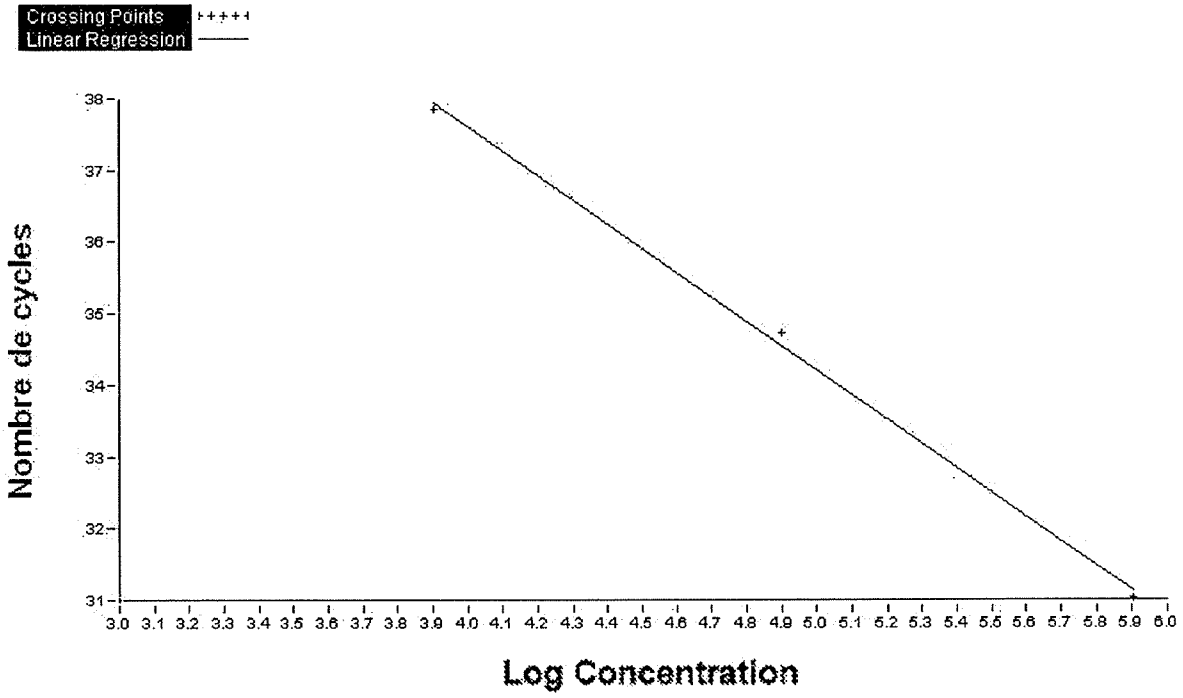


Figure 1

A/



B/

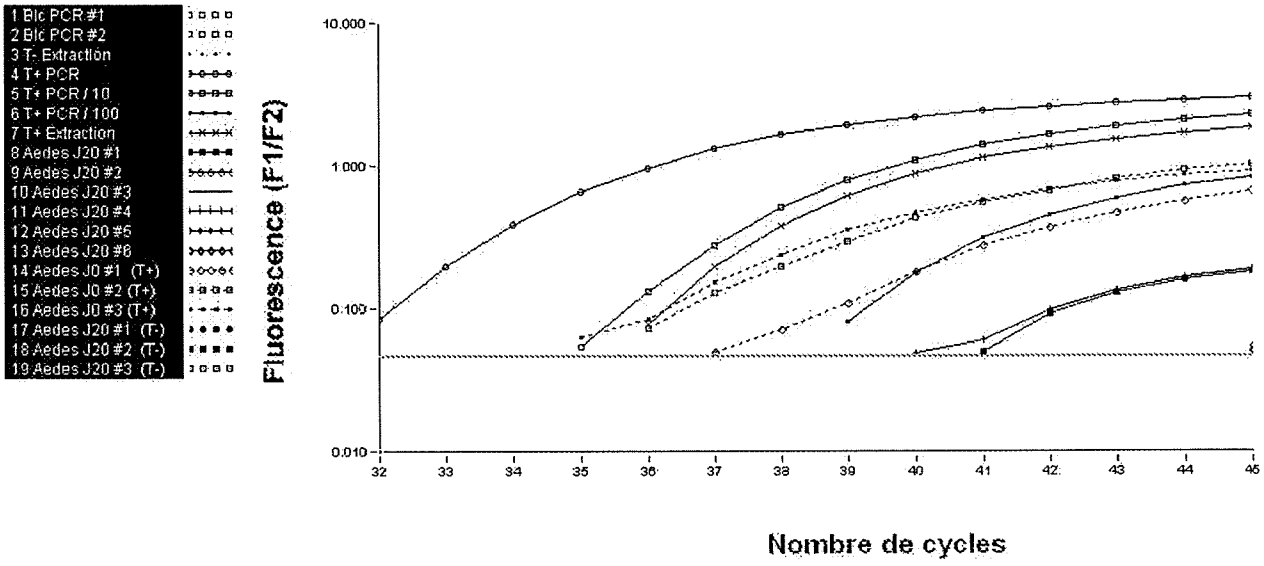
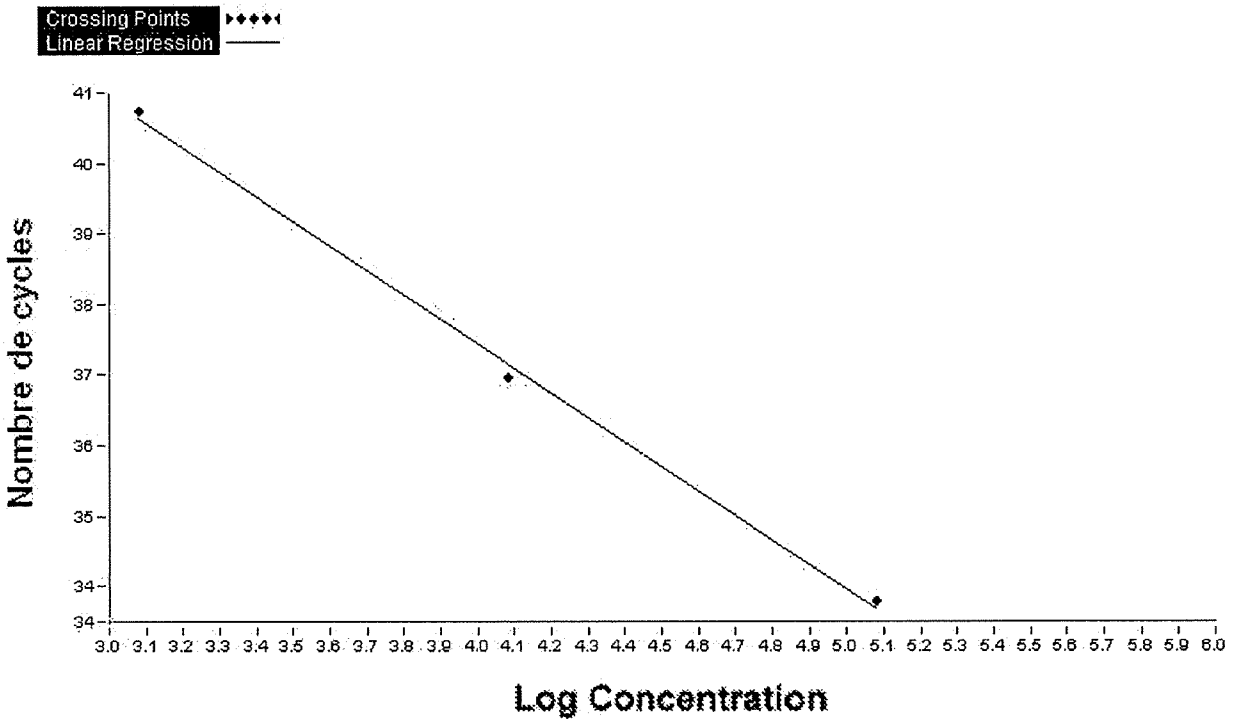


Figure 2

A/


Crossing Points
Linear Regression
Nombre de cycles
41
40
39
38
37
36
35
34
34
3.0 3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6 3.7 3.8 3.9 4.0 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 4.9 5.0 5.1 5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 5.7 5.8 5.9 6.0
Log Concentration

B/

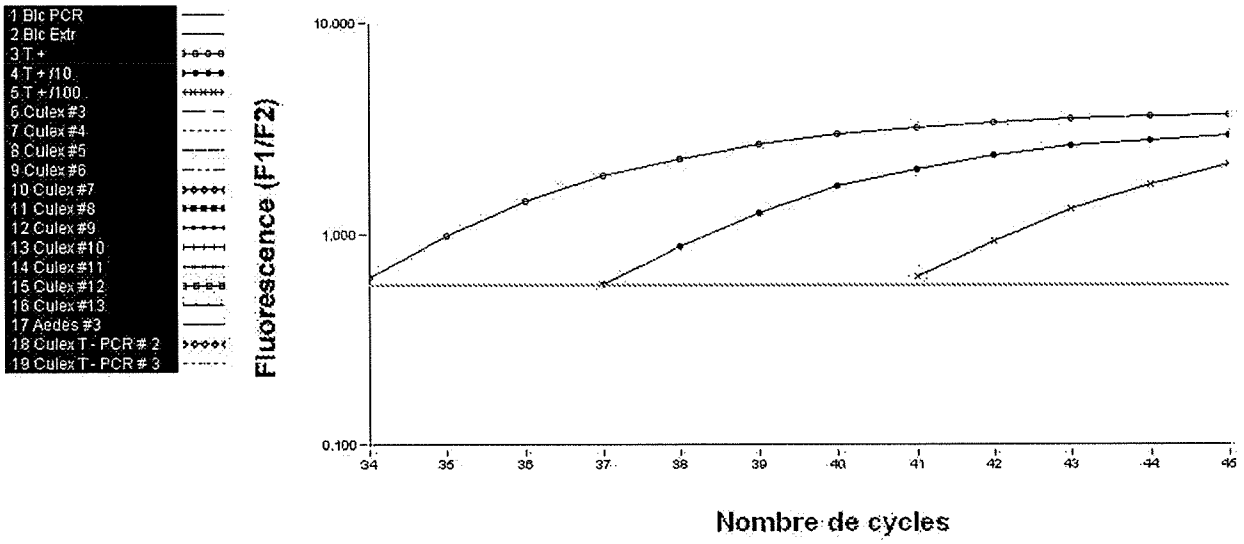

1 Blc PCR
2 Blc Extr
3 T +
4 T + /10
5 T + /100
6 Culex #3
7 Culex #4
8 Culex #5
9 Culex #6
10 Culex #7
11 Culex #8
12 Culex #9
13 Culex #10
14 Culex #11
15 Culex #12
16 Culex #13
17 Aedes #3
18 Culex T - PCR # 2
19 Culex T - PCR # 3
Fluorescence (F1/F2)
10,000
1,000
0,100
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
Nombre de cycles

Figure 3

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

<120> PROCEDE D'AMPLIFICATION DU VHC CHEZ LES MOUSTIQUES Aedes

<130> U19-B-23637FR

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> 2CH

<400> 1
aactactgtc ttcacgcaga a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> 1TS

<400> 2
gcgacccaac actactcggc t 21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> TM416

<400> 3
aacccgctca atgcctgga 19

N° d'enregistrement national : 06 55935 N° de publication :

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☐ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

N° d'enregistrement national : 06 55935 N° de publication :

1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

NEANT

2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

HASSAN MOSTAFA I ET AL: "Experimental demonstration of hepatitis C virus (HCV) in an Egyptian strain of Culex pipiens complex." JOURNAL OF THE EGYPTIAN SOCIETY OF PARASITOLOGY,vol. 33, no. 2, août 2003 (2003-08), pages 373-384, XP009084670 ISSN: 1110-0583

CHANG TING-TSUNG ET AL: "Existence of hepatitis C virus in Culex quinquefasciatus after ingestion of infected blood: Experimental approach to evaluating transmission by mosquitoes" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 9, septembre 2001 (2001-09), pages 3353-3355, XP002436488 ISSN: 0095-1137

FR 2 793 258 A1 (FRANCE ETAT FR) 10 novembre 2000 (2000-11-10)

GERMI RAPHAELE ET AL: "Mosquito cells bind and replicate hepatitis C virus" JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 64, no. 1, mai 2001 (2001-05), pages 6-12, XP002436489 ISSN: 0146-6615

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT

ANNEXE – 2

Mutations dans la protéine NS5B du VHC

ECULLY, le 23 Juin 2008

U19-B-27 179 FR
2nd PROJET

TITRE : **MUTATIONS DANS LA PROTEINE NS5B DU VHC**

TITRE ABREGE: **VHC MUTE**

DEPOSANTS : **UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**
621 Avenue Centrale
F-38041 GRENOBLE Cédex 9

Forme Juridique : **Université Publique à Caractère Scientifique et Culturel**

INSTITUT PASTEUR

INVENTEURS : ***Emmanuel DROUET***
Yassine RECHOUM

RECHERCHE D'ANTERIORITES : **IMMEDIATE**

MUTATIONS DANS LA PROTEINE NS5B DU VHC

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne l'identification de nouvelles mutations présentes dans la protéine NS5B du virus de l'Hépatite C (VHC) amplifié dans des moustiques du genre *Aedes*.

L'identification de telles mutations, associées à une réplication efficace, offre des perspectives prometteuses notamment dans le cadre des réplicons.

ETAT ANTERIEUR DE LA TECHNIQUE

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié comme étant responsable de l'hépatite non A non B développée, évoluant fréquemment vers des pathologies chroniques malignes, du type cirrhose du foie ou encore carcinome hépato-cellulaire. Il est estimé qu'environ 3% de la population mondiale est infectée par le virus VHC, avec une augmentation des infections de 3 à 4 millions de personnes par année (Neumayr *et al.*, 2000).

Le VHC, membre du genre Hepacivirus, appartient à la famille des *Flaviviridae* qui sont des virus à ARN monobrins enveloppés, parmi lesquels on rencontre les virus responsables de maladies épidémiques majeures telles que la Fièvre Jaune (YF), la Dengue (DEN) et la Dengue Hémorragique (DHF), l'Encéphalite Japonaise (JE), l'Encéphalite de Saint-Louis (SLE), la fièvre de West Nile (WN) et l'Hépatite C (HC) pour ne citer que les plus importantes.

Une majorité de *Flavivirus* sont transmis par des insectes vecteurs, selon des modalités épidémiologiques très différentes. Certaines maladies sont typiquement humaines et ne touchent jamais les animaux comme la DEN et la DHF ; d'autres infections sont plutôt zoonotiques et touchent plus ou moins accidentellement l'être humain, comme la JE, la SLE et le WN. Enfin certains *Flavivirus* peuvent circuler de façon épidémique aussi bien dans des populations humaines qu'animales (WN). Ces modalités épidémiologiques différentes ont pourtant des bases communes telles qu'une amplification virale dans des cellules d'insectes.

Concernant le VHC, les voies de transmission aujourd'hui bien établies sont : transmission par les produits sanguins et dérivés du sang, toxicomanie, et contexte nosocomial. Toutefois, 30 à 40% des infections à VHC aujourd'hui répertoriées chez l'homme ont une origine inexpliquée, dans la mesure où aucune des conditions listées n'est réunie (Neumayr *et al.*, 2000).

Le génome du VHC est constitué d'un ARN simple brin de 9,5 kilobases environ, qui code une polyprotéine précurseur d'environ 3000 acides aminés. Cette polyprotéine est constituée des protéines virales dans l'ordre qui suit : C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B.

Parmi les protéines non structurales, NS5B correspond à une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), décrite par exemple dans le document WO 96/37619.

La réplication efficace du VHC en culture cellulaire a été associée à des mutations adaptatives qui augmentent fortement l'efficacité de réplication, identifiées notamment dans le gène codant NS5B. Ainsi, le document WO 2005/047463 décrit 3 mutations (sérine en position 24, isoleucine en position 31 et leucine en position 392) dans NS5B d'un VHC de génotype 2b, augmentant l'efficacité d'un réplicon intégrant cette séquence.

Or, dans la lutte menée contre les hépatites virales de type C, un obstacle majeur entravant le développement d'un traitement et d'un vaccin efficace est l'absence d'un système permettant la multiplication à haut niveau du virus *in vitro*. Il existe donc un besoin persistant de développer des systèmes, notamment des réplicons plus efficaces.

EXPOSE DE L'INVENTION

Il s'avère que le Demandeur a réussi à obtenir une amplification *in vivo* du virus de l'hépatite C (VHC) dans des moustiques du genre *Aedes*.

De manière privilégiée, la charge virale utilisée provient d'un sérum, avantageusement d'origine humaine, par exemple celui d'un porteur d'hépatite chronique VHC de génotype 1b.

Après un cycle d'amplification d'une durée moyenne de 21 jours, l'analyse du génome du VHC ayant été efficacement répliqué a révélé la présence de mutations dans NS5B.

Ainsi et selon un premier aspect, la présente invention a trait à une protéine NS5B du virus de l'hépatite C (VHC) mutée, performante pour la réplication.

On entend par « protéine NS5B du VHC », l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) codée par l'extrémité 3' du génome virale.

Bien que susceptible de variations, cette protéine a été caractérisée comme comportant 591 résidus ou acides aminés, qui se retrouve dans les différents génotypes de virus, en particulier 1b ou 2b.

La séquence disponible dans les bases de données sous le numéro EF507504 a été choisie comme référence. Elle correspond à un génome entier de sérotype 1b. La région 3' de la polyprotéine code la protéine NS5B qui présente la séquence identifiée SEQ ID NO : 1 dans le cadre de la présente demande.

Ainsi et dans le cadre de l'invention, on entend avantageusement par « protéine NS5B du VHC », une protéine présentant au moins 70% d'identité, avantageusement 80%, voire 85%, 90%, voire même 95% d'identité avec la présente séquence SEQ ID NO : 1. Avantageusement, il s'agit d'un équivalent fonctionnel la séquence SEQ ID NO : 1, pour lequel l'activité enzymatique peut être aisément testée à l'aide du test décrit dans le document Lohmann *et al.* de 1997.

Ainsi, il a été déterminé qu'une protéine d'intérêt selon l'invention portait une mutation à l'une au moins des positions suivantes :

- à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 ; et/ou
- à la position correspondant au résidu 265 de SEQ ID NO : 1 ; et/ou
- à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1.

Il est à noter que ces mutations présentent la particularité d'être localisées dans le site actif de cette protéine. En effet, Lohmann *et al.* (1997) ont mis en évidence 4 motifs d'acides aminés qui s'avèrent essentiels pour l'activité de la polymérase NS5B de VHC. En particulier, il a été montré qu'un remplacement de l'acide aspartique (Asp ou D) à la position 220, de la glycine (Gly ou G) à la position 283 ou de l'acide aspartique (Asp ou D) à la position 318 supprimait totalement l'activité enzymatique. On constate que les 3 résidus visés par la présente invention sont situées au sein de cette région cruciale.

Avantageusement, le résidu à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 n'est pas un acide aminé choisi dans la groupe suivant : valine (Val ou V), leucine (Leu

ou L), isoleucine (Ile ou I) et cystéine (Cys ou C). Encore plus avantageusement, le résidu à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 est un résidu alanine (Ala ou A).

Avantageusement, le résidu observé à la position correspondant au résidu 265 de SEQ ID NO : 1 n'est pas une proline (Pro ou P). Encore plus avantageusement, il s'agit d'une serine (Ser ou S).

Avantageusement, le résidu à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1 n'est pas un acide aminé choisi dans la groupe suivant : asparagine (Asn ou N), cystéine (Cys ou C) et histidine (His ou H). Encore plus avantageusement, le résidu à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1 est un résidu acide aspartique ou aspartate (Asp ou D).

Il apparaît que dans la séquence SEQ ID NO : 1, le résidu à la position 262 est une valine (Val ou V), celui à la position 265 est une proline (Pro ou P) et celui à la position 316 est une asparagine (Asn ou N).

Ces résidus sont également retrouvés aux positions 47, 50 et 101 de la séquence SEQ ID NO : 2 correspondant aux résidus 216 à 345 de NS5B codé par le génome viral ayant servi à l'infection au jour 0 (D0), même si par ailleurs des divergences ponctuelles sont observées.

L'expression « position correspondant au résidu » indique que la numérotation exacte des acides aminés peut varier en fonction des séquences. Ainsi, une position correspondante peut être identifiée en alignant les séquences de manière à obtenir le plus haut degré d'homologie autour de la position en question.

En effet, il est à noter que les séquences de NS5B rapportées dans la littérature présentent certes une forte homologie mais également des divergences ponctuelles.

Ainsi, dans la référence WO 96/37619, et plus précisément dans la séquence SEQ ID NO : 1 de ce document qui correspond à NS5B, les résidus aux positions 265 et 316 sont bien une proline et une asparagine, respectivement. En revanche, la position 262 correspond à une isoleucine et non à une valine, mais n'est pas une alanine comme dans la présente invention.

En ce qui concerne la référence WO 2005/047463, et plus précisément dans la séquence SEQ ID NO : 1 de ce document qui correspond à NS5B issu d'un VHC de génotype 2b,

les résidus aux positions 262 et 265 sont bien une valine et une proline, respectivement. En revanche, la position 316 correspond à une cystéine et non à une asparagine, mais n'est pas un acide aspartique comme dans la présente invention.

A la connaissance du Demandeur, c'est la première fois que des mutations aux positions particulières identifiées sont rapportées.

Selon un mode de réalisation avantageux, la protéine NS5B selon l'invention porte les trois mutations décrite ci-dessus.

De fait, en comparant les régions allant des acides aminés 216 à 345 de NS5B entre le jour 0 (D0) et le jour 21 (D21), c'est à dire en comparant les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3, seuls les trois résidus à ces trois positions divergent.

Ainsi et selon un mode de réalisation privilégiée, une protéine NS5B selon l'invention comprend la séquence SEQ ID NO : 3. En d'autres termes et en partant d'une protéine NS5B « sauvage », il est possible de remplacer les résidus aux positions 262, 265 et 316 par une alanine, une sérine et un acide aspartique, respectivement, ou bien remplacer la région 216-345 par la séquence SEQ ID NO : 3.

Sont également visés des fragments de la protéine NS5B selon l'invention, lesdits fragments comportant au moins une mutation ponctuelle à l'une des trois positions clefs identifiées dans le cadre de la présente invention. Avantageusement, il s'agit de fragments fonctionnels dont l'activité RdRp peut être aisément testée à l'aide du test décrit dans le document Lohmann *et al.* de 1997.

Un autre aspect de l'invention concerne une séquence d'acide nucléique codant une protéine NS5B mutée telle que décrite ci-dessus.

On entend par « acide nucléique » aussi bien une molécule d'ADN que d'ARN. Les séquences nucléiques présentées dans la cadre de l'invention correspondent à de l'ADN mais les séquences ARN correspondantes sont aisément déduites par l'homme du métier en remplaçant T par U.

Par ailleurs, une séquence d'acide nucléique selon l'invention peut aussi bien correspondre strictement à la partie codant NS5B, qu'à un génome entier de VHC portant les mutations définies ci-dessus.

Avantageusement, le codon codant le résidu correspondant à la position 262 de NS5B doit coder pour une alanine et peut donc correspondre à GCA, GCC, GCG ou GCT.

Avantageusement, le codon codant le résidu correspondant à la position 265 de NS5B doit coder pour une sérine et peut donc correspondre à TCA, TCC, TCG, TCT, AGC ou AGT.

Avantageusement, le codon codant le résidu correspondant à la position 316 de NS5B doit coder pour un acide aspartique et peut donc correspondre à GAC ou GAT.

A titre d'illustration, la séquence codant la portion 216 à 345 de NS5B du VHC au jour 0 (D0) apparaît à la séquence SEQ ID NO : 4.

En comparaison, la séquence codant cette même portion au jour 21 (D21) apparaît à la séquence SEQ ID NO : 5.

Ainsi, on constate aux positions 139 à 141 de SEQ ID NO : 4 ou 5 (codant le résidu à la position 47 des séquences SEQ ID NO : 2 et 3 ou à la position 262 de la séquence SEQ ID NO : 1), le codon GTC (SEQ ID NO : 4) codant une valine devient un codon GCC (SEQ ID NO : 5) codant une alanine.

De même, on constate aux positions 148 à 150 de SEQ ID NO : 4 ou 5 (codant le résidu à la position 50 des séquences SEQ ID NO : 2 et 3 ou à la position 265 de la séquence SEQ ID NO : 1), le codon CCC (SEQ ID NO : 4) codant une proline devient un codon TCC (SEQ ID NO : 5) codant une sérine.

Enfin, on constate aux positions 301 à 303 de SEQ ID NO : 4 ou 5 (correspondant à la position 101 des séquences SEQ ID NO : 2 et 3 ou à la position 316 de la séquence SEQ ID NO : 1), le codon AAC (SEQ ID NO : 4) codant une asparagine devient un codon GAC (SEQ ID NO : 5) codant un acide aspartique.

Typiquement, une séquence d'acide nucléique selon l'invention peut donc comprendre la séquence SEQ ID NO : 5.

Dans le cadre de la présente demande, il est décrit 3 mutations adaptatives susceptibles d'améliorer la réplication du VHC. Les séquences mises en évidence trouvent donc de nombreuses applications, notamment dans le cadre de vecteurs ou de réplicons.

Ainsi, un autre aspect de l'invention vise un vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique selon l'invention. Avantageusement, cette séquence est placée sous le contrôle de séquences régulatrices aptes à assurer son expression, notamment un promoteur. En particulier, ce mode de réalisation permet la production d'une protéine NS5B mutée portant au moins une, voire les trois mutations identifiées ci-dessus.

Selon un autre aspect, c'est un réplicon qui contient une séquence selon l'invention. Un réplicon VHC est une molécule d'ARN capable de se répliquer de manière autonome en culture cellulaire et qui produit des niveaux détectables d'une ou plusieurs protéines virales. Le réplicon du VHC exprime les composants dérivés du VHC de la machine de réplication et contient des éléments cis requis pour la réplication en culture cellulaire.

Des réplicons du VHC existent déjà, tel que, par exemple, celui décrit dans le document EP 1 666 598. Il est donc possible de modifier la séquence codant NS5B dans ce réplicon aux positions et à l'aide des mutations décrites ci-dessus. Alternativement, il est possible de remplacer la région du réplicon codant NS5B par une séquence selon l'invention. On obtient alors un réplicon chimérique. Il est ainsi possible d'augmenter l'efficacité de réplicons déjà existants.

Sont aussi visées par l'invention des cellules hôtes comprenant des vecteurs ou des réplicons tels que définis précédemment. De manière privilégiée, ces cellules sont issues de moustiques, avantageusement du genre *Aedes*. Sans vouloir être lié à une quelconque théorie, il est supposé que ces mutations résultant d'une sélection chez ce moustique, la combinaison de cet hôte et de la protéine NS5B mutée selon l'invention devrait donner lieu à un système de réplication particulièrement efficace.

Ces systèmes de réplication *in vitro* offrent de nombreuses perspectives. Ainsi, ils permettent de tester la capacité d'un composé à inhiber l'activité réplicative et constituent donc des outils de criblage pour des molécules thérapeutiques contre le VHC.

EXEMPLES DE REALISATION

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation suivants, à l'appui des figures annexées. Ceux-ci ne sont cependant en aucun cas limitatifs.

La figure 1 illustre la compétence de moustiques pour la réplication du VHC, 21 jours après la mise en contact entre le moustique et le virus. La compétence dépend du genre du moustique : Le génome du VHC a été détecté par qRT-PCR, 21 jours après incubation avec le virus dans les moustiques du genre *Aedes* mais pas dans ceux du genre *Culex*.

La figure 2 illustre l'évolution de la détection du génome viral dans les corps et les têtes des moustiques. Les extraits d'ARN totaux ont été analysés après qRT-PCR, précédée par amplification totale du transcriptome (« whole transcriptome amplification « ou WTA). Dès le 15ème jour, la combinaison WTA-qPCR révèle la présence du génome VHC dans la tête des moustiques.

La figure 3 représente l'alignement de séquences de la région amplifiée de NS5B. La région NS5B 8228-8628 des moustiques positifs a été séquencée au jour 21 (D21) et comparée à celle des moustiques infectieux au jour 0 (D0). La séquence NS5B correspondant à la séquence EF407504 a servi de références. Les triangles montrent les acides aminés mutés au jour 21 (262 Val/Ala, 265 Pro/Ser, 316 Asn/Asp). L'analyse de séquence a porté sur 2 régions du génome viral car elles sont fréquemment séquencées et très informatives au niveau phylogénique : la région 5'UTR est une région hautement conservée alors que le gène NS5B a été rapporté comme étant particulièrement affecté par des mutations adaptatives pendant la phase aiguë d'infection (Kuntzen *et al.*, 2007).

PARTIE EXPERIMENTALE

I - Infections expérimentales

1. Elevage des espèces testées

Les individus testés proviennent d'un élevage réalisé à partir de moustiques (oeufs, larves et adultes) collectés sur le terrain dans la zone urbaine de Marseille pour l'espèce *Culex pipiens* et dans la réserve de la Tour du Valat en Camargue pour les espèces *Aedes vexans* et *Aedes caspius.* Ces élevages ont été réalisés dans les locaux de l'ENSAM situés au Domaine du Merle, à Salon de Provence. Ces élevages sont réalisés dans un insectarium classique, aux normes d'élevage. Les larves sont nourries avec de la levure de bière et de l'alimentation pour poisson et les adultes sont nourris avec une solution de sucrose. Les

repas sanguins des *Culex* et *Aedes* sont composés de globules rouges lavés de mouton, le but du lavage étant d'éliminer l'interférence des éléments du sang.

2. Introduction des moustiques dans le Laboratoire Sécurisé (niveau 2+)

Au jour J-1, les moustiques femelles sont répartis en lots, placés dans les boites de gorgement avec un coton humide sur chaque boite et introduits dans le laboratoire sécurisé. Les moustiques sont conservés à température et humidité contrôlées (T = 25°C ± 2, RH 80% ± 10).

3. Introduction du virus VHC dans le Laboratoire L2+

Au jour J0, la solution virale contenant du virus VHC (sérum de patient porteur d'hépatite chronique à $2^{E}6$ copies/ml) est transportée par transporteur spécial jusqu'au L2+ où sont placés les moustiques. La solution virale est fournie par le Laboratoire UVHCI (Unit of Virus Host Cell Interactions) La solution virale est conservée dans le congélateur à -80°C du L2+.

4. Préparation de la solution sanguine infectée

Au jour J0, le mélange globules rouges lavés (sang de mouton) non-infectés et solution virale est réalisé, de manière à obtenir un titre suffisant pour infecter des moustiques (~1500 copies / moustique). De l'ATP est rajouté pour rendre le sang plus attractif et augmenter l'appétence des femelles. Chaque moustique prend entre 3 et 5 µl par repas de sang.

5. Infection des lots de femelles

Au jour J0, le gorgeoir contenant le sang infecté et chauffé à 37°C est présenté aux femelles, privées de glucose depuis 24 heures. Le gorgeoir est posé sur chaque boite et laissé sur place environ 4 heures pour la prise de repas sanguin. En parallèle, le gorgeoir avec du sang non contaminé est présenté au lot de femelles témoins négatifs. Au bout de la durée de gorgement des femelles, celles-ci sont récupérées par l'aspirateur à bouche, endormies par les vapeurs de chloroforme puis triées sous loupe binoculaire. Les femelles ayant gorgé du sang sont remises dans les cages. Un gîte artificiel est laissé dans chaque cage métallique à la disposition des femelles pour la ponte (bac d'eau pour les femelles *Aedes* et terre humide pour les femelles *Culex).* A partir de ce jour, les cages métalliques contenant les femelles gorgées ne sont ni ouvertes, ni manipulées jusqu'au sacrifice des moustiques.

6. Entretien des lots de femelles

Les lots de femelles sont maintenus à une température constante d'environ 28°C et avec

une humidité contrôlée d'au moins 70%. Chaque jour, les femelles sont nourries grâce à du coton imbibé d'une solution de glucose à 10 % déposé sur la cage métallique. Les gîtes de ponte sont humidifiés à travers la cage avec une pissette.

7. Traitement des femelles

Aux jours de prélèvement, les moustiques sont sacrifiés en plaçant la cage métallique au froid. Les moustiques sont ensuite placés dans des tubes 1,5 ml, identifiés et remis au congélateur jusqu'à l'étape d'extraction d'ARN avant les PCR. Les témoins négatifs, gorgés sur sang non virémique sont aussi sacrifiés. Le lot de moustiques, sacrifié au jour J0 et mis au congélateur à -80°C, constitue les témoins positifs J0 de gorgement, d'extraction et d'amplification de l'ARN viral.

II – Recherche d'ARN viral

8. Extraction de l'ARN pour les organes infectés

L'extraction de l'ARN viral du VHC à partir de tissus de moustiques a été réalisée sous hotte, à l'aide du kit « High Pure RNA Tissue Kit » commercialisé par Roche.

9. Amplification de l'ARN viral

Les amorces utilisées ainsi que la sonde (pour la qPCR) ont été conçues pour l'amplification de la région conservée de l'extrémité 5' non codante du génome viral. Nous avons utilisé l'amorce sens 2CH (5'-AAC TAC TGT CTT CAC GCA GAA-3') (SEQ ID NO : 6), localisée entre les nucléotides -289 et -269, et l'amorce antisens 1TS (5' GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT-3') (SEQ ID NO : 7), localisée entre les nucléotides -70 et -90. La sonde utilisée pour la qPCR est la TM416 (5'-6Fam-AAC CCG CTC AAT GCC TGG A-Tamra-3') (SEQ ID 8) située entre les nucléotides -137 et-119.

La composition du mélange réactionnel pour la RT PCR classique et la qRT PCR est résumée dans le tableau suivant :

	RT-PCR classique			RT-PCR en temps réel		
	Conc. Initiale	Conc. Finale	Volume par tube (µl)	Conc. Initiale	Conc. Finale	Volume par tube (µl)
Tampon	5 X	1 X	12.5	5 X	1 X	4.8
dNTP	10mM		2	10mM		0.8
Amorce sens	10µM	0.6µM	0.75	10µM	0.6µM	0.3
Amorce antisens	10µM	0.6µM	0.75	10µM	0.6µM	0.3
Sonde	-	-	-	25µM	0.312µM	0.05
Eau qsp volume final	-	-	19.8	-	-	7.95
RNase OUT			1.2			0.4
RNA master Mix			3			1.2
Matrice (ARN)	-	-	10	-	-	4
	Volume final : 50µl			Volume final : 20µl		

La RT-PCR a été réalisée dans les conditions suivantes: La rétrotranscription se déroule pendant 30 minutes à 50°C, suivie par une étape de désactivation de la rétrotranscriptase (15 minutes à 95°C), puis 45 cycles de PCR alternant une étape d'élongation (1 minute à 63°C) et une étape de dénaturation (30 secondes à 90°C).

10. Séquençage de la région (52-271) correspondant à l'IRES et de la région (8228-8628) correspondant à une partie du gène NS5b du génome viral extrait des moustiques positifs à J0 et J21 :

L'ARN viral a été extrait selon le protocole du point 8.

Le séquençage a été réalisé à partir des extraits d'ARN totaux des moustiques identifiés comme contenant le génome du VHC par qRT-PCR.

Les étapes du séquençage sont dans l'ordre :

a) Amplification : Les régions à séquencer ont d'abord été amplifiées par qRT-PCR en utilisant les amorces adéquates. Pour la région 52-271 de l'IRES, les amorces 1TS (SEQ ID NO : 7) et 2CH (SEQ ID NO : 6) décrites plus haut ont été utilisées. Pour la région 8228-8628 nucléotides du gène NS5b, les amorces 1PR et 2PR décrites dans la référence Sandres-Sauné *et al.* de 2003.

b) Migration sur gel : Les produits d'amplification sont mis à migrer dans un gel à 1% d'agarose avec un marqueur de poids moléculaire. A la fin de la migration, les amplicons ont été révélés par du BET. La bande d'intérêt a été découpée et les séquences contenues dans la bande, extraites du gel.

c) Clonage : Le clonage a été réalisé dans le vecteur pUC18. Afin de pouvoir réaliser les insertions, les sites de restriction (correspondants aux enzymes de restriction) présents sur le vecteur pUC18 et absents sur les amplicons ont été déterminés : les sites *Eco*RI et *Hind*III ont été sélectionnés. De nouveaux couples d'amorces ont été choisis à partir des amorces décrites plus haut, auxquelles deux courtes séquences ont été rajoutées de part et d'autre, l'une contenant le site de restriction de *Eco*RI et l'autre le site de restriction *Hind*III, afin que l'amplicon puisse être introduit dans le vecteur ouvert et déphosphorylé.

d) Transformation : Le produit de clonage a été introduit dans les bactéries compétentes TOP10. Les bactéries ont ensuite été étalées dans des boites de Petri contenant de la gélose LB agar-Ampicilline. Enfin, elles ont été incubées pendant la nuit à 37°C.

e) Contrôle qualité du clonage : Afin de vérifier que les bactéries ayant poussé contenaient l'insert, une PCR a été réalisée directement sur les bactéries : les clones ayant poussé ont été repiqués par la pointe d'un cône de 10µl, la pointe a d'abord été trempée dans un tube pour PCR contenant le master mix (voir composition plus haut), puis a servi pour inoculer la boite de pétri contenant de la gélose LB agar-Ampicilline. A la fin de l'étape de repiquage, la PCR a été lancée et les boites de Petri ont été incubées à 37°C pendant la nuit.

f) Les produits de PCR sont mis à migrer dans un gel à 1% d'agarose avec marqueur de poids moléculaire. A la fin de la migration, les amplicons ont été révélés par du BET. Les clones qui contenaient la bande ayant la bonne taille ont été amplifiés afin de produire des quantités suffisantes de plasmides pour le séquençage.

g) Miniprépartaion : les plasmides ont été extraits des bactéries.

h) Séquençage : le séquençage a été réalisé automatiquement par la société MWG. Les amorces universelles M13 ont été utilisées. La lecture a été faite dans les deux sens pour plus de précision et de fiabilité.

Trois expériences ont été réalisées :

(i) Expérience 1 : Des femelles de *Ae. vexans* ont été collectées au stade larvaire et ont été testées à un âge inférieur à 10 jours. Environ 20 moustiques ont été nourris avec une suspension contenant 10^6 copies du VHC par millilitre. Après 21 jours d'élevage, les moustiques ont été congelés et leur ARN extrait. Une RT-PCR ponctuelle finale a révélé des signaux positifs correspondant à la présence de génome du VHC dans 3 moustiques sur 5 (résultats non montrés).

(ii) Expérience 2 : Pour tester la spécificité génique, 36 *Aedes sp.* et 15 *Culex pipiens* ont été nourris avec une suspension contenant $8{,}3.10^5$ copies du VHC par millilitre et élevés pendant 21 jours. La qRT-PCR réalisés sur les extraites de moustique correspondant au 21ème jour d'élevage a révélé la présence du génome du VHC dans 33% (2/6) des moustiques *Aedes sp.*. Au contraire, l'ARN du VHC n'a jamais été détecté dans les moustiques *Culex sp*. (Figure 1).

Une caractéristique commune à la réplication des virus à ARN est l'apparition de mutations adaptatives. Pour tester cela, les séquences d'ARN du VHC extraits de moustiques positifs à 21 jours (D21) après infection ont été comparées à des échantillons au jour 0 (D0). Deux régions du génome du VHC ont été sélectionnées : 220 nucléotides (région 52-271) de la région 5'UTR (5' untranslated region ») et 400 nucléotides (région 8228-8628) de la partie codant la protéine non structurale 5B (NS5B ou RdRP pour « RNA dependent RNA polymerase). Aucune mutation n'a été notée dans les 220 nucléotides analysés de la région 5'UTR. En revanche, 3 mutations adaptatives (262Val/Ala, 265 Pro/Ser et 316 Asn/Asp) ont été identifiées parmi les 400 nucléotides de RdRP qui correspondent au site actif (Figure 3).

(iii) Expérience 3 : 124 *Ae. caspius* et 85 *Ae. vexans* ont été nourris avec une suspension contenant $1{,}2.10^6$ copies du VHC par millilitre et élevés pendant 15 jours. Tous les moustiques ont été disséqués pour séparer les têtes (incluant les glandes salivaires) et les corps (incluant le mésentère). La présence du VHC a été recherchée sur des échantillons au jour 0, 4, 8 et 15. Pour obtenir une plus grande sensibilité, la RT-PCR quantitative (qRT-PCR) a été précédée par une pré-amplification du transcriptome entier via la technique WTA (« Whole Transcriptome Amplification »). Dans ces conditions, l'ARN du VHC n'a été détecté que dans les têtes des moustiques correspondant au 15ème jour d'élevage (Figure 2). Le signal positif ne pouvait pas être dû au virus résiduel, puisque le génome viral était totalement absent dans les têtes des moustiques au jour initial (D0), même en combinant WTA et qPCR.

Ainsi, le cycle extrinsèque du VHC, défini comme le temps nécessaire au parasite pour se répliquer chez son hôte, a pu être estimé comme étant supérieur à 15 jours à une température ambiante de 25°C. A ce stade, on peut suggérer que le VHC ingéré pourrait i) passer par les tissus du mésentère du moustique, ii) se répliquer dans les autres tissus en particulier les glandes salivaires.

Pris ensemble avec les mutations adaptatives identifiées, ces résultats apportent les premiers éléments en faveur de la compétence de certains moustiques, en particulier *Ae. caspius* et *Ae. vexans*, pour répliquer le VHC naturel.

REFERENCES

Kuntzen, T. *et al*. Viral Sequence Evolution in Acute Hepatitis C Virus Infection. *J Virol*. **81 (21)**, 11658–11668 (2007).

Lohman, V. *et al*. 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(11)**, 8416-8428 (1997).

Neumayr, G., Propst, A., Schwaighofer, H., Judmaier, G. & Vogel, W. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *Q J Med*. **92**, 505-508 (2000).

Sandres-Sauné K. *et al*. Determining Hepatitis C Genotype by analyzing the sequence of the NS5B region. *J Virol*. *Methods* **109 (2)**, 187–93 (2003).

REVENDICATIONS

1/Protéine NS5B du virus de l'hépatite C (VHC) portant une mutation ponctuelle à au moins l'une des positions suivantes :

- à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 ; et/ou
- à la position correspondant au résidu 265 de SEQ ID NO : 1 ; et/ou
- à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1.

2/ Protéine NS5B du VHC selon la revendication 1 ***caractérisée*** en ce que :

- le résidu à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 n'est ni une valine, ni une leucine, ni une isoleucine ni une cystéine ;
- le résidu à la position correspondant au résidu 265 de SEQ ID NO : 1 n'est pas une proline ;
- le résidu à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1 n'est ni une asparagine, ni une cystéine, ni une histidine.

3/ Protéine NS5B du VHC selon la revendication 2 ***caractérisée*** en ce que :

- le résidu à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 est une alanine ;
- le résidu à la position correspondant au résidu 265 de SEQ ID NO : 1 est une sérine ;
- le résidu à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1 est un aspartate ou acide aspartique.

4/ Protéine NS5B du VHC selon la revendication 3 ***caractérisée*** en ce qu'elle comprend :

- une alanine à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 ; et
- une sérine à la position correspondant au résidu 265 de SEQ ID NO : 1 ; et
- une acide aspartique à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1.

5/ Protéine NS5B du VHC selon la revendication 4 ***caractérisée*** en ce qu'elle comprend la séquence SEQ ID NO : 3.

6/ Fragment d'une protéine NS5B du VHC comprenant au moins une mutation telle que définie à l'une des revendications 1 à 3.

7/ Séquence d'acide nucléique codant une protéine NS5B du VHC selon l'une des revendications 1 à 5 ou un fragment de celle-ci selon la revendication 6.

8/ Séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ***caractérisée*** en ce qu'elle comprend la séquence SEQ ID NO : 5.

9/ Protéine NS5B du VHC selon l'une des revendications 1 à 5 ou fragment protéique selon la revendication 6 ou séquence d'acide nucléique selon les revendications 7 et 6, ***caractérisés*** en ce qu'ils sont d'origine humaine.

10/ Vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 7 à 9.

11/ Réplicon comprenant une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 7 à 9.

12/ Cellule hôte comprenant un vecteur selon la revendication 10 ou un réplicon selon la revendication 11.

13/ Cellule hôte selon la revendication 12 ***caractérisée*** en ce qu'il s'agit d'une cellule de moustique, avantageusement du genre *Aedes*.

ABREGE DESCRIPTIF

MUTATIONS DANS LA PROTEINE NS5B DU VHC

La présente invention concerne une protéine NS5B du virus de l'hépatite C (VHC), performante pour la réplication, qui porte une mutation ponctuelle à l'une au moins des positions suivantes :

- à la position correspondant au résidu 262 de SEQ ID NO : 1 ; et/ou
- à la position correspondant au résidu 265 de SEQ ID NO : 1 ; et/ou
- à la position correspondant au résidu 316 de SEQ ID NO : 1.

Abstract

In order to explore the ability of mosquitoes to replicate HCV, we conducted a series of experimental infections (four investigations spread between 2006 and 2009) on two different types of mosquito; *Aedes* (*Aedes* (*Ochlerotatus*) *caspius* Pallas 1771; *Aedes* (*Aedimorphus*) *vexans* Meigen 1830) and *Culex Culex* (*Culex*) *pipiens* Linnaeus 1758 wild (*Ae. vexans*, *Ae. caspius Cx. pipiens*) and lab adapted (*Ae. vexans*). After collecting mosquitoes, females aged between 5 and 10 days were fed by a viremic blood meal, a mixture of sheep (or rabbit) red blood cells and serum of patients infected with HCV (genotype 1b). The mosquitoes were then maintained in breeding for several days (15 to 30 days) by making sampling points to monitor the infection. After development of all stages upstream of the detection conditions (milling and extraction, kits for use…) and detection conditions (choice of method of amplification and detection, kits for use ...) We succeeded to provide evidence of HCV replication in the mosquito *Aedes vexans*. In the first experimental infection, which lasted three weeks and performed on *Ae. vexans*, we detected HCV RNA in ~50% of mosquitoes of the 21st days post-infection (DPI), by endpoint PCR. The second infection experiment, conducted on two types of mosquitoes: *Aedes sp*. and *Culex pipiens*, has allowed us to: (i) confirmation – by qRT-PCR – the results of the first experiment (presence of HCV RNA in the mosquito *Aedes sp*. 21 DPI) with an infection rate of ~33%; (ii) demonstrate that only *Aedes* mosquitoes contained HCV RNA, the *Culex* mosquitoes were all negative, (iii) show that the RNA detected was issued from replication, since adaptive mutations were identified in the sequence of the RdRp (RNA dependent RNA polymerase), $Val^{262} \rightarrow Ala^{262}$, $Pro^{265} \rightarrow Ser^{265}$, and $Asn^{316} \rightarrow Asp^{316}$, with a specificity for the genus of *Aedes*, since – once again – all *Culex* mosquitoes at 21 DPI were HCV RNA-negative. Another way to distinguish replication originated RNA from residual RNA was to show dissemination of the virus in different mosquito' tissues. To do this, we conducted a third experimental infection (on *Ae. caspius* and *Ae. vexans*), over a period of 15 days and analyzed the presence of HCV RNA separately in the heads and bodies (previously separated by dissection). In conducting samples at different times after infection (0, 4, 8 and 15 days), we succeeded to obtain a kinetics of infection separately in heads and bodies, detection performed by WTA (whole transcriptome amplification) followed by qPCR. On the day of infection (D0), the infection rate in the heads and bodies of mosquitoes was 9.1% and 100% respectively, the rate rose to 57.1% and 85.7% respectively at 15 DPI, after it has been totally negative after eight days post-infection. On the other hand, we have identified adaptive mutations in the IRES sequence of mosquito at 15 DPI compared to those of day 0. It is interesting to note that HCV RNA-positive mosquitoes all belonged to the *vexans* species, showing that replication is species specific. Different regions of the HCV genome were then, amplified. Finally, we made use of lab adapted mosquitoes (lab strain *Ae. vexans* KK, Team AB Failloux, Bunyavirus Molecular Genetics, Institute Pasteur - Paris). Infection of this strain has also shown, using different approaches for detection (qRT-PCR, qPCR-WTA, HCV-GA namely), that HCV RNA was present at 30 DPI in ~33% of heads and ~66% of the mosquito' bodies, while infection rates were at ~28% and ~ 71% in the head and body respectively at 0 DPI. These results were based on sequencing performed on the amplified regions of the HCV genome. Taken together; these results show that HCV is able to replicate in *Ae. vexans* mosquitoes, suggesting that HCV, like other flaviviruses, can alternate between two hosts (primates and mosquitoes) and has lost its potential for replication in the mosquito over time, the primate providing a more stable replication environment (longer lifetime).

Keywords: HCV replication, arbovirus, *Flavivirus*, *Aedes vexans*, *Aedes caspius*, *Culex pipiens*.

Résumé

Dans le but d'explorer la capacité des moustiques à répliquer le VHC, nous avons réalisé une série d'infections expérimentales (quatre investigations réparties entre 2006 et 2009) sur deux genres de moustiques différents ; genre *Aedes* (*Aedes (Ochlerotatus) caspius* Pallas 1771, *Aedes (Aedimorphus) vexans* Meigen 1830) et genre *Culex Culex (Culex) pipiens* Linnaeus 1758 sauvage (*Ae. vexans*, *Ae. caspius*, *Cx. pipiens*) et d'élevage (*Ae. vexans*). Après collecte des moustiques, les femelles âgées entre 5 et 10 jours ont été nourries par un repas sanguin virémique, composé d'un mélange de globules rouges de mouton (ou de lapin) et du sérum de patient infecté par le VHC (génotype 1b). Les moustiques ont ensuite été maintenus en élevage pendant plusieurs jours (15 à 30 jours) en réalisant des points de prélèvement pour suivre l'évolution de l'infection. Après mise au point de toutes les étapes en amont de la détection (conditions de broyage et d'extraction, kits à utiliser…) et les conditions de la détection (choix de la méthode d'amplification et de détection, kits à utiliser…), nous avons réussi à apporter la preuve de la réplication du VHC dans les moustiques du genre *Aedes vexans*. Dans la première infection expérimentale qui a duré trois semaines et réalisée sur *Ae. vexans* , nous avons détecté de l'ARN du VHC dans ~50% des moustiques du 21ième jours post-infection (JPI), par PCR en point final. La seconde expérience d'infection, réalisée sur les deux genres de moustiques : *Aedes* sp. et *Culex pipiens*, nous a permis de : (i) confirmer par qRT-PCR le résultat de la première expérience (présence d'ARN du VHC dans les moustiques du genre *Aedes sp*. à 21 JPI) avec un taux d'infection de ~33% ; (ii) démontrer que seuls les moustiques du genre *Aedes* contenaient de l'ARN du VHC, les moustiques du genre *Culex* étaient tous négatif ; (iii) montrer que l'ARN détecté était bien issu de la réplication, dans la mesure où des mutations d'adaptation ont été identifiées dans la séquence de la RdRp (ARN Polymérase ARN dépendante), $Val^{262} \rightarrow Ala^{262}$, $Pro^{265} \rightarrow Ser^{265}$, et $Asn^{316} \rightarrow Asp^{316}$, avec une spécificité pour le genre *Aedes*, puisque tous les moustiques *Culex* à 21 JPI étaient ARN VHC-négatifs. Un autre moyen de distinguer l'ARN issu de la réplication de l'ARN résiduel a été de montrer l'existence d'une dissémination au sein du moustique. Pour ce faire, nous avons réalisé une troisième expérience d'infections (genres *Ae. caspius* et *Ae. vexans)*, sur une durée de 15 jours et avons analysé la présence de l'ARN du VHC distinctement dans les têtes et les corps (préalablement séparés par dissection). En effectuant des prélèvements à différentes dates après infection (0, 4, 8 et 15 jours), nous avons réussi à obtenir une cinétique d'infection, séparément, dans les têtes et dans les corps, détection réalisée par WTA (Whole Transcriptome Amplification) suivie de qPCR. Au jour de l'infection (J0), le taux d'infection dans les têtes et les corps des moustiques était de 9,1% et 100% respectivement, ce taux est passé à 57,1% et 85,7% respectivement à J15 après une négativation huit jours après infection. D'autre part, nous avons identifié des mutations d'adaptation dans la séquence de l'IRES des moustiques à J15 comparés à ceux à J0. Il est intéressant de noter que les moustiques ARN VHC-positifs appartenaient tous à l'espèce *vexans*, montrant ainsi que la réplication est spécifique d'espèce. Différentes régions du génome du VHC ont, ensuite, étaient amplifiées. Enfin, nous avons eu recours à des moustiques d'élevage, adaptés aux conditions de laboratoire (souche d'élevage *Ae. vexans* KK, équipe A-B Failloux, Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur - Paris). L'infection de cette souche a également montré, en utilisant différentes approches de détection (qRT-PCR, WTA-qPCR, HCV-GA notamment), qu'à 30 JPI, l'ARN du VHC était présent dans ~33% des têtes et ~66% des corps, alors que les taux d'infection à J0 étaient de ~28% et ~71% dans les têtes et les corps respectivement. Les résultats se sont appuyés sur des séquençages effectués sur les régions amplifiées du génome du VHC. L'ensemble de ces résultats montrent que le VHC est capable de se répliquer dans les moustiques du genre *Ae. vexans*, ce qui suggère que le VHC, à l'image d'autres *Flavivirus*, puisse alterner entre deux hôtes (primates et moustiques) et qu'il ait perdu son potentiel de réplication chez le moustique au fil du temps, le primate lui fournissant un environnement de réplication plus stable (durée de vie plus longue).

Mots clés : VHC, réplication, arbovirus, *Flavivirus*, *Aedes vexans*, *Aedes caspius*, *Culex pipiens*.