



HAL
open science

Exploration et fonctionnalité de particules virales authentiques en vue de l'étude de la réplication du virus de l'hépatite C

Catherine Fallecker

► **To cite this version:**

Catherine Fallecker. Exploration et fonctionnalité de particules virales authentiques en vue de l'étude de la réplication du virus de l'hépatite C. Virologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENS005 . tel-01679336

HAL Id: tel-01679336

<https://theses.hal.science/tel-01679336>

Submitted on 9 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité :

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Catherine FALLECKER

Thèse dirigée par **Emmanuel DROUET**

préparée au sein **UVHCI (Unit of Virus Host cell Interaction**
et de l'**École Doctorale**

Exploration et fonctionnalité de particules virales authentiques en vue de l'étude de la réplication du Virus de l'Hépatite C

Thèse soutenue publiquement le , 9 janvier 2014
devant le jury composé de :

Dr Florence Fouque

Directeur de Recherche, Institut Pasteur de Guadeloupe, Rapporteur

Dr Régis Sodoyer

Directeur de Recherche, Sanofi Pasteur Lyon, Rapporteur

Dr Jean-Claude Manuguerra

Directeur de Recherche, Institut Pasteur de Paris, Examineur

Dr Marie-Anne Petit

Directeur de Recherche, INSERM Lyon, Examineur

Pr Philippe Sabatier

Professeur des Universités, École Nationale Vétérinaire de Lyon, Examineur,
Président

Pr Emmanuel Drouet

Professeur des Universités, Grenoble I, Directeur de thèse



Table des matières

Liste des figures	7
Acronyme	10
I. Introduction	17
1. Notions de virus, de réservoir, d'hôte et d'arthropode vecteur	19
1.1. Préambule	19
1.2. Notions de réservoir et d'hôtes	20
1.3. Transmission	20
1.4. Arthropodes et maladies vectorielles	21
1.4.1. Généralités sur les arthropodes et les arboviroses	21
1.4.2. Les moustiques en tant qu'arthropodes vecteurs	22
1.4.2.1. Cycle de vie du moustique	22
1.4.2.2. Principales arboviroses transmises par les moustiques	25
1.4.2.2.a. La dengue	25
1.4.2.2.b. L'encéphalite japonaise	26
1.4.2.2.c. La fièvre du Nil occidental	26
1.4.2.2.d. Le Chikungunya	27
1.4.2.3. Dynamiques des populations : impacts du changement climatique sur les écosystèmes vectoriels	27
2. Le virus de l'Hépatite C : présentation générale	31
2.1. Histoire	31
2.2. Epidémiologie et modes de contamination	32
2.3. Phylogénie et distribution géographique	33
2.4. Génome	35
2.5. Protéines virales	36
2.5.1. Les protéines structurales	36
2.5.2. Les protéines non structurales.	37
2.6. Cycle viral	40
2.6.1. Fixation et internalisation de la virolipoparticule	40
2.6.2. Traduction et maturation de la polyprotéine	42
2.6.3. Réplication du génome viral	43
2.6.4. Assemblage et libération des particules virales	43
2.7. Les modèles d'études	44
2.7.1. Les modèles animaux	44
2.7.1.1. Chimpanzés	44
2.7.1.2. <i>Tupaia belangeri</i>	44
2.7.1.3. Les modèles murins	45
2.7.2. Les modèles cellulaires	45

2.7.3.	Les modèles viraux	47
2.7.3.1.	Les modèles pseudoviraux : les Viral-Like Particles (VLP ou HCV-LPs)	47
2.7.3.2.	Les réplicons subgénomiques	47
2.7.3.3.	Les pseudoparticules (HCVpp)	47
2.7.3.4.	Formes plasmatiques du HCV	48
2.7.3.5.	Le HCV produit en culture de cellule (HCV _{cc})	48
3.	Physiopathologie	51
3.1.	Les hépatites Virales C	51
3.1.1.	Hépatite C aiguë	51
3.1.2.	La guérison spontanée	53
3.1.3.	Hépatite C chronique	53
3.2.	La réponse immunitaire	54
3.2.1.	La réponse immunitaire innée	54
3.2.1.1.	Les récepteurs de type Toll	54
3.2.1.2.	Les récepteurs de type RLRs	54
3.2.1.3.	Les cellules natural killer	56
3.2.1.4.	Les cellules dendritiques	56
3.2.2.	La réponse immunitaire adaptative	56
3.2.2.1.	La réponse cellulaire	56
3.2.2.1.a.	La réponse CD4+	56
3.2.2.1.b.	La réponse CD8+	58
3.2.2.2.	La réponse humorale : les épitopes neutralisants	58
3.3.	Traitements	61
3.3.1.	Interféron (IFN) et Ribavirine (RBV)	61
3.3.2.	Nouvelles thérapeutiques	61
3.3.2.1.	Les anti-protéase NS3-4A	61
3.3.2.2.	Les anti NS5A	61
3.3.2.3.	Les anti NS5B	61
3.3.2.4.	Autres cibles	62
4.	Objectifs	63
4.1.	Partie I : production d'une sonde immunologique : le scFv anti-HCV E1E2 D32.10	63
4.2.	Partie II : avons-nous découvert tous les modes de transmission du HCV ?	64
II.	Le ScFv anti-HCV E1E2 D32.10	67
5.	Production du scFv D32.10 et caractérisation structurale et fonctionnelle	69
5.1.	Construction du scFv D32.10 et production par <i>flash refolding</i>	69
5.1.1.	Préambule	69
5.1.2.	Développement du scFv D32.10	69
5.2.	Test d'expression en <i>cell-free</i> et fonctionnalité du scFv D32.10	78
5.2.1.	Qu'est ce que l'expression en système <i>cell-free</i> ?	78
5.2.2.	Purification	80
5.2.2.1.	Matériel et méthodes	80
5.2.2.1.a.	Purification en condition native	80
5.2.2.1.b.	Purification en condition dénaturante	80
5.2.2.1.c.	Électrophorèse et western blot	80
5.2.2.2.	Résultats et interprétation	80
5.2.3.	Fonctionnalité	81

5.3.	Expression en baculovirus et fonctionnalité du scFv D32.10	82
5.3.1.	Qu'est ce que l'expression en baculovirus ?	82
5.3.2.	Matériel et méthodes : construction et production du scFv D32.10	83
5.3.2.1.	Préparation du bacmide recombinant scFv D32.10 : digestion, ligation et transformation des bactéries DH10EMBacY	84
5.3.2.2.	Production du stock viral et production de la protéine cible	85
5.3.2.2.a.	Production du stock viral	85
5.3.2.2.b.	Production protéique	86
5.3.2.3.	Extraction et purification des protéines recombinantes	86
5.3.2.3.a.	Purification sur résine nickel	86
5.3.2.3.b.	Purification par gel filtration	86
5.3.2.4.	Test d'activité	87
5.3.3.	Expression et purification de la protéine cytoplasmique et sécrétée	87
5.3.3.1.	Expression	87
5.3.3.2.	Purification	87
5.3.3.3.	Fonctionnalité	90
5.4.	Conclusion générale sur la production du scFv D32.10	90
 III. Infection par HCV des lignées cellulaires d'insecte		91
 6. Préparation de lignées cellulaires		93
6.1.	Présentation des arthropodes étudiés	93
6.1.0.4.	<i>Aedes vexans</i>	93
6.1.0.5.	<i>Aedes aegypti</i>	93
6.2.	L'exemple d' <i>Aedes aegypti</i>	94
6.2.1.	Matériel et méthodes	94
6.2.1.1.	Mise en culture	94
6.2.1.2.	Entretien cellulaire	95
6.2.1.3.	Amplification de la région ITS d' <i>Aedes aegypti</i>	95
6.2.1.4.	Visualisation cellulaire	95
6.2.2.	Résultats	97
6.2.2.1.	Sélection du protocole de mise en culture et contrôle de la lignée	97
6.2.2.2.	observation cellulaire	97
6.2.2.2.a.	Observation bidimensionnelle	97
6.2.2.2.b.	Observation tridimensionnelle	97
6.3.	L'exemple d' <i>Aedes vexans</i>	100
 7. Développement d'outils biomoléculaires pour la détection du génome du HCV		103
7.1.	Présentation du problème	103
7.2.	Matériels et méthodes	104
7.2.1.	Échantillons, extraction ARN viral et transcription inverse	104
7.2.2.	Amplification longue : PCR <i>Long Range</i> (LR-PCR)	105
7.3.	Résultats	106
7.3.1.	Première approche : transcription inverse utilisant la SSIII avec l'amorce HUTLA2106	
7.3.1.1.	Contrôle qualité de la transcription inverse (RT)	106
7.3.1.2.	Test des différentes enzymes <i>Long Range</i>	106
7.3.1.3.	Test des additifs	107
7.3.1.4.	Test d'amplification longue	108
7.3.2.	Étude de l'impact de la région codant pour NS3 sur l'amplification	109
7.3.2.1.	Test d'amplification de la région codant pour NS3	109

7.3.3.	Étude de protocoles et d'amorces alternatifs	110
7.3.4.	Tests d'amplification longue	110
8.	Infection de cellules d'insecte par HCV	113
8.1.	Préambule	113
8.1.1.	Réglementation et nécessités	113
8.1.2.	Les cellules dédiées à l'infection HCV	114
8.1.2.1.	Les cellules humaines : HepaRG®	114
8.1.2.2.	Les lignées d'insectes : la lignée C6/36 et la lignée Kt-Mos1	115
8.2.	Matériel et méthodes	116
8.2.1.	Ensemencement et protocole d'infection	116
8.2.2.	Détection de l'infection dans les cellules à J+4, J+21 et J+28	117
8.2.3.	Amplification longue (LR-PCR) pour détecter l'ARN viral (+)	117
8.2.3.1.	Immunodétection des prtoéines d'enveloppe E1 E2 par l'anticoprns monoclonal D32.10	117
8.3.	Résultats	117
8.3.1.	Immunodetection	117
8.3.2.	Détection génomique du HCV	118
8.3.2.1.	Transcription inverse et amplification longue	118
IV.	Discussion/Conclusion	121
	Appendices	127
A.	Ultrastructural characterization of a new cell line derived from larveae of Ae. aegypti (Bora-Bora)	129
B.	Séquençage haut débit réalisé au CHU de Grenoble (Dr Sylvie Iarrat et Elodie Santoni)	141
C.	HepaRG culture kit for 50 plates	143
D.	Bilan des séquençages	157

Table des figures

1.1. Portrait d'Aulus Cornelius Celsus	19
1.2. Relation entre les concepts de réservoir (1 et 2) et d'hôtes (2 et 3).	20
1.3. Exemple de transmission verticale et horizontale d'un agent infectieux chez l'homme.	21
1.4. Principaux arbovirus pathogènes pour l'homme	23
1.5. Représentation du cycle de vie du moustique	25
1.6. Affiche de prévention contre la dengue	26
1.7. Cycle de transmission de l'encéphalite japonaise	26
1.8. Dynamique et répartition mondiale d' <i>Aedes albopictus</i> (<i>Ae. albopictus</i>).	27
1.9. Évolution du nombre de maladies infectieuses en fonction des années et de la richesse en espèces d'oiseaux et de mammifères	28
2.1. Distribution mondiale du HCV en 2007	32
2.2. Arbre phylogénétique des différents génotypes du virus de l'hépatite C par la méthode de neighbor-joining, en utilisant le modèle de Tamura-Nei (programme MEGA4)	33
2.3. Diversité de la répartition géographique des différents génotypes du HCV	34
2.4. Représentation schématique et structurale de l'organisation génomique HCV.	35
2.5. Représentation schématique et structurale de l'organisation génomique et protéique du HCV.	37
2.6. Bilan fonctionnel des protéines du HCV (A) et perturbations de la réponse innée par les protéines du HCV (B)	39
2.7. Représentation schématique du cycle de réplication du HCV	40
2.8. Fixation et internalisation de la virolipoparticule	41
2.9. Formation du complexe actif 80S	42
2.10. Assemblage de la particule virale	43
2.11. <i>Pan troglodytes</i>	44
2.12. <i>Tupaia belangeri</i>	44
2.13. Modèle de souris chimérique Alb-uPA/SCID pour l'étude du HCV	46
2.14. Production de pseudoparticules du HCV	48
2.15. Virolipoparticules du HCV	49
3.1. Histoire naturelle de l'infection par le HCV	52
3.2. Profils sérologiques d'une hépatite C aiguë suivie d'une phase évoluant vers la guérison (A) ou vers la chronicité (B)	53
3.3. Bilan des voies de détection et de signalisation des pathogènes viraux et activation de la réponse interféron classique ($IFN_{\alpha/\beta}$)	55
3.4. Schématisation de la réponse adaptative spécifique du HCV	57
3.5. Bilan des régions antigéniques de E1 et E2 et des épitopes des principaux anticorps anti-E2	60
3.6. Liste des molécules anti-HCV en cours de développement, leurs cibles et de leurs avancées dans les phases cliniques (I, II, III, IV)	62
4.1. Détection de l'ARN du HCV chez <i>Aedes vexans</i> trente jours après infection (Résultat du Dr Yassine Rechoum)	65

5.1. Bilan structural d'un anticorps et d'un scFv	70
5.2. Schéma de production en cell-free de protéines recombinantes	79
5.3. Western blot du test de purification du scFv D32.10 exprimé en cell-free . .	81
5.4. Activité du scFv produit en cell-free (Dot Blot 1) versus scFv produit par <i>flash refolding</i> (Dot Blot 2)	82
5.5. Principe de production par le système baculovirus	83
5.6. Schéma du plasmide pFastBac-SS	84
5.7. Schéma global du protocole utilisé afin de produire le scFv D32.10	85
5.8. Western blot de la protéine cytoplasmique et de la protéine sécrétée scFv D32.10 produites en baculovirus	87
5.9. Purifications sur résine Nickel de la protéine scFv D32.10 produite au niveau cytoplasmique (Gel 1) et sécrétée (Gel 2)	88
5.10. Purification du scFv D32.10 secreté	89
5.11. Activité du scFv produit en baculovirus (Dot Blot 1) versus scFv produit par <i>flash refolding</i> (Dot Blot 2)	90
6.1. Photographie d' <i>Aedes vexans</i> et d' <i>Aedes aegypti</i> au stade larvaire et adulte.	94
6.2. Protocole général pour l'obtention de la lignée Kt-Mos1	96
6.3. Observation des cellules Kt-Mos 1 adhérentes	98
6.4. Observation des structures cellulaires Kt-Mos1	99
6.5. Bilan des éclosions d' <i>Aedes vexans</i> suivant les paramètres de température et de % CO2	100
6.6. Larve d' <i>Aedes vexans</i> juste après le broyage	101
7.1. Similarité entre une séquence génomique de HCV génotype 3 et d'autres génotypes	103
7.2. Bilan des amorces utilisées pour la mise en place de la transcription inverse et de l'amplification du HCV	105
7.3. Contrôle qualité de la transcription inverse réalisée avec la SSIII et l'amorce HUTLA2 : PCR tout au long du génome)	106
7.4. Test des différentes enzymes afin d'amplifier l'hémigénome 4ef/HUTLA2 .	107
7.5. Test des différents additifs afin d'amplifier l'hémigénome 4ef/HUTLA2 et la région région 3'UTR	108
7.6. Bilan des PCR testées afin d'amplifier un hémigénome	108
7.7. Test des différentes enzymes afin d'amplifier la région codant pour NS3 . .	109
7.8. Comparaison des amplifications obtenues avec la SSIII (puits 2, 4, 6) et la Prime Script (puits 1, 3, 5)	110
7.9. Test des différentes amorces afin d'amplifier le génome entier du HCV . . .	111
7.10. Protocole mis au point afin de réaliser une reverse transcription et une amplification longue du HCV	112
8.1. Evolution morphologique des cellules HepaRG® lors d'une étude cinétique	114
8.2. Production de particules virales infectieuses du HCV par la lignée hepato- cytaire différencié HepaRG® après infection au stade prolifératif.	115
8.3. Moustique <i>Aedes albopictus</i>	115
8.4. Chronologie de la mise en culture et de l'infection cellulaire par HCV réalisées sur les lignées HepaRG®, C6/36 et les kt-Mos1	116
8.5. Immunodétection du HCV sur des cellules HepaRG® non infectées (a) et infectées (b)	118
8.6. RT-PCR de l'ARN viral intracellulaire	119

8.7. Amplification du génome entier du HCV issu des produits d'infection de cellules humaines et de cellules du genre <i>Aedes</i>	119
B.1. Bilan du séquençage haut débit réalisé sur les produits d'amplification long de HCV	142
D.1. Bilan des mutations observées au niveau de la région IRES du HCV par séquençage SANGER	158

Liste des symboles

aa	acides aminés
ADN	acide désoxyribonucléique
ALAT	alanine amino transférase
ARN	acide ribonucléique
ASAT	aspartate amino transférase
BSA	albumine de sérum bovin ; <i>bovin serum albumin</i>
BUNV	virus bunyamwera
CDR	régions hypervariables ; <i>complementarity determining regions</i>
CHIKV	virus du Chikungunya
CHV	<i>canine hepacivirus</i>
CLDN1	claudine-1
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CTL	lymphocyte T cytolytique
DC	dengue classique
DENV	virus de la Dengue
DH	dengue hémorragique
EEEV	virus des encéphalites équines américaines
EGFR	récepteur à l'EGF ; <i>epidermal growth factor receptor</i>
EID	Etablissement Interdépartemental pour la Démoustication
eIFs	facteurs d'initiation eucaryotique ; <i>Eukaryotic initiation factors</i>
EMCV	Encéphalomyocardite, <i>encephalomyocarditis virus</i>
FVR	virus de la vallée du Rift
GAGs	glycoaminoglycanes
GIEC	Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat
HAV	virus de l'hépatite A
HBV	virus de l'hépatite B
HCV	virus de l'hépatite C
HCV-Lps ou VLP	<i>virus-like-particles</i>
HCVcc	<i>HCV in cell culture</i>
HCVpp	<i>HCV pseudoparticles</i>
HNANB	hépatite non-A et non-B
HS	Héparanes sulfates

HSV	virus de l'herpès; <i>Herpes simplex virus</i>
HVR	région hypervariable
ICTV	virus Tataguine
IFN	interféron
IL	interleukine
InVS	Institut de Vieille Sanitaire
ISG	<i>interferon stimulated gene</i>
KUNV	virus Kunjin
LDL-R	récepteur des lipoprotéines basse densité, <i>Low Density lipoprotein Receptor</i>
LR-PCR	Amplification longue, <i>Long Range</i>
LVP	lipo-viro-particules
MALLS	<i>multiangle laser light scattering</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MLV	virus de la leucémie murine; <i>Murine Leukemia Virus</i>
MVEV	virus de l'encéphalite de la Murray Valley
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NIs	inhibiteurs nucléosidiques
NK	lymphocytes NK, <i>natural killer</i>
NNIs	inhibiteurs non nucléosidiques
nt	nucléotide
OCLN	occludine
OMS	organisation mondiale pour la santé
ONNV	virus O'nyong Nyong
ORF	cadre ouvert de lecture, <i>Open Reading Frame</i>
ORUV	virus oropouche
PTB	<i>Pyrimidine Tract-Binding protein</i>
RBV	ribavirine
RdRP	ARN polymérase ARN dépendante, <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RE	réticulum endoplasmique
RLR	<i>RIG-like helicase receptors</i>
RVV	virus de la Ross River
scFv	<i>single-chain Fv fragment</i>
SFV	virus de la Forest de Semliki; <i>Semliki Forest virus</i>
SHN	<i>sérum humain normal</i>
SPP	signal-peptide-peptidase, <i>signal peptide peptidase</i>

SRBI	<i>High density lipoprotein scavenger receptor classe B type 1</i>
TCR	récepteur des cellules T
TLR	récepteurs de type Toll, <i>Toll-like receptors</i>
TMV	virus de la mosaïque du tabac
UTR	région non traduite, <i>UnTranslated Region</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine, <i>Human immunodeficiency virus</i>
VMFK	virus de la Forêt de Kyasanur
WNV	virus du Nil occidental

En guise de préface : Au-delà des chimères



FIGURE 0.1.: Chimère d'Arezzo (Vème siècle – Ombrie Italie)

Le Virus de l'Hépatite C (HCV) figure parmi les virus pathogènes pour l'homme les plus difficiles à comprendre et étudier à l'heure actuelle. En effet pour différentes raisons que nous allons énumérer dans les lignes qui suivent et dans les chapitres de ce manuscrit, ce virus infectant 3% de la population mondiale figure parmi les plus discrets à la fois sur le plan clinique (cf. La métaphore d'« épidémie silencieuse ») et sur le plan cellulaire (le virus authentique n'a jamais pu être cultivé et propagé *in vitro*). Malgré cette « discrétion » étonnante, ce virus - reconnu comme non cytopathique - est associé à des inflammations chroniques du foie susceptibles d'évoluer vers des complications à type de cirrhose et de cancer. Un des rares éléments de HCV que l'on puisse expérimenter avec précision et robustesse chez les sujets infectés est son génome ARN positif. C'est d'ailleurs par son ARN circulant au niveau du sang périphérique d'un patient avec une hépatite non-A non-B que l'équipe de Michael Houghton a découvert HCV pour la première fois après 15 années de traque [M Houghton., 2009]. Ce génome est toutefois extrêmement variable et l'ARN viral détecté par RT-PCR n'est que l'espèce moléculaire prépondérante, espèce qui masque les milliers de « quasiespèces » présentes chez un même sujet infecté en phase chronique. De nombreux points (épidémiologiques, cliniques), posent problème pour ceux qui s'intéressent à la compréhension subtile de ce virus :

Au niveau de son épidémiologie :

- Tout d'abord les modes de contaminations sont mal identifiés, et la transmission sanguine qui est la règle dans les pays développés (transfusion, accidents d'exposition au sang) ne permet pas d'expliquer la persistance virale au sein des populations humaines sur de longues périodes. Certains auteurs ont suggéré une histoire de plus de 500 à 2000 ans [Pybus et al., 2007] (cf. chapitre 2)
- HCV est le seul virus à ARN (hormis les rétrovirus) à persister chez plus de 80% des individus infectés. La persistance virale d'une part au niveau des tissus d'un sujet infecté et, d'autre part au niveau de l'ensemble des individus de notre planète suggèrent une circulation virale importante au sein de l'ensemble de la population humaine et même au niveau des populations de primates (HCV est reconnu pour infecter les singes... cf chapitre 2). On peut ainsi raisonnablement poser l'hypothèse d'une transmission entre primates via les arthropodes vecteurs et placer HCV parmi les virus à caractère endémique.

Au niveau de la clinique :

- La primo-infection est exceptionnellement symptomatique, ce qui rend aléatoire la datation d'une contamination et l'identification de son origine. Par ailleurs, quand l'hépatite se révèle cliniquement, la symptomatologie n'est pas très spécifique. Hormis de très rares observations, les particules virales n'ont jamais été observées par microscopie électronique et quand elles l'ont été pendant les phases chroniques de la maladie, notamment au niveau du sang périphérique [André et al., 2002, Petit et al., 2005], la morphologie de ces particules s'est révélée extrêmement atypique : les virions sont « surenveloppés » par des lipides de l'hôte ce qui a donné naissance à une nouvelle appellation, à savoir la notion de « virolipoparticules », phénomène non décrit pour d'autres virus (cf chapitre 2).

Au niveau de la biologie et de la réplication du virus :

- Bien qu'un grand nombre de types cellulaires ait été testé, aucune équipe au monde n'a réussi à cultiver HCV. Il a fallu attendre 2010 pour qu'une équipe lyonnaise [Petit et al., 2011] arrive à établir une propagation sur le long terme de HCV, notamment en utilisant une lignée hépatocytaire bipotente (la lignée HepaRG) (cf chapitre 2 et 7). En conséquence la plupart des outils d'étude utilisés pour comprendre à la fois le cycle cellulaire de HCV et la réponse immunitaire spécifique (anticorps, réplicons) ont été établis à partir d'éléments viraux (protéines recombinantes, constructions subgénomiques et génomiques) que l'on peut qualifier de « chimères ». A ce titre il faut rendre hommage à Wakita (2005) pour avoir réussi avec succès la construction du premier réplicon susceptible de générer des particules virales après transfection de cellules hépatocytaires HuH7 (cf chapitre 2). A l'heure actuelle, il s'agit du seul outil de travail utilisant HCV génotype 2a (réplicon « JFH1 » pour « Japanese Fulminant Hepatitis ») et sur lequel reposent les résultats de milliers de chercheurs depuis une dizaine d'années afin de comprendre la biologie intime de HCV. Ceci pose problème car ce génotype n'est pas le plus fréquent - loin s'en faut - par rapport aux génotypes 1a 1b qui représentent les souches de HCV épidémiques prévalentes les plus virulentes dans les pays développés.
- Les modèles expérimentaux animaux se résument au modèle de primates (chimpanzé) et ceux-ci ont été mis à profit pour les essais vaccinaux, à l'heure actuelle très décevants. Il faut également mentionner que, même si le chimpanzé est capable de développer une infection HCV productive, ce primate ne développe pas de maladie semblable (hépatite chronique) à celle observée chez l'homme. Plusieurs équipes ont tenté de créer des modèles animaux, notamment des souris chimériques (cf chapitre 2) susceptibles d'être utilisés plus aisément notamment pour reproduire l'infection pour des essais cliniques. Depuis une dizaine d'années nous travaillons sur l'établissement de nouveaux outils d'étude de HCV et de nouveaux modèles d'infections expérimentales. Ces outils authentiques (souche HCV LAT, anticorps monoclonal D32.10) nous permettent de nous affranchir des « chimères » utilisés par la quasi-totalité des équipes académiques travaillant sur HCV. Ce manuscrit vous présentera une bibliographie des connaissances sur HCV suivie des travaux expérimentaux que j'ai pu réaliser durant ces trois années de thèse en parallèle à mes activités d'enseignement comme moniteur UJF. Ces travaux expérimentaux s'articulent sur deux axes : (i) un développement technologique sur un anticorps monoclonal inédit (mAb D32.10 obtenu après immunisation avec des particules virales HCV authentiques) et doué d'une activité neutralisante; cet anticorps conservé entre les différents génotypes constitue une bonne sonde immunologique pour explorer l'expression de HCV, et (ii) la démonstration que les cellules de moustiques (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*) sont capables de répliquer HCV après une inoculation avec des particules HCV authentiques (souche LAT, Petit et al., 2005). Ce travail fait suite à deux thèses soutenues à UJF en 2002 (Raphaëlle Germe) et 2009 (Yassine Rechoum). Les perspectives de ce travail sont mentionnées dans une conclusion finale.

Première partie .

Introduction

Chapitre 1

Notions de virus, de réservoir, d'hôte et d'arthropode vecteur

Avant d'étudier le rôle que pourrait occuper le moustique en tant que vecteur dans la réplication et la transmission du virus de l'hépatite C (HCV), il convient de définir l'entité virale mais aussi les différents biotopes (réservoir) et être vivants (**vecteur, hôte, réservoir**) responsables de sa persistance et de sa dissémination. Dans ce chapitre, des exemples de maladies virales transmises par les arthropodes (**arboviroses**) et plus précisément par les moustiques seront utilisés afin d'illustrer sa dynamique mais aussi l'importance de l'étude des populations vectorielles, du virus et du changement climatique dans l'établissement d'un système de veille sanitaire efficace.

1.1. Préambule

Le mot « virus » vient du latin virus signifiant « jus », « poison », « écoulement », « puanteur ». Les premières traces manuscrites du mot « virus » date du premier siècle avant Jésus-Christ. Aulus Cornelius Celsus (*cf* Figure 1.1), médecin et écrivain sous l'empire romain, fut le premier à souligner l'intérêt thérapeutique de l'élimination du poison autrement dit « **virus** ». Ce concept évolua avec l'amélioration des techniques et des connaissances : l'observation des micro-organismes et l'étude de leur diversité (Antonie Van Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch). Les premiers à démontrer l'existence d'un agent infectieux ultra-filtrable, responsable de la Mosaïque du tabac (TMV), non bactérien et n'étant pas une toxine, furent Dimitri Ivanowsky en 1892 suivi de Martinus Beijerinck en 1899. Cette découverte engendra l'identification d'autres agents infectieux chez l'Homme. Ainsi, le terme généralement employé pour décrire les poisons fut donc dédié à un agent infectieux ultra filtrable. La définition la plus utilisée fut proposée par André Lwoff en 1962.

« Ce sont des entités biologiques caractérisées par une structure nucléoprotéique simple et des propriétés fonctionnelles particulières. Le génome de ces agents est constitué d'un seul type d'acides nucléiques (ADN ou ARN), associé à une structure protéique protectrice, la capsid, et parfois à une enveloppe lipidique. Ce sont des « parasites » intracellulaires absolus, car ils ne contiennent pas de système métabolique et de synthèse capables d'assurer une réplication autonome. »



FIGURE 1.1.: Portrait d'Aulus Cornelius Celsus [Celsus et al., 1766].

1.2. Notions de réservoir et d'hôtes

Un virus étant une entité biologique, on ne peut pas parler de reproduction virale. Cette entité a donc besoin d'un environnement favorable à sa persistance, à sa réplication et à sa dissémination. Afin d'étudier celui-ci, les termes de réservoir et d'hôte sont utilisés (*cf* Figure 1.2).

Un réservoir est décrit comme « un système écologique (biotope et biocénose) dans lequel un agent (zoonotique) survit indéfiniment. Il comprend donc l'ensemble des populations hôtes ainsi que les hôtes intermédiaires ou vecteurs et leurs biotopes » [Savey and Dufour, 2004]. Contrairement au réservoir, l'hôte est un être vivant qui héberge et entretient dans des conditions naturelles un agent pathogène. Ashford définit trois types d'hôtes parmi les hôtes vertébrés [Ashford, 2001] : les hôtes réservoirs, les incidents et les messagers. Les hôtes réservoirs, aussi appelés hôtes primaires, permettent la survie de l'agent infectieux contrairement aux hôtes incidents. Les hôtes incidents sont infectés au contact du réservoir mais ne sont pas essentiels au maintien de l'agent infectieux. Les hôtes messagers ou hôtes de liaison sont définis comme des hôtes incidents qui transmettent l'agent d'un réservoir à un hôte. Il est donc commun d'attribuer à un même organisme plusieurs fonctions d'hôtes.

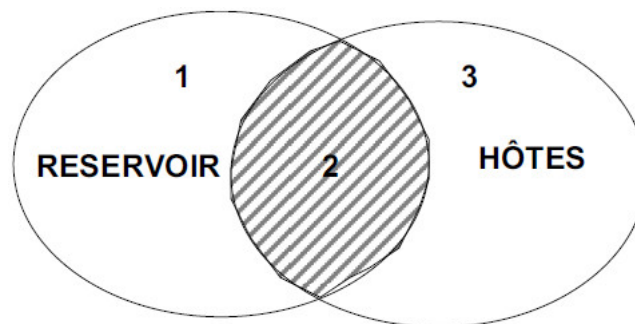


FIGURE 1.2.: **Relation entre les concepts de réservoir (1 et 2) et d'hôtes (2 et 3).**

Le réservoir comprend des vertébrés réservoirs (2), des invertébrés (1) et le milieu (1). Les hôtes peuvent jouer un rôle de réservoir (2) ou être des hôtes incidents (3) [Savey and Dufour, 2004].

1.3. Transmission

L'étude des modes de transmission entre hôtes, réservoirs et vecteurs est indispensable dans l'établissement d'un protocole de veille sanitaire efficace. La transmission est définie comme étant soit horizontale/verticale et/ou directe/indirecte (*cf* Figure 1.3).

La transmission verticale est décrite lorsque le pathogène est transmis à la descendance. Quatre types de transmission verticale existent : prénatale (par le biais du placenta), périnatale (transmission pendant l'accouchement), postnatale (par la nourriture ou par contact direct) et par transmission du matériel génétique (le virus est dans le génome de la mère ou du père). Lorsqu'un agent infectieux passe d'un individu à un autre, la transmission est dite **horizontale**. Dans ce cas, le pathogène peut être transmis de façon directe ou bien indirecte. **La propagation directe** d'un agent infectieux se réalise par contact entre des personnes infectées et non infectées. Elle a lieu lors d'un échange tel que le toucher, un baiser ou lors d'une relation sexuelle... **La transmission indirecte** se fait par le biais de « transporteurs » tels que les animaux (zoonose) ou à l'aide de vecteurs.

Les vecteurs sont définis comme des organismes pouvant transporter un ou plusieurs agents infectieux d'un hôte à un autre. Ils sont souvent associés à une espèce réservoir ou bien être eux-mêmes réservoirs. Leur rôle n'est pas uniquement de « transporter » l'infection mais aussi d'assurer un rôle dans le cycle du pathogène. Dans une **transmission biologique**, il y a obligatoirement multiplication et/ou développement du pathogène au sein du vecteur. On distingue alors, selon les cas, trois types de

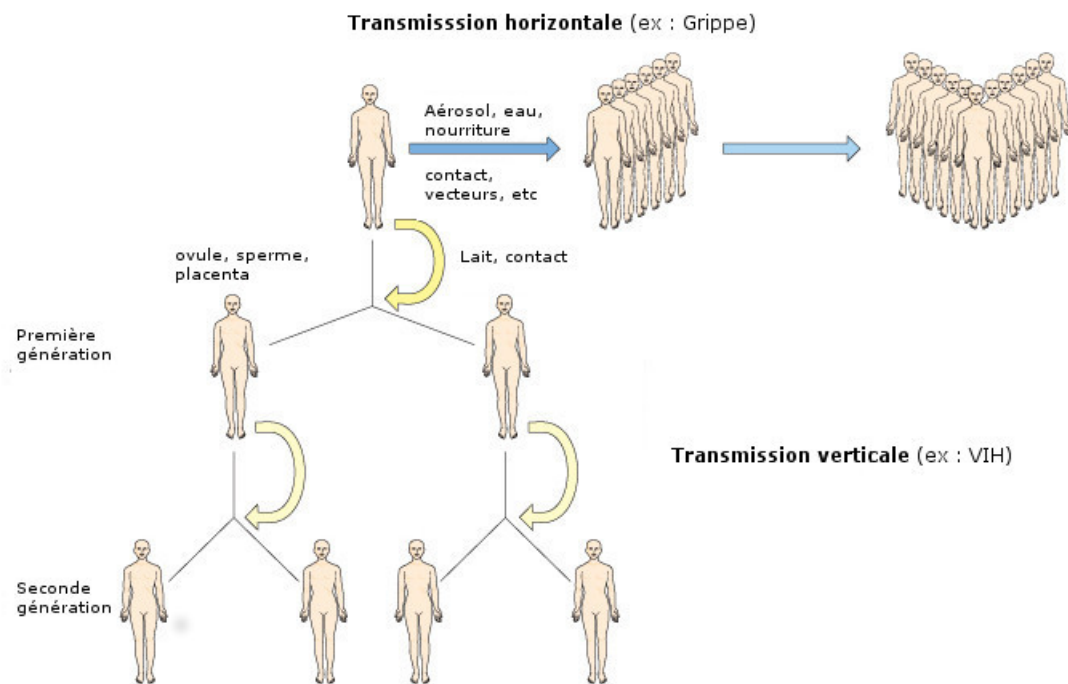


FIGURE 1.3.: Exemple de transmission verticale et horizontale d'un agent infectieux chez l'homme [Dockrell et al., 2012].

transmission biologique :

- **Cyclo-développementale** : la 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).
- **Propagatrice** : 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).
- **Cyclo-propagatrice** : le pathogène subit d'abord 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*).

Pour être efficace dans la propagation d'un agent infectieux, le vecteur doit non seulement être compétent mais aussi être dans un écosystème favorable à la transmission du pathogène. Cette **efficacité ou capacité vectorielle** est importante lorsque le vecteur est abondant, qu'il possède une longévité suffisante et qu'il entretient des liens entre hôtes et réservoirs. L'embranchement des arthropodes est composé de nombreuses espèces ayant une capacité vectorielle élevée.

1.4. Arthropodes et maladies vectorielles

1.4.1. Généralités sur les arthropodes et les arboviroses

Le phylum des arthropodes est le nom donné aux animaux ayant un squelette externe (exosquelette), un corps segmenté et comprenant des pattes ou appendices articulés. D'après la classification classique, cet embranchement est divisé en cinq sous-embranchements : *Chélicerata*, *Crustacea*, *Hexapoda*, *Myriapoda* et *Trilobita*. Il regroupe à lui tout seul plus de 85% du règne animal [Borror et al., 1989] et est responsable de la vectorisation de nombreux agents infectieux (virus, bactéries, parasites). Les principales pathologies transmises par les arthropodes sont des parasitoses (la leishmaniose ; *Leishmania*, le paludisme ; *Plasmodium*), des infections bactériennes (les rickettsioses ; *Rickettsia*) et des arboviroses (dengue ; *Arbovirus*).

Le terme *Arbovirus* provient de la contraction de *arthropod-borne viruses*. Il est décrit par l'OMS comme regroupant les « virus qui subsistent dans la nature essentiellement ou en grande partie grâce à la transmission biologique entre hôtes vertébrés sensibles par des vecteurs hématophages. Ils se multiplient et provoquent une virémie chez le vertébré, se multiplient dans les tissus des arthropodes et sont transmis à un nouveau vertébré par l'arthropode piqueur après une période d'incubation extrinsèque. » [OMS, 1967]

Il existe actuellement plus de 500 arbovirus pouvant entraîner chez l'homme dans certain cas, des infections légères voir graves appelées **arboviroses**. Quatre grandes familles (*Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*) regroupent l'ensemble des arbovirus (cf Figure 1.4) et sont responsables de trois syndromes principaux :

- **Le syndrome aigu fébrile (*dengue-like*)** regroupant les symptômes de la fièvre, éruption maculo-papuleuse, douleurs musculo-articulaires, céphalées, douleurs rétro-orbitaires, signes digestifs, asthénie. Ces symptômes sont observés avec les virus suivant :
 1. **les *Alphavirus*** : virus du Chikungunya (CHIKV), virus O'nyong Nyong (ONNV), virus de la Ross River (RVV), virus de l'encéphalite de la Murray Valley (MVEV), virus Kunjin (KUNV)
 2. **les *Flavivirus*** : virus de la dengue (DENV), virus du Nil occidental (WNV), virus de la Forêt de Kyasanur (VMFK)
 3. **les *Bunyavirus*** : virus Bunyamwera (BUNV), Virus Tataguine (ICTV), virus Oropouche, virus Orungo (ORUV)
 4. **les *Phlébovirus*** : virus de la Fièvre de la vallée du Rift (FVR)
 5. **les *Orbivirus*** : ORUV
- **Le syndrome hémorragique** regroupant les symptômes de la fièvre maningo-encéphalite mais aussi entraînant une atteinte du système nerveux central. Ces symptômes sont retrouvés dans différents cas :
 1. **les *Alphavirus*** : virus des encéphalites équine américaines (EEEV)
 2. **les *Flavivirus*** : virus de l'encéphalite japonaise, WNV
- **le syndrome encéphalique** regroupant les symptômes fièvre avec signes d'hémorragies (purpura, hématome, hématémèse, hématurie,...), que l'on observe pour :
 1. **les *Flavivirus*** : DENV, virus de la Fièvre Jaune, VMFK
 2. **les *Phlébovirus***
 3. **les *Lesnavirus*** : virus de Crimée, virus Congo

Ces symptômes se développent généralement après l'injection de salive due à la piqûre d'un arthropode infecté. Le virus ayant passé les premières barrières physiques va pouvoir se répliquer à proximité du point d'entrée et des ganglions lymphatiques, entraînant la phase de **virémie**. Suite à cela, le virus va circuler dans l'organisme jusqu'à atteindre les organes et les cellules cibles. Les arthropodes hématophages comme le moustique, la tique ou bien les phléotomes sont responsables de la transmission horizontale des arbovirus. Ils peuvent rester infectés et donc infectants toute leur vie mais aussi transmettre l'agent infectieux à leur descendance (transmission verticale). Ces points leur confèrent une importance primordiale dans les études épidémiologiques et dans la gestion des risques dus aux arboviroses.

1.4.2. Les moustiques en tant qu'arthropodes vecteurs

1.4.2.1. Cycle de vie du moustique

Apparus il y a plus de 170 millions d'années, les moustiques ou *Culicidae*, comptent plus de 3500 espèces réparties majoritairement en trois genres principaux : *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* [Resh and

Virus	Genre (famille)	Pathologie	Vecteur	Répartition géographique
▪ amaril	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre jaune	<i>Aedes</i> sp.	Afrique intertropicale, Amérique du Sud tropicale
▪ dengue (1 à 4)	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	syndrome fébrile algique, parfois fièvre hémorragique	<i>Aedes</i> sp.	Afrique, Asie, Pacifique, Amériques
▪ encéphalite japonaise	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	moustiques	Asie de l'Est et du Sud-est, Inde
▪ encéphalite de Saint Louis	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	moustiques	États-Unis
▪ <i>Murray Valley encephalitis</i>	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	moustiques	Australie
▪ <i>West Nile</i>	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre, parfois encéphalite	<i>Culex</i> sp.	Afrique, Bassin méditerranéen, Inde, Asie du Sud-est, États-Unis Europe, Asie (Sibérie)
▪ <i>tick-borne encephalitis</i> (Europe centrale et verno-estivale russe)	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	<i>Ixodidae</i>	Inde
▪ maladie de la forêt de Kyasanur	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre hémorragique	tiques	Sibérie
▪ fièvre hémorragique d'Omsk	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre hémorragique	<i>Ixodidae</i>	Amériques
▪ encéphalites équine américaines (EEE, VEE, WEE)	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae)	encéphalite	moustiques	Inde
▪ Chikungunya	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae)	syndrome fébrile algique	<i>Culex</i> sp.	Afrique, Asie
▪ O'Nyong-nyong	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae)	syndrome fébrile algique	<i>Anopheles</i> sp.	Afrique
▪ <i>Ross river</i>	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae)	syndrome fébrile algique	moustiques	Australie
▪ <i>California encephalitis</i>	<i>Bunyavirus</i> (Bunyaviridae)	encéphalite	moustiques	Amérique du Nord
▪ fièvre de la vallée du Rift	<i>Phlebovirus</i> (Bunyaviridae)	syndrome fébrile	moustiques	Afrique
▪ SF Naples	<i>Phlebovirus</i> (Bunyaviridae)	fièvre à phlébotomes	phlébotomes	Bassin méditerranéen, Asie
▪ SF Sicile	<i>Phlebovirus</i> (Bunyaviridae)	fièvre à phlébotomes	phlébotomes	Bassin méditerranéen, Asie
▪ CHF Congo	<i>Marobvirus</i> (Bunyaviridae)	fièvre hémorragique de Crimée-Congo	tiques	Europe, Afrique, Asie
▪ <i>Colorado tick fever</i>	<i>Coltivirus</i> (Reoviridae)		tiques	Amérique du Nord

FIGURE 1.4.: Principaux arbovirus pathogènes pour l'homme [Chippaux, 2003].

Cardé, 2003]. Présents dans le monde entier sauf en Antarctique, leurs niches écologiques sont situées au niveau des régions tropicales et tempérées. Ils sont décrits comme des insectes holométaboles (*cf* Figure 1.5) c'est-à-dire dont le stade larvaire diffère radicalement de l'adulte. Leur développement est donc cyclique et passe par une **phase larvaire** puis par une courte **phase nymphale** pour finir par un stade **adulte aérien** [Clements, 1992]. Selon les genres, les femelles moustiques pondent leurs œufs de différentes manières, sous différentes formes et dans des lieux différents (*cf* Figure 1.5 [1]). Plusieurs paramètres comme la couleur, l'humidité ou la présence de certains composés chimiques volatils peuvent jouer un rôle important pour le choix du site d'oviposition¹ [Maire, 1983, Sérandour et al., 2010]. Les œufs d'*Aedes* sont généralement déposés sur un substrat humide à l'interface air/eau (entre 100 et 200 par femelle). Pour le genre *Culex*, les œufs sont pondus par centaine sous forme de barquette à la surface de l'eau contrairement au genre *Anopheles* où les œufs sont pondus individuellement. Les lieux propices à la ponte sont variables selon l'espèce. En effet, certaines espèces d'*Anopheles* et de *Culex* préfèrent les eaux stagnantes alors qu'*Aedes vexans* préfèrent les terres humides inondées à répétition. Par ailleurs, *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* pondent dans les eaux retenues dans des contenants naturels tels que les cavités d'arbres, les coquilles ou dans des réceptacles artificiels (déchets plastiques). En fonction des conditions environnantes ainsi que de l'espèce, les œufs peuvent éclore au bout de 2 à 4 jours (*cf* Figure 1.5 [2]). Dans la plupart des cas, une diminution de la teneur en oxygène de l'eau, liée en partie à la présence importante de matières organiques est l'élément déclencheur de l'éclosion. Après cela, la phase larvaire se divise en quatre stades distincts séparés par trois mues successives (*cf* Figure 1.5 [3]). La durée de cette phase larvaire varie selon les espèces de *Culicidae*, la température du milieu, la densité larvaire ainsi que la disponibilité en nourriture. Dans les zones tropicales, elle ne dure que quelques jours pour des espèces telles que *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* alors qu'en zone tempérée, elle peut durer plusieurs mois chez le moustique *Aedes rusticus* [Clements, 1992]

Les larves de moustiques sont généralement considérées comme détritivores bien qu'elles se nourrissent aussi de micro-organismes vivants tels que les bactéries et les algues [Clements, 1992] La nourriture passe le canal alimentaire des larves par l'intermédiaire d'une paire de brosses buccales. Les *Anopheles* ont tendance à rester en surface et à filtrer les fines particules à l'interface air/eau (filtreurs de surface) tandis que les larves d'*Aedes* se positionnent plus en profondeur pour s'alimenter de sédiments et collecter des particules plus grosses grâce à leurs pièces buccales de type « brouteurs-collecteurs ». Enfin, les larves de *Culex* se nourrissent de façon intermédiaire en filtrant l'eau et en collectant les fines particules présentes dans la colonne d'eau (« filtreurs-collecteurs ») [Clements, 1992].

Après le stade larvaire, de profonds changements permettent à l'insecte de passer de l'état aquatique à l'état aérien. Au cours du stade nymphal ou pupal qui dure en moyenne 1 à 3 jours, l'insecte ne se nourrit pas (*cf* Figure 1.5 [4-5]).

Une fois la métamorphose accomplie, les moustiques mâles émergent en premier à la surface de l'eau, suivis des femelles 24 à 48 heures après. Les adultes se nourrissent de saccharides la plupart du temps trouvés dans les nectars végétaux. Après l'accouplement, les femelles ont besoin pour le développement et la maturation de leurs œufs d'un apport important de protéines qu'elles obtiennent par l'intermédiaire d'un repas de sang sur un hôte vertébré (*cf* Figure 1.5 [6-7]). Elles peuvent alors absorber l'équivalent de leur poids en sang. Selon les espèces de moustiques, les hôtes ciblés pour le repas de sang peuvent être plus ou moins spécifiques. Par exemple, les femelles de *Culex pipiens* se nourrissent essentiellement sur des oiseaux (ornithophiles) tandis que d'autres espèces comme *Ae. albopictus* ou bien *An. gambiae* se nourrissent sur les êtres humains et sont donc considérées comme anthropophiles [Salvan and Mouchet, 1994, Takken and Knols, 1999]. La fécondation des œufs se produit lors de la ponte grâce au stockage du sperme du mâle par la femelle dans une spermathèque.

1. Fait de déposer les œufs à un certain endroit.

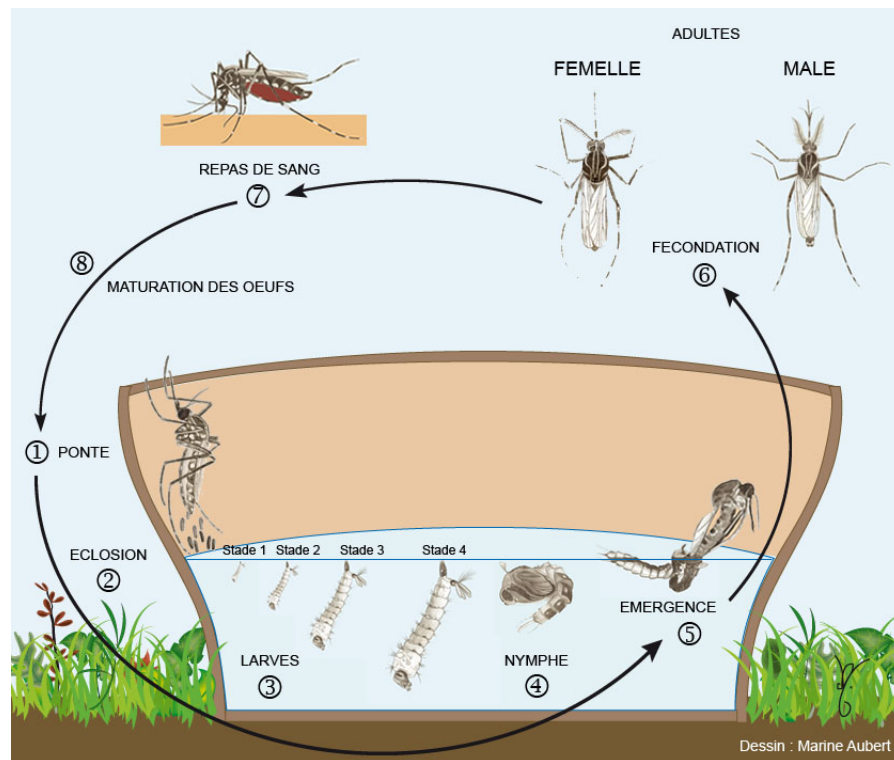


FIGURE 1.5.: Représentation du cycle de vie du moustique

La numérotation (1-7) renvoie aux différentes étapes qui sont décrites dans le paragraphe cycle de vie du moustique [Guillaumot, 2009].

1.4.2.2. Principales arboviroses transmises par les moustiques

Il existe de nombreux arbovirus transmis essentiellement par les moustiques, pathogènes pour l'Homme. Les plus importants au point de vue sanitaire sont le virus de la dengue, le virus de l'encéphalite japonaise, le virus du Nil occidental et le virus du Chikungunya.

1.4.2.2.a. La dengue

La dengue est une des arboviroses la plus importante en terme de morbidité² et mortalité. Environ 2 millions de personnes par an sont touchées par la forme sévère de la dengue et plus de 20 000 en décèdent. Le virus de la dengue est divisé en 4 sérotypes (DEN1 à DEN4), répandus dans toutes les régions tropicales et subtropicales, où il provoque chaque année d'importantes épidémies. Il occasionne plusieurs formes de cas clinique : la dengue asymptomatique, la dengue classique (DC) et les formes plus graves qui sont la dengue hémorragique (DH) et la dengue avec syndrome de choc (DSC) souvent mortelle pour les enfants. La mortalité est de l'ordre de 1 à 5% lors d'une DH et peut aller jusqu'à 20% en moins de 24 heures pour une DSC. Son réservoir est humain et les vecteurs sont les moustiques du genre *Aedes*. Comme *Aedes aegypti* qui est le vecteur principal de la dengue. Néanmoins *Aedes albopictus* est aussi un vecteur potentiel et d'autant plus important qu'il peut être présent dans des régions de climat tempéré. Afin d'établir un système de prévention efficace, le développement d'un futur vaccin tétravalent par Sanofi ou une surveillance constante des populations et des vecteurs sont mis en place (cf Figure 1.6).

2. Caractère relatif à une maladie.



FIGURE 1.6.: Poster de prévention contre la dengue (Année 2011)

1.4.2.2.b. L'encéphalite japonaise

L'encéphalite japonaise est considérée comme l'arbovirose la plus grave. En effet, très souvent asymptomatique, elle a une létalité de 5% à 60% suivant les formes déclarées. Même si 30 à 50% des personnes guérissent, ceux-ci conservent des séquelles neurologiques et/ou psychiatriques. Le virus est présent dans la majorité des pays de l'Asie quelque soit le climat, permettant l'existence de zones épidémiques larges allant de la Chine à la Russie. Le virus appartient au genre des flavivirus comme le virus de la dengue. Il est transmis à l'homme par des moustiques du genre *Culex* ayant piqué des animaux virémiques (cf Figure 1.7) . Il n'existe aucun traitement connu de nos jours. Les seuls moyens de prévention sont la vaccination Ixiaro® qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché européenne le 31 mars 2009 et le contrôle des zones et des individus pouvant engendrer la maladie.

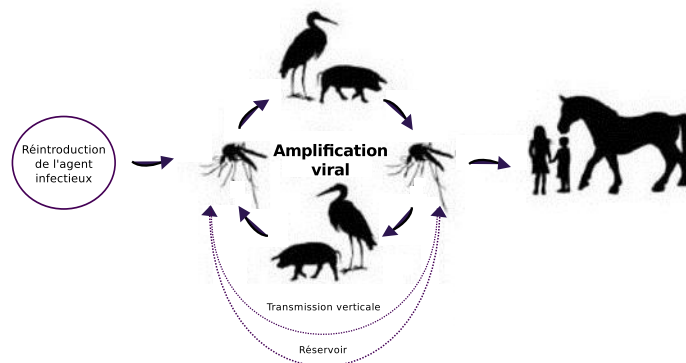


FIGURE 1.7.: Cycle de transmission de l'encéphalite japonaise [Duggan and Plosker, 2009].

1.4.2.2.c. La fièvre du Nil occidental

Le virus du Nil occidental (West Nile virus) est de nos jours un virus sous surveillance. Les oiseaux sont le réservoir permanent du *Flavivirus*. L'arbovirose qui en résulte est transmise aux hommes et aux grands mammifères via le vecteur moustique du genre *Culex*. Isolé pour la première fois dans la province du Nil en Ouganda (1937), il fut décrit lors de petites épidémies qui touchèrent en premier l'Égypte et Israël dans les années 1950. Localisé en Europe centrale et Méridionale ainsi qu'au Moyen Orient et en Inde, le virus du Nil occidental engendra de nouvelles épidémies dans les pays du Maghreb, d'Europe centrale et de la Russie. En 1999, les premiers cas et décès furent déclarés à New York (USA). Il ne lui a fallu qu'un an pour s'étendre à tous les États-Unis et atteindre en 2003 plusieurs provinces

du Canada mais aussi l'Amérique du sud avec l'Argentine. Pour ce qui est de la France, le virus ré-émergea dans les années 2000 sous forme d'encéphalite équine en Camargue et 7 cas dans le Var. Il n'y a de nos jours aucun vaccin et traitement connu.

1.4.2.2.d. Le Chikungunya

Le virus du Chikungunya est un *Alphavirus* découvert dans les années 1953 en Tanzanie. Il est présent en Afrique Sub-Saharienne, en Asie du sud-est et dans le sous-continent Indien. Plus récemment, il fut identifié aux Comores vers la fin 2004 puis il atteint les îles de l'Océan Indien comme Mayotte, l'île Maurice, les Seychelles et le Sri Lanka. Il entraîna une importante épidémie en 2006 à la Réunion. L'Indonésie en 2007 et Singapour en 2008 furent aussi touchées par le Chikungunya. La transmission directe homme-homme n'existant pas, elle est dite indirecte et utilise le vecteur moustique du genre *Aedes* (*Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*). La transmission verticale *in utero* de la mère à l'enfant est aussi possible. De nos jours, aucun médicament n'existe et aucun vaccin n'a été mis sur le marché. La seule prévention possible repose sur la lutte anti-vectorielle.

1.4.2.3. Dynamiques des populations : impacts du changement climatique sur les écosystèmes vectoriels

Étant dans un système ouvert, la répartition et la circulation de certaines espèces sont mondiales. Ce phénomène s'est accentué avec l'apparition et l'augmentation des trafics internationaux comme le fret ou les transports commerciaux. Ces échanges sont responsables de la circulation d'espèces dans des environnements encore vierges comme ceci a été démontré pour *Aedes albopictus* qui est couramment connu sous le nom de moustique tigre (*cf.* Figure 1.8).

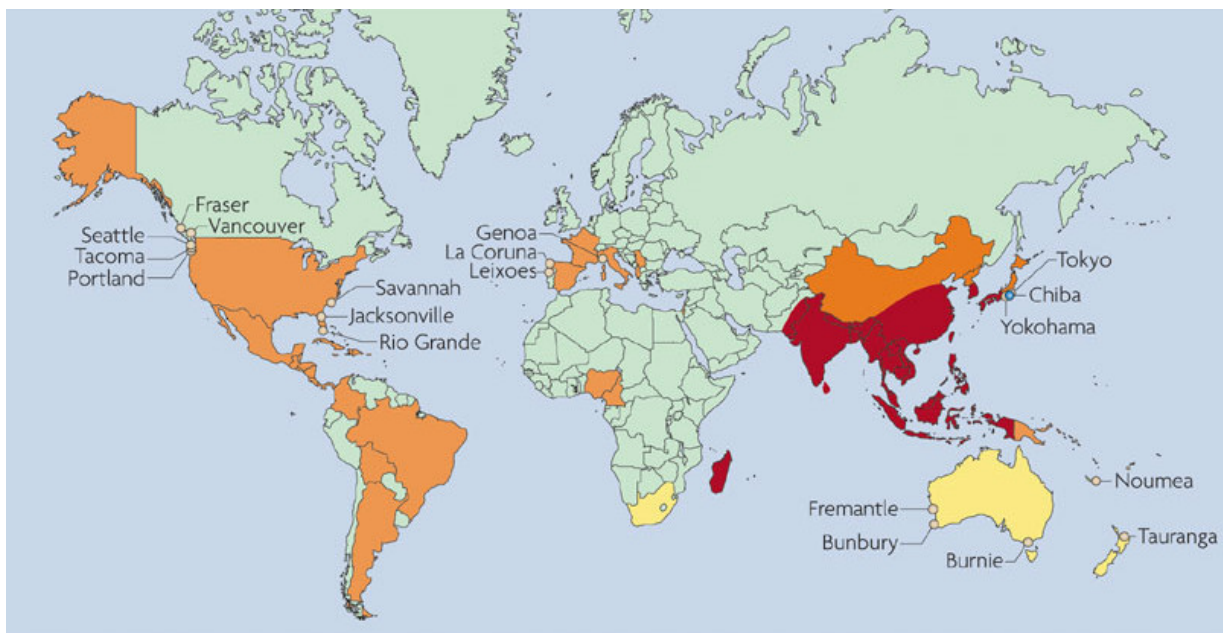


FIGURE 1.8.: **Dynamique et répartition mondiale d'*Aedes albopictus*.**

La zone rouge indique l'ancienne répartition d' Ae. albopictus, la zone orange indique les populations d'Ae. albopictus reproductrices établies depuis 30 ans et la zone jaune indique les ports où A. albopictus a été intercepté [Randolph and Rogers, 2010].

Du fait des conséquences sanitaires importantes dues aux arbovirus, des protocoles et des surveillances entomologiques, citoyennes et humaines ont été mis en place. La surveillance entomologique a pour objectif de détecter l'arrivée d'un vecteur dans une zone géographique encore vierge mais aussi

d'estimer sa densité et sa prolifération dans les zones où il est présent. Cette surveillance, réalisée par des organismes publiques comme l'Établissement Interdépartemental pour la Démoustication (EID), permet la mise en place de mesures de démoustication et empêche leur implantation pérenne. La surveillance citoyenne est réalisée par des associations et des particuliers par l'entretien de leur jardin. La surveillance de la population humaine se fait essentiellement par déclaration des maladies à transmission vectorielle et la mise en œuvre de moyens de prévention des populations à risques. Ces systèmes de surveillance permettent la détection précoce des maladies dites à transmission vectorielle mais aussi, à l'aide d'études épidémiologiques, le suivi de la dynamique des populations vectorielles et l'évolution de leurs niches écologiques. En 2007, Rodhain démontra que l'environnement avait un impact sur la relation entre les agents infectieux, les vecteurs, et les vertébrés prouvant ainsi qu'une modification du climat affecte l'équilibre des écosystèmes [Rodhain, 2007]. En effet, la sensibilité de certaines espèces de moustiques aux variations de température démontre qu'une augmentation de celle-ci aurait un impact sur le développement, la dynamique, l'abondance, l'activité et la géolocalisation des moustiques vecteurs [Ludwig et al., 2005, Bicout, 2005]. L'augmentation de la température de l'eau entraînerait une maturation plus rapide des larves et augmenterait le densité des populations vecteurs lors des périodes de transmission [Githeko et al., 2001]. Il faut rajouter à cela qu'un climat plus chaud accentuerait la fréquence des repas suite à une digestion plus rapide du repas sanguin des moustiques entraînant une augmentation des transmissions. Tout ceci tend à démontrer qu'une augmentation de la température amplifierait la capacité vectorielle des moustiques dans la limite où le réchauffement ne dépasse pas les 34°C , température à laquelle la survie des vecteurs est limitée. L'augmentation des précipitations est un autre facteur du changement climatique mais contrairement au facteur thermique le lien climat-arbovirose est plus difficile à établir et plus complexe [McMichael et al., 2006]. Cependant, il a été démontré que la modification des saisons pluvieuses peuvent affecter l'habitat vectoriel notamment par la mise en eau des gîtes larvaires [Mondet et al., 2005, Schaeffer et al., 2005]. Une accentuation des précipitations augmenterait le nombre et la qualité des gîtes larvaires et par la même occasion la densité de la végétation. Toutefois, des pluies torrentielles peuvent, à l'inverse, entraîner la destruction des gîtes larvaires naturels rendant prédominant l'existence des gîtes larvaires autour des habitations [Sabatier, 2007].

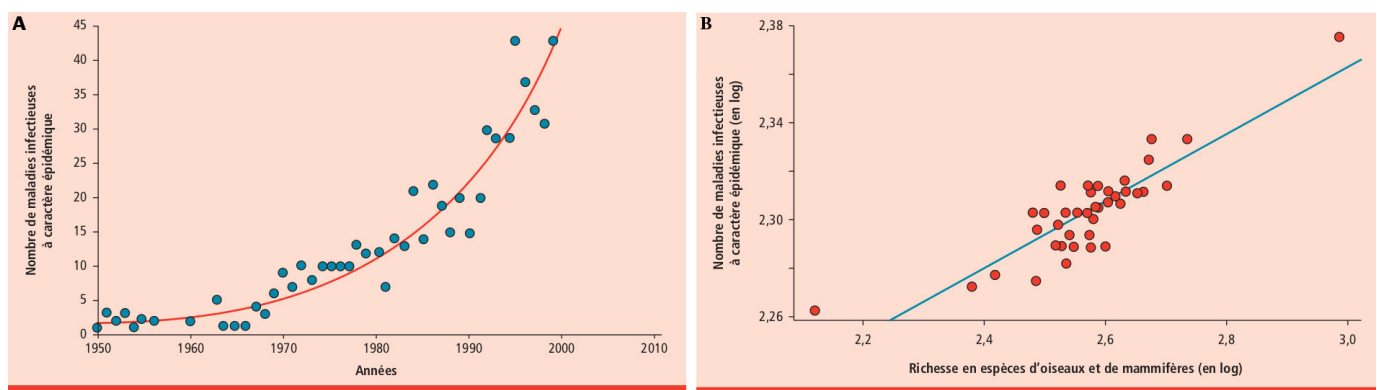


FIGURE 1.9.: **Evolution du nombre des maladies infectieuses en fonction des années et de la richesse en espèces d'oiseaux et de mammifères**

(A) Augmentation du nombre de maladies infectieuses à caractère épidémique depuis les années 1950 en Europe.

(B) : Relation entre le nombre de maladies infectieuses et la richesse en espèces d'oiseaux et de mammifères pour les différents pays européens [Morand and Waret-Szkuta, 2012].

Par ces observations, le Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'évolution du Climat (GIEC) et l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) prévoient une augmentations des maladies infectieuses et indiquent qu'elles auraient déjà touché de nouveaux continents [McMichael and Campbell-lendrum, 2003]. En

plus des facteurs climatiques, la superficie des pays jouerait un rôle important sur la biodiversité des espèces et donc sur le nombre des maladies infectieuses (*cf* Figure 1.9).

Les arboviroses sont donc un sujet important du fait de leur impact sanitaire mais aussi d'actualité avec par exemple la présence de vecteurs des maladies à transmissions vectorielles comme *Aedes albopictus* (moustique tigre) en France.

Chapitre 2

Le virus de l'Hépatite C : présentation générale

Afin d'étudier la possible réplication et transmission du virus de l'hépatite C par le moustique, il est intéressant de s'attarder sur les spécificités et le fonctionnement de l'agent infectieux et de ces moyens d'études (animal, cellulaire et les réplicons génomiques). Dans ce chapitre, l'histoire du virus sera abordée, une description détaillée (génome et protéine virale) de la particule virale et de son cycle viral sera réalisée. Puis, une description rapportant les intérêts et les limites de chaque modèle d'étude sera établie afin de répertorier tous les moyens mis en œuvre pour cultiver cet agent viral.

2.1. Histoire

Les hépatites sont communément décrites comme des inflammations chroniques ou aiguës du système hépatique. Les plus connues sont *(i)* les hépatites virales, particulièrement les hépatites A, B, C, D et *(ii)* les hépatites alcooliques. Leur connaissance est très ancienne et remonte à de nombreux siècles. Néanmoins, ce n'est qu'au XXe siècle, après la seconde guerre mondiale, que la première distinction entre les hépatites virales sérologiques A et B s'est faite. Cette première différenciation se basait essentiellement sur l'étude du temps d'incubation et sur le mode de transmission. La description de l'hépatite C fut plus tardive et commença en 1974 sous le terme **d'Hépatite Non-A et Non- B (HNANB)** [Feinstone et al., 1975]. A cette époque, le diagnostic des hépatites A et B était devenu fiable [Alter et al., 1975]. A partir de cette avancée, de nombreux cas non attribuables au virus de hépatite A (HAV) et au virus de l'hépatite B (HBV) furent détectés, ce qui poussa la communauté scientifique à s'interroger sur l'existence d'une autre hépatite. En 1978, Alter *et al.* démontrèrent qu'il existait un agent infectieux transmissible des HNANB en infectant des chimpanzés par des sérums contaminés [Alter et al., 1978]. Pendant plusieurs années, l'infection des chimpanzés par l'agent associé aux HNANB fut le seul moyen d'étude. Il permit de nombreuses avancées comme la découverte des tubules cyto-logiques, conséquences cellulaires du HNANB [Shimizu et al., 1979]. De cette découverte, Feinstone *et al.* déduisirent que l'agent infectieux était un virus enveloppé (Feinstone et al., 1983). Néanmoins, aucune description réelle du virus n'était alors clairement établie. Il faut attendre **1989** pour que le génome soit décrit comme étant un ARN simple brin ayant un cadre ouvert de lecture (ORF) unique [Choo et al., 1989]. C'est alors que le virus HNANB prit **le nom de virus de l'hépatite C ou HCV**. Au niveau médical, en 1989, Kuo *et al.* démontrèrent que la première cause de transmission du HCV était transfusionnelle ce qui permit par la suite de limiter la transmission du virus [Kuo et al., 1989]. A partir de cette époque, de nombreuses équipes de recherche se mirent à étudier le virus afin de trouver des thérapies efficaces. En 1998, la bithérapie Interféron/Ribavirine fut le premier traitement utilisé contre le HCV. Néanmoins, l'absence de modèle cellulaire limitait la compréhension du virus. Afin de pallier cela, en 1999, l'équipe de Ralf Bartenschlager mit au point un réplicon dérivé du génome du HCV [Lohmann et al., 1999]. De nos jours, le traitement du HCV reste délicat malgré la mise sur le marché récente de nouvelles thérapies utilisant les molécules anti-protéases, telles que le Bocéprevir® ou le Télaprevir®.

2.2. Epidémiologie et modes de contamination

Afin d'étudier la répartition et la fréquence de la maladie ainsi que l'efficacité des mesures préventives contre le HCV, l'organisation mondiale pour la santé (OMS) s'est intéressée au taux d'incidence et à la prévalence du virus à travers le monde (cf Figure 2.1). Le taux d'incidence est calculé en rapportant le nombre de nouveaux cas d'une maladie sur la taille d'une population donnée pendant une période donnée. Il est malheureusement très difficile d'établir un taux d'incidence précis du fait du caractère initialement asymptomatique de la maladie qui perturbe la détection des nouveaux cas. Néanmoins, l'amélioration des techniques de détection et de dépistage ont permis de calculer des taux de prévalence. Cet indicateur est le reflet du nombre de personnes atteintes par la maladie dans une population donnée. L'infection par le HCV touche un large éventail de la population mondiale. Il a été estimé que plus de **3% de la population mondiale** serait touchée par le HCV, ce qui représenterait plus de **170 millions de personnes** (OMS). Néanmoins, cette prévalence mondiale cache de grandes disparités continentales et communautaires. Les régions de la Méditerranée Orientale, du Pacifique occidental et de l'Afrique sont des régions très touchées par le HCV. Elles possèdent chacune un fort taux de prévalence pouvant atteindre 5,3% pour l'Afrique. Ces régions regroupent des pays très fortement touchés par le virus. C'est notamment le cas de l'Egypte, qui a un taux de 18,1%, du Rwanda (17%) et du Burundi (11,1%). Ces forts taux peuvent souvent être expliqués par de mauvaises conditions d'hygiène, par le non-contrôle des produits dérivés du sang. C'est notamment le cas de l'Egypte qui doit la plupart de ces cas à l'utilisation de seringues contaminées lors d'une campagne de lutte contre les schistosomoses ([Mohamed et al., 2006]. En revanche, à l'exception de la Roumanie, les pays européens sont très peu touchés. En France, le taux de prévalence est de 1%, ce qui est aussi le cas de la plupart des autres pays européens. Toutes ces données épidémiologiques ont permis de définir des zones où la transmission du HCV est dite endémique (ex Afrique centrale, péninsule asiatique) pouvant évoluer dans certaines circonstances vers une transmission épidémique ce qui est notamment le cas pour l'Egypte ou les Etats-unis [Ward, 2013].

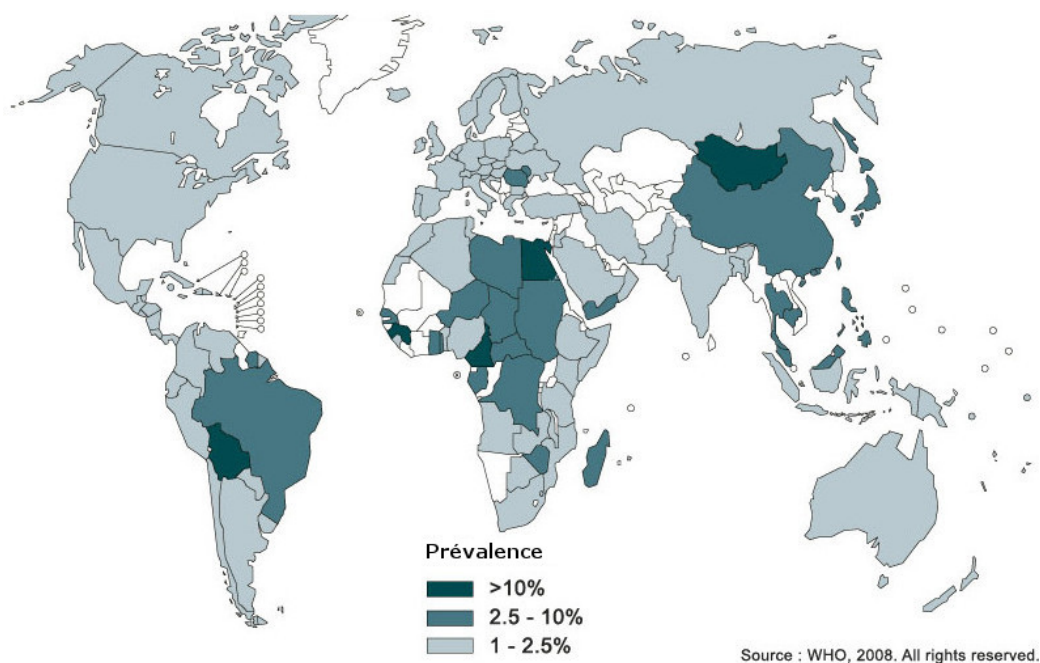


FIGURE 2.1.: Distribution mondiale du HCV en 2007 (d'après les données de l'OMS 2008)

La voie principale de contamination de l'hépatite C passe par une exposition directe à du **sang contaminé**. La contamination aurait lieu la plupart du temps lors de transfusions sanguines, de greffes d'organes, d'opérations chirurgicales lourdes ou d'hospitalisations avant les années 1992, date à laquelle le dépistage lors d'un don est devenu obligatoire. La toxicomanie est l'un des autres grands modes de transmission de l'hépatite C. Cette voie de contamination peut s'expliquer par l'échange et le recyclage de seringues contaminées. Ce mode de transmission touche essentiellement les jeunes et s'est beaucoup développé dans les années 60 du fait de la méconnaissance des maladies virales transmissibles. Le risque de transmission du virus de la mère à l'enfant est estimé à 5% et se déroule majoritairement lors de l'accouchement. Néanmoins, ce risque est augmenté lorsque la mère est infectée par d'autres virus. En effet, il a été estimé qu'une co-infection HCV et HIV augmenterait les risques de transmission de 20%. La transmission par voie sexuelle n'est pas encore clairement définie mais celle-ci serait liée aux pratiques sexuelles dites à risque. Cependant, il a été démontré que les prostituées et les patients co-infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) auraient une prévalence plus forte [Stary et al., 1992]. D'autres facteurs de risque comme un nombre élevé de partenaires, la co-infection avec d'autres maladies sexuelles (syphilis) ou la non-utilisation de préservatifs augmenteraient les risques de contamination. Les causes de l'infection par le HCV sont difficiles à établir dans certains cas. Il a été estimé que dans 20 à 40% des cas, la cause de la contamination reste inconnue [Karmochkine et al., 2006].

2.3. Phylogénie et distribution géographique

Le HCV fait partie de la famille des *Flaviviridae* qui comprend les genres *Flavivirus* (ex le virus de la fièvre jaune, le West Nile virus et le virus de la dengue), *Pestivirus* (virus infectant les mammifères, tels que les bovins/porcins), *Pegivirus* HGV (le virus de l'hépatite G) et *Hepacivirus* (HCV) (infectant les primates). Le virus de l'hépatite C humain avec le CHV (canine hepacivirus) sont les seuls membres du genre *Hepacivirus* connu de nos jours [Kapoor et al., 2011]. Il existe 7 génotypes majeurs du HCV et de nombreux sous-types identifiés au sein de chaque type (*cf.* Figure 2.2) [Henquell et al., 2011].

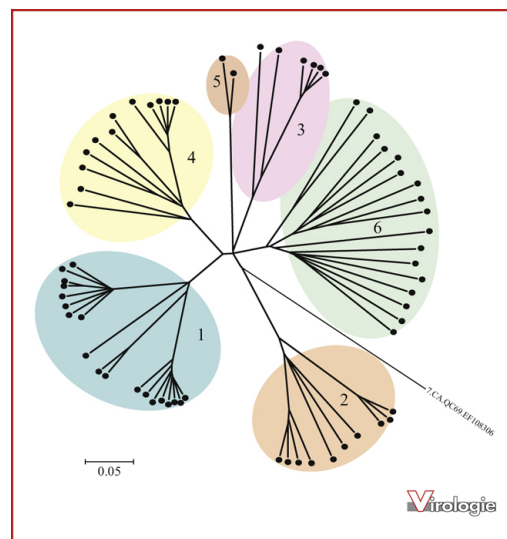


FIGURE 2.2.: **Arbre phylogénétique des différents génotypes du virus de l'hépatite C par la méthode de neighbor-joining, en utilisant le modèle de Tamura-Nei (programme MEGA4).**

La topologie a été établie avec 67 séquences codantes de virus de l'hépatite C (ORF complet du génome viral) représentatives des génotypes 1 à 6. La séquence CA.QC69.EF108306 représente le génotype 7 récemment décrit [Henquell et al., 2011]

Les génotypes du HCV sont différenciés en fonction du degré d'homologie de séquence entre les différents isolats. On décrit les génotypes comme étant des isolats partageant 65 à 70% d'identité de séquences, les sous-types comme étant un isolat d'un même génotype présentant 75 à 80% d'homologie et les quasi-espèces comme un isolat ayant plus de 90% d'homologie. La coexistence d'une forte réplication et l'absence d'activité 3'-5' exonucléasique correctrice entraîne une grande variabilité de son génome [Simmonds, 2004] et donc une **distribution géographique mondiale variable** (cf. Figure 2.3) [Zein, 2000]. De nos jours, les génotypes majoritaires mondiaux sont le 1a (19-33%), le 1b (26-30%), le 2 et le 3a [Tamalet et al., 2003, Payan et al., 2005]. Cette distribution du HCV coïnciderait avec de mauvaises pratiques en matière d'administration parentérale¹ [Frank et al., 2000, Tanaka et al., 2004]. En effet, dès le début des années 90, les génotypes 1, 2 et 3 étaient les plus représentés chez les donneurs de sang et chez les patients infectés en Europe [McOmish et al., 1994]. En France, les génotypes 1b et 2 sont plus fréquemment présents chez des patients transfusés et ayant plus de 50 ans alors que les génotypes 1a ou 3a sont généralement retrouvés chez des patients ayant une histoire de toxicomanie intraveineuse de moins de 50 ans [Martinot-Peignoux et al., 1999]. Par ailleurs, la répartition des génotypes peut varier d'une région à l'autre. La région Auvergne concentre un nombre important de patients infectés par le génotype 5 contrairement aux régions du sud et à la région parisienne où les génotypes 2 et 4 sont retrouvés plus fréquemment [Henquell et al., 2004, Verbeeck et al., 2006]. Cette répartition géographique est de nos jours très utile pour les études épidémiologiques, l'étude des modes de transmission et de la mobilité virale.

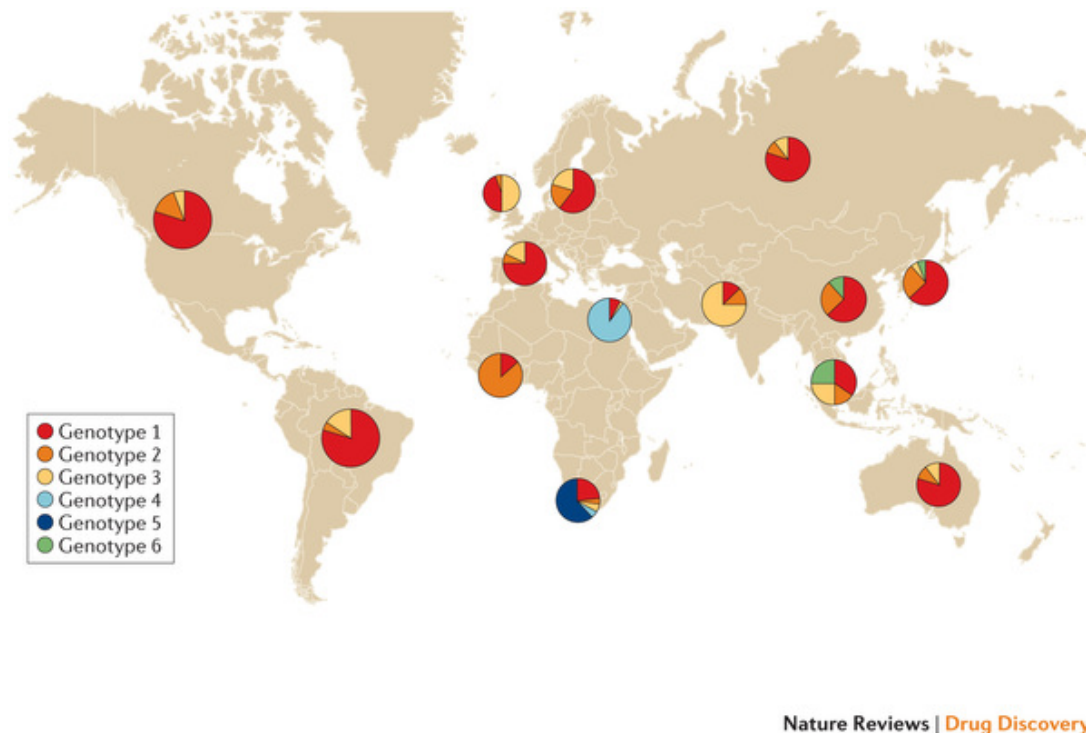


FIGURE 2.3.: **Diversité de la répartition géographique des différents génotypes du HCV** [Manns and von Hahn, 2013].

1. L'administration d'une substance au moyen d'une injection

2.4. Génome

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN monobrin linéaire de polarité positive composé d'environ 9600 nucléotides (*cf.* Figure 2.4). Son génome est relativement riche en GC et se divise en trois grandes parties :

- **5'UTR** (*untranslated regions*) : la partie 5' UTR contient 341 nucléotides. Elle est divisée en quatre domaines (domaine I à IV) possédant des structures secondaires et tertiaires tige-boucle [Wang et al., 1995]. La région 5' UTR possède une partie nommée **IRES** (*Internal Ribosome Entry Site*), composée des domaines II, III et IV, correspondant au site de fixation ribosomal de la sous-unité 40S [Honda et al., 1996b].
- **Le cadre ouvert de lecture** : cette région comporte une unique ORF commençant par un codon initiateur de la traduction (AUG) juste après la région 5'UTR. Cette région code pour une polyprotéine qui sera clivée pour donner les protéines virales : les protéines de la capsid, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.
- **3'UTR** : la région 3' UTR est une région de taille variable. Elle se divise en trois parties 3'var, poly U/UC et 3' X . Ces régions sont importantes pour la réplication virale.

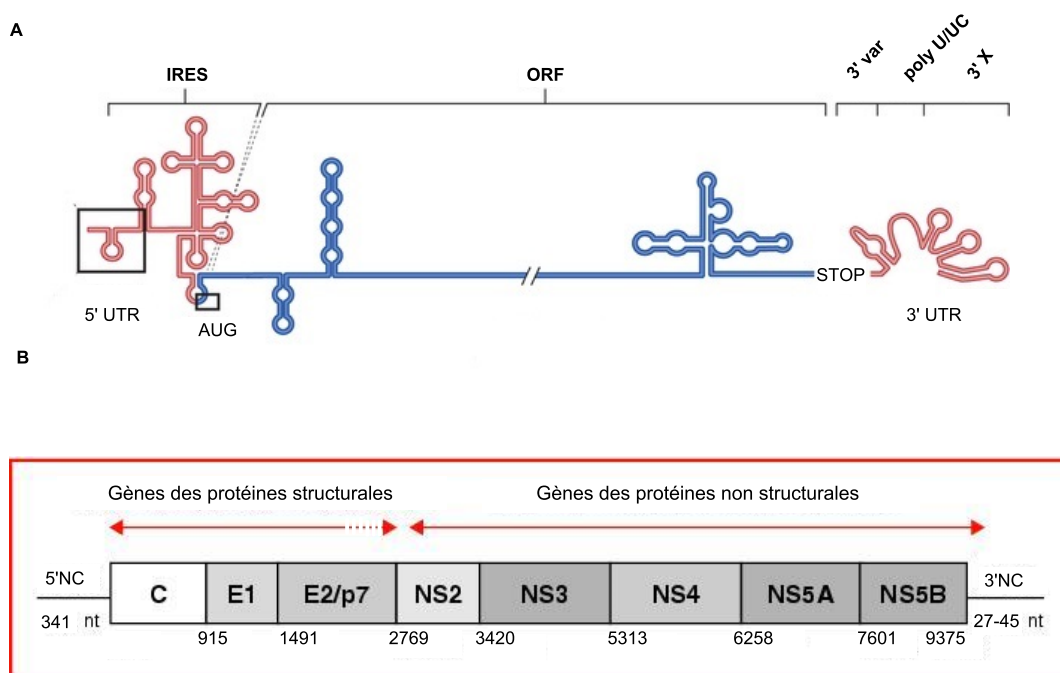


FIGURE 2.4.: Représentation schématique et structurale de l'organisation génomique du HCV.

[A] Le brin d'ARN (+), long de 9,6 kb, est représenté avec les structures secondaires des régions 5' et 3' non codantes (UTR) en rouge ainsi que l'open reading frame en bleu. Les structures secondaires de la capsid et de NS5B sont aussi représentées [Scheel and Rice, 2013]. [B] Organisation génomique du HCV. Le génome du HCV est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Deux régions non codantes, situées aux extrémités 5' et 3' du génome et nommées respectivement 5'NC et 3'NC, encadrent la partie codante constituée d'un cadre unique de lecture. La numérotation du premier nucléotide de chaque gène est basée sur celle du génome de l'isolat de référence HCV1 [Gaudy and Goudeau, 2005].

2.5. Protéines virales

Dans un premier temps, l'ARN viral code pour une unique polyprotéine virale d'environ 3000 acides aminés (*cf.* Figure 2.5 ; 2.6). Plus généralement, les protéines qui en découlent sont divisées en deux groupes : les protéines structurales et les protéines non structurales.

2.5.1. Les protéines structurales

- **La protéine de la capsid** est une protéine majeure de la **nucléocapsid**. Elle est composée de 191 résidus de taille variable pouvant aller de 23 kDa pour la forme immature à 17 kDa [Yasui et al., 1998]. Elle est essentiellement basique et se retrouve au niveau du cytoplasme associée au réticulum endoplasmique, aux gouttelettes lipidiques mais aussi aux mitochondries [Barba et al., 1997]. Il a été montré que cette protéine pouvait interférer avec un certain nombre de processus cellulaires impliqués dans la pathogenèse virale [McLauchlan, 2000]. De plus, elle stimulerait le phénomène de stéatose et de fibrose [Bataller et al., 2004, Asselah et al., 2006], déclencherait un stress oxydant, interférerait avec les mécanismes de défense antivirale de la cellule hôte entraînant une perturbation du système immunitaire par le HCV qui serait responsable de l'induction des voies menant au carcinome hépatocellulaire (HCC) [Bode et al., 2003, Moriya et al., 1998]. Plus récemment, il a été démontré que cette protéine aurait une activité chaperonne lors de la réplication du virus [Ivanyi-Nagy et al., 2006].
- **Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2** représentent les composants majeurs de l'**enveloppe virale** de taille respective 33 à 35 kDa pour la protéine E1 et de taille 70 à 72 kDa pour E2. Elles sont transmembranaires de type I et possèdent un ectodomaine N-terminal de 160 acides aminés (aa) et de 334 aa se trouvant dans la lumière du réticulum endoplasmique [Dubuisson et al., 1994] et un C-terminal transmembranaire de 30 aa au niveau de réticulum endoplasmique. Les domaines transmembranaires de E1 et E2 sont composés de deux régions hydrophobes séparées par des résidus chargés très conservés. E1 et E2 possèdent de nombreux sites de glycosylation allant de cinq à six sites pour E1 et de neuf à onze sites pour E2. Cette N-glycosylation présente dans de nombreuses espèces virales jouerait un rôle dans la stabilité, l'antigénicité et sur les propriétés biologiques de l'enveloppe. Du fait de la proximité du site de liaison au récepteur CD81, certains N-glycanes de E1 et E2, E2N1(aa417), E2N6(aa532) et E2N11(aa645) seraient impliqués dans l'entrée du HCV [Goffard et al., 2005]. Ils moduleraient l'interaction avec CD81 et participeraient à la reconnaissance des anticorps neutralisants sur E2 [Helle et al., 2007]. À l'heure actuelle, la nature, la composition et la microhétérogénéité des sucres attachés aux glycopeptides E2 ont pu être identifiées [Jacob et al., 2008]. Les deux sites N476 (N5) et N540 (N7) possèdent un niveau de conservation de 75% et 89%, conférant à la région de la glycoprotéine E2 (aa523-544) un intérêt bien particulier dans le cadre des approches thérapeutiques vaccinales. Trois régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la séquence E2 : la région HVR1, de 27 aa, la région HVR2 constituée de 9 aa et plus récemment la région HVR3, comprise entre les régions HVR1 et HVR2, constituée de 35 aa [Troesch et al., 2006]. D'un point de vue conformationnel, la région HVR1 est très conservée ce qui est cohérent avec le rôle qu'elle joue en tant que cible de la réponse immune et dans l'attachement du virus à la cellule [Penin et al., 2001] mais ne serait pas essentiel au cycle viral du HCV [Forns et al., 2000]. La protéine E1 est encore très peu connue. Néanmoins, elle pourrait intervenir dans la fusion intra-cytoplasmique [Rosa et al., 1996, Flint and McKeating, 2000].

2.5.2. Les protéines non structurales.

- **La protéine p7** est une petite protéine hydrophobe de 63 aa (7 kDa) localisée dans le réticulum endoplasmique. Elle possède deux domaines transmembranaires avec ses N et C-terminal dans la lumière du réticulum endoplasmique. Par sa structure et ses caractéristiques biologiques, la protéine p7 a pu être classée comme étant une **viroporine** jouant le rôle d'un canal ionique [Montserret et al., 2010] et pourrait être indispensable au relarguage et/ou l'assemblage des particules virales. Malgré son rôle qui reste énigmatique dans le cycle viral, il a été démontré qu'elle serait essentielle dans l'infection du HCV chez le modèle du chimpanzé [Sakai et al., 2003].
- **NS2** est une protéine transmembranaire non glycosylée de taille moyenne 21-23 kDa, possédant deux régions impliquées dans l'association avec le réticulum endoplasmique [Santolini et al., 1995] mais qui ne seraient pas impliquées dans la réplication du cycle viral. Néanmoins, l'association de NS2 et la région N-terminale de la protéine NS3 constitue la **NS2-3 protéase** qui est une cystéine protéase qui permettrait le clivage protéolytique de la jonction NS2 et NS3 et serait activée par la protéine chaperonne cellulaire Hsp90 [Pallaoro et al., 2001, Waxman et al., 2001]. De plus, le clivage du N-terminale de la protéine NS2 et de p7 est réalisé par une peptidase de la cellule hôte se trouvant au niveau du réticulum endoplasmique [Carrère-Kremer et al., 2002, 2004]. La protéine NS2 seule perd toute activité protéasique et se serait dégradée par le protéasome. Par ailleurs, NS2 pourrait interagir avec les cellules hôtes en influençant son mécanisme de signalisation et jouerait un rôle dans l'assemblage des particules virales. [Dumoulin et al., 2003, Popescu et al., 2011].

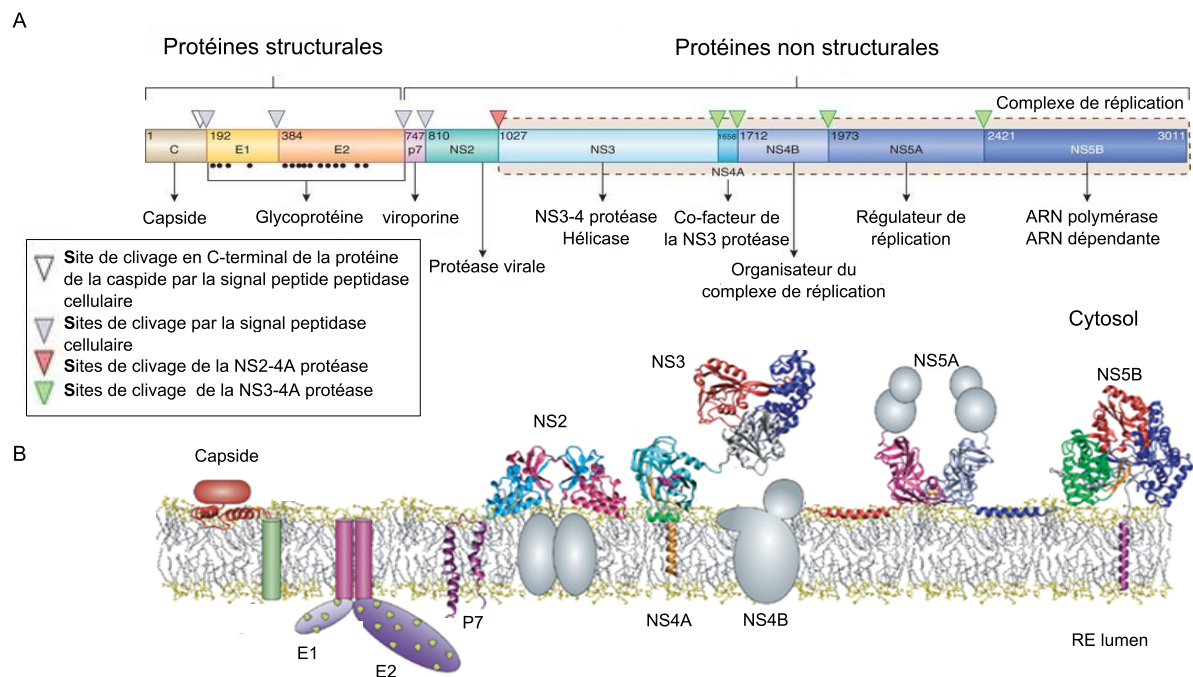


FIGURE 2.5.: Représentation schématique et structurale de l'organisation génomique et protéique du HCV.

[A] Représentation de la polyprotéine virale. Les losanges blanc et gris indiquent les sites de clivage de la polyprotéine par les protéases cellulaires. Les losanges rouge et vert indiquent les clivages par NS2-3 et la NS3-4A protéases. Les sites de glycosylation sont indiqués par les points noirs en E1 et E2. Le nombre d'acides aminés est représenté sur chaque protéine. [Scheel and Rice, 2013] [B] Protéines du HCV connue enchassées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE lumen). L'absence de structure est matérialisée par des zones grises [Moradpour et al., 2007]

- **NS3** est une protéine multifonctionnelle de 70 kDa relativement hydrophobe. Elle ne possède pas de domaine transmembranaire mais reste associée à la membrane par des liaisons non covalentes avec NS4A. La première activité enzymatique de NS3 est **une activité protéasique** située dans le tiers N-terminal et permet le clivage en cis du complexe NS3/4A et en trans des jonctions NS4B/5A et NS5A/B [Bartenschlager et al., 1994]. L'autre activité enzymatique décrite, est **une activité DexH/D-box RNA hélicase-NTPase** qui se situe en C-terminal et serait impliquée dans le processus de réplication et de traduction [Borowski et al., 2002, Tai et al., 1996]. Néanmoins, le rôle le plus clairement attribué à cette protéine est une fonction d'inhibition du facteur IRF3 en réponse à la stimulation du récepteur TLR3 par des ARN double brin [Foy et al., 2003] perturbant ainsi l'immunité innée. Il a été aussi rapporté qu'elle participerait à la génération du complexe de réplication [Lindenbach and Rice, 2005] et interviendrait dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire ainsi que dans le phénomène de cancérogenèse [Tellinghuisen and Rice, 2002, Deng et al., 2006].
- **NS4A** est une toute petite protéine de 8 kDa. Sa partie centrale se lie à la protéine NS3 pour former un complexe s'ancrant à la membrane par le N-terminal [Wölk et al., 2000]. Sa fonction majeure est de servir de **co-facteur à la protéine NS3**. Néanmoins, il a été démontré que NS4A pourrait agir au niveau des mitochondries, entraînant l'apoptose cellulaire de la cellule hôte [Nomura-Takigawa et al., 2006].
- **NS4B** est une petite protéine hydrophobe de 27 kDa possédant quatre domaines transmembranaires et une hélice amphipathique en N-terminal permettant l'association avec le réticulum endoplasmique [Lundin et al., 2003, Hügle et al., 2001]. La fonction de cette protéine reste encore méconnue mais il semblerait qu'elle ait un rôle dans la réplication virale [Einav et al., 2004] en altérant l'intégrité des membranes intracellulaires (*membranous web*²) [Egger et al., 2002].
- **NS5A** est une phosphoprotéine possédant une forme phosphorylée de 56 kDa et une forme hyperphosphorylée de 58 kDa [Kaneko et al., 1994]. Elle est attachée à la membrane intracellulaire par une hélice alpha amphipathique située en N-terminal et s'insère horizontalement dans la bicouche lipidique [Brass et al., 2002, Elazar et al., 2003]. Au niveau du réticulum endoplasmique, elle forme un homodimère capable de fixer le brin ARN permettant la réplication virale et l'assemblage de la particule virale [Appel et al., 2006, Seeger, 2005]. De plus, il a été démontré que son état de phosphorylation aurait un impact sur l'efficacité de la réplication [Appel et al., 2005, Evans et al., 2004]. NS5A modulerait la réponse interféron [Tan and Katze, 2001] et aurait un impact sur les voies de signalisation cellulaire [Tellinghuisen and Rice, 2002, Reyes, 2002, Macdonald and Harris, 2004].
- **NS5B** est une protéine phosphorylée (68 kDa) possédant un C-terminal transmembranaire [Ivashkina et al., 2002]. Elle a une séquence nucléotidique très conservée qui se retrouve au niveau des différents génotypes du virus mais aussi chez d'autres virus ARN. Par ailleurs, elle possède un motif d'acides aminés GDD spécifique aux **ARN-polymérase ARN dépendantes (RdRP)**. Sa représentation cristallographique montre trois sous domaines nommés *finger*, *thumb* et *palm* comparable à d'autres polymérase virales [Lesburg et al., 1999, Bressanelli et al., 1999]. NS5B est donc l'ARN polymérase du HCV permettant la synthèse d'un brin ARN de polarité négative qui servira de matrice pour générer le brin ARN de polarité positive. Néanmoins, cette polymérase ne possède pas de système de correction et elle est donc responsable d'un nombre élevé de mutations et donc d'un nombre élevé de variants viraux chez un même patient appelés quasi-espèces. L'ensemble des protéines NS3-NS5B forme donc le complexe de réplication du virus de l'hépatite C [Bartenschlager et al., 2004].

2. Membrane du réticulum endoplasmique impliquées dans la réplication de l'ARN viral

A

Nom des protéines	Masse Molaire (kDa)	Etats	Fonctions
Capside	17-23	Protéines structurales	Composant de la nucléocapside <ul style="list-style-type: none"> • Interagit avec l'ARN viral • Interfère avec des processus cellulaires
E1	33-35		Composant de l'enveloppe virale <ul style="list-style-type: none"> • Interagit avec les récepteurs cellulaires qui permet l'entrée virale
E2	70 -72		
p7	7	Protéines non structurales	Viroporine <ul style="list-style-type: none"> • Impliquée dans l'assemblage et le relargage des particules virales
NS2	23		Protéine transmembranaire non glycosylée <ul style="list-style-type: none"> • Rôle dans l'assemblage de la particule virale • L'alliance de NS2 et du N-terminal de NS3 NS2-3 protéase : clivage protéolytique de la jonction NS2 et NS3
NS3	70		Protéines non transmembranaire relié a NS4A (liaison non covalente) <ul style="list-style-type: none"> • N-terminal : NS3-4A protéase permettant le clivage de NS3/4A, NS4B/5B et NS5A/5B • C-terminal : Hélicase capable de casser les liaisons ARN/ARN et les structures secondaires des ARN monobrins Implication dans le complexe de réplication
NS4A	6		Co-facteur de la protéase NS3-4A
NS4B	27		Protéine transmembranaire non structuré hydrophobe <ul style="list-style-type: none"> • Altération des membranes intracellulaires • Implication dans la réplication
NS5A	56 - 58		Phosphoprotéine <ul style="list-style-type: none"> • Implication dans la réplication virale, dans la réponse interféron et dans les voies de signalisation cellulaire
NS5B	68		ARN-polymérase ARN dépendante <ul style="list-style-type: none"> • Permet la synthèse du brin (-) qui servira de brin matrice pour la synthèse du brin (+)

B

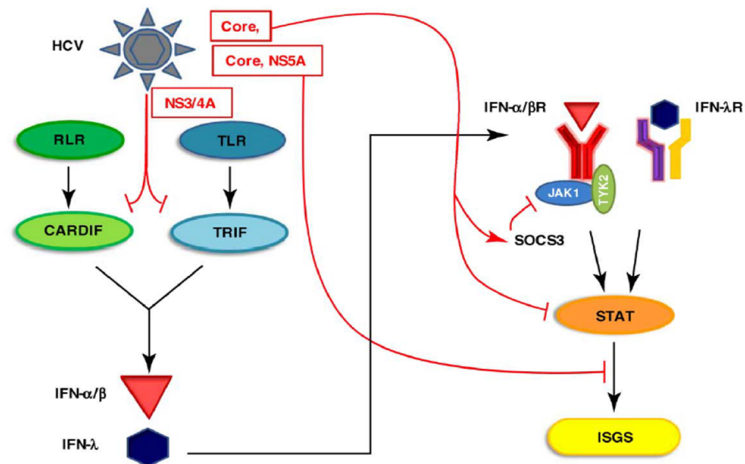


FIGURE 2.6.: Bilan fonctionnel des protéines du HCV (A) et perturbations de la réponse innée par les protéines du HCV (B) [Georgel et al., 2010]

2.6. Cycle viral

Le cycle viral est composé de quatre grandes étapes qui sont : **(i) la fixation** (cf. Figure 2.7 [1]) **et l'internalisation virale** (cf. Figure 2.7 [2]) avec la decapsidation (cf. Figure 2.7 [3]) qui permettra la libération de l'ARN (+) dans le cytoplasme. Cette étape sera suivit de **(ii) la traduction de la polyprotéine virale** (cf. Figure 2.7 [4]) qui permettra de produire les protéines nécessaires à la formation de nouveaux virions mais aussi à la formation du complexe de réplication permettant **(iii) la réplication virale** (cf. Figure 2.7 [5]). Grâce a cela, l'ARN (-) sera produit qui permettra de servir de matrice pour la synthèse d'un ARN (+). **(iiii) L'assemblage et la sécrétion** de la particule virale (cf. Figure 2.7 [6-7]).

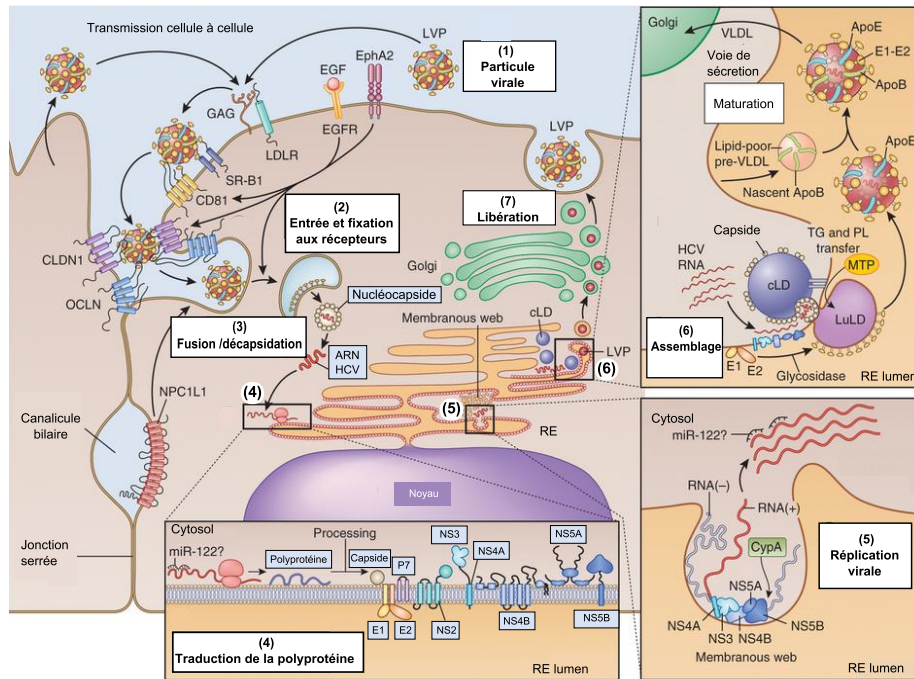


FIGURE 2.7.: Représentation schématique du cycle de réplication du HCV.

Les différentes étapes et sous étapes du cycle virale sont numérotées de 1 à 7 et sont détaillées dans le paragraphe cycle viral. Les abréviations LVP et cLD sont respectivement utilisées pour lipoparticules et gouttelettes lipidiques [Scheel and Rice, 2013].

2.6.1. Fixation et internalisation de la viroparticule (cf. Figure 2.7 [1-2-3], 2.8)

La première étape de réplication du HCV commence avec une étape de fixation à la cellule hôte. Cette fixation se matérialise par la reconnaissance des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 avec des protéines d'une cellule dite « cellule-hôte ». *In vivo*, les **glycoaminoglycanes** (GAGs) comme les **sulfates d'héparane** (HS) seraient les premiers points de fixation entre le HCV et la cellule hôte [Barth et al., 2003, 2006, Koutsoudakis et al., 2006]. Cette fixation non spécifique permettrait ensuite la complexation du virus avec d'autres molécules cellulaires dont les plus connues sont le « **Low Density Lipoprotein Receptor** » (LDL-R), le « **high density lipoprotein scavenger receptor classe B type 1** » (SRBI), le **complexe membranaire CD81** et deux protéines des jonctions serrées comme **la claudine-1** (CLDN1) et **l'occludine** (OCLN) [Haid et al., 2010]. De façon générale, la fixation de E2 au niveau du récepteur CD81 activerait la voie de signalisation RHO se qui modifierait l'orientation des filaments d'actine de la cellule permettant le basculement de la particule virale vers les jonction serrées [Brazzoli et al., 2008]. D'autre récepteurs, comme le récepteur du facteur de croissance (EGFR) et le récepteur éphrine de type A ont été identifiés chez l'homme comme étant essentiels à l'entrée

du HCV en favorisant l'interaction CD81-Cldn1 [Lupberger et al., 2011, Diao et al., 2012]. De plus, il semblerait que le complexe CLDN1 et CD81 jouent un rôle essentiel dans l'entrée virale et que la majorité des CLDN1 interagissent avec OCLN mais aucune relation n'a pu être mise en évidence entre CLDN1 et OCLN [Harris et al., 2010, Krieger et al., 2010]. D'autres études portant sur l'endocytose du HCV ont démontré que l'entrée virale dans les cellules hépatiques humaines, primaires ou non, utiliserait la voie d'endocytose clathrine dépendante (Blanchard et al., 2006). Cependant, le phénomène d'internalisation reste encore méconnu. Coller *et al* ont suggéré que le HCV serait internalisé avec les récepteurs CD81 et CLDN1 dans des endosomes précoces et tardifs [Coller et al., 2009]. Le pH acide de ces endosomes (pH=5.5) serait responsable de la pénétration par fusion membranaire de l'enveloppe virale et de la décapsidation. Néanmoins, les mécanismes de fusion du HCV ne sont pas complètement élucidés. Il a été suggéré que la fusion du HCV était similaire à celle des autres *Flaviridae* et que la fusion membranaire pH-dépendant permettait l'internalisation du génome dans le cytosol des cellules hôtes. l'ARN génomique alors dissocié de la capsid servirait d'ARN messager permettant au complexe de traduction de synthétiser une polyprotéine virale.

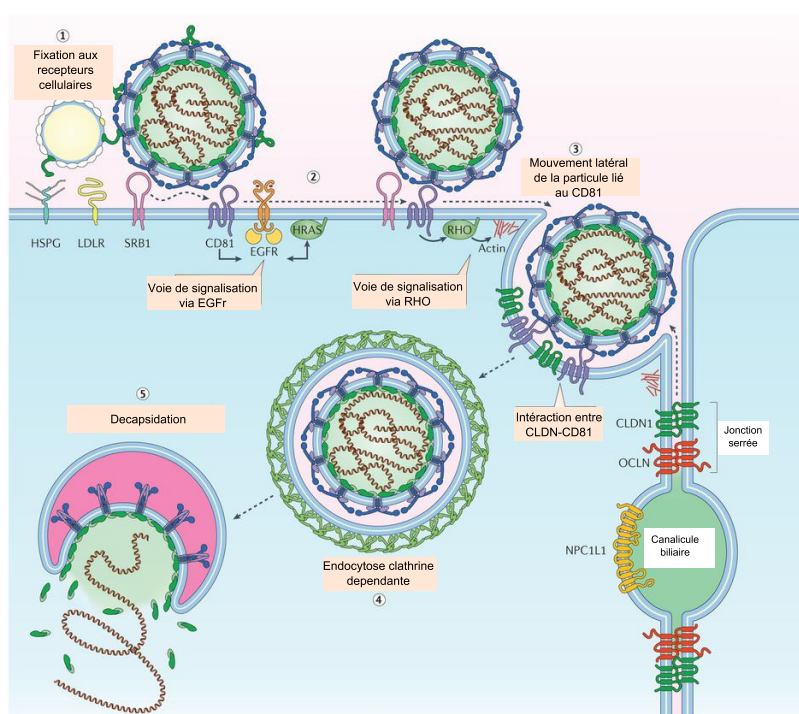


FIGURE 2.8.: **Fixation et internalisation de la virolipoparticule**

Les lipoparticules virales (LVP) s'attachent aux récepteurs non spécifiques héparane sulfate (HS), le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) et la classe récepteur 1 membre (SRB1) B. SRB1 pourrait induire des changements de conformation de la glycoprotéine E2 libérant le site de liaison à CD81 (étape 1). L'interaction de CD81 avec E2 active alors la transduction du signal via le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) et HRAS, ainsi que par des GTPases Rho (étape 2). Ces événements de signalisation entraînent le mouvement latéral du complexes HCV-CD81 vers les sites de contact cellule-cellule (étape 3), l'interaction de CD81 avec la Claudine 1 (Cldn1), et l'internalisation du HCV par endocytose (étape 4). Le faible pH du compartiment endosomal entraîne la décapsidation (étape 5). [Lindenbach and Rice, 2013].

2.6.2. Traduction et maturation de la polyprotéine (cf. Figure 2.7 [4], 2.9)

Dans le cytoplasme, l'ARN viral de polarité (+) est directement traduit en une seule polyprotéine d'environ 3000 amino-acides. La traduction est initiée grâce à l'IRES qui a une structure secondaire complexe et hautement conservée comprenant quatre domaines distincts (I-IV) [Bukh et al., 1992, Simmonds et al., 1993]. La structure de l'IRES en « tige-boucle » confère à cette région sa fonction de formation du complexe 80S. La traduction de la polyprotéine commence par la fixation de la sous unité ribosomale 40S (cf. Figure 2.9) au niveau du domaine III de l'IRES sur lequel se fixera le facteur eucaryote **eIF3** [Kieft et al., 2001, Kolupaeva et al., 2000, Sizova et al., 1998]. De plus, le domaine IV contenant le codon initiateur AUG fixera le complexe ternaire eIF2-GTP-met ARNt permettant la stabilisation du complexe 48S [Otto and Puglisi, 2004, Ji et al., 2004, Honda et al., 1996a]. Ce complexe ternaire sera hydrolysé par le domaine II de l'IRES entraînant le relargage de eIF2, eIF3la fixation de la sous unité 60S et des facteurs d'initiation eIF5, eIF5B [Locker et al., 2007, Fraser et al., 2009, Pestova et al., 1998]. De plus, la traduction pourrait être modulée par les protéines virales (capside, NS4A et NS4B) mais aussi par des protéines cellulaires comme la protéine La [Ali et al., 2000] et la protéine Pyrimidine Tract-Binding protein (PTB) [Ali and Siddiqui, 1995]. Des la fin de l'assemblage, la phase d'élongation peut alors commencer et former une pré-protéine jusqu'à l'arrivée du codon stop entraînant le relargage de la chaîne polypeptidique. Le clivage de cette chaîne par deux protéases virales et une protéase cellulaire va permettre la maturation de la chaîne polypeptidique produisant ainsi les protéines structurales et des protéines non structurales du HCV. Les protéines structurales sont clivées par une signal peptide peptidase (SPP) présente au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique [Dubuisson et al., 1994]. Les protéines non structurales sont elles clivées par deux protéases virales : d'une part la NS2-3 protéase dotée d'une activité autocatalytique permettant le clivage de NS2 et NS3 et d'autre part la sérine protéase NS3-4A qui permet le clivage de NS3/4A, NS4B/5B et NS5A/5B [Grakoui et al., 1993].

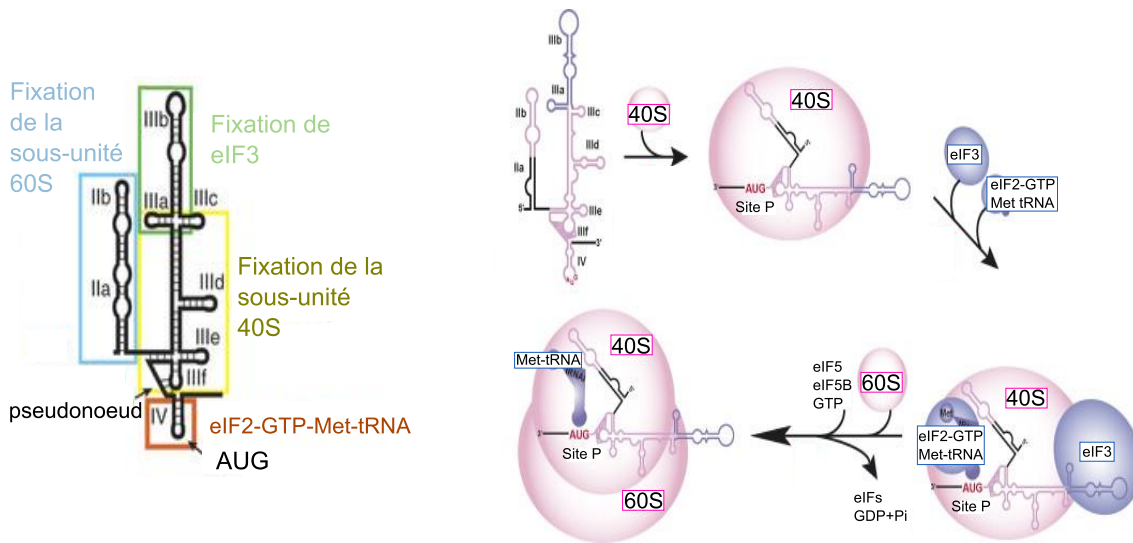


FIGURE 2.9.: **Formation du complexe actif 80S**

2.6.3. Réplication du génome viral (cf. Figure 2.7 [5])

Le phénomène de réplication se fait grâce à l'activité ARN-polymérase ARN-dépendante de la protéine NS5B et des autres protéines non structurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Celles-ci forment un complexe de réplication avec les protéines cellulaires de l'hôte qui s'associent au réseau membranaire vésiculaire et péri-nucléaire. La formation des *membranous web* permettront alors une concentration des produits viraux, fournira les constituants lipidiques et protégera les ARN viraux des mécanismes de défense de la cellule hôte [Egger et al., 2002]. Ce complexe ainsi formé pourra synthétiser un brin ARN négatif qui servira de matrice pour la synthèse de l'ARN positif. Ces ARN (+) génomiques seront alors encapsidés.

2.6.4. Assemblage et libération des particules virales (cf. Figure 2.7 [6-7] 2.10)

Le mécanisme d'assemblage est de nos jours encore mal connu (cf. Figure 2.10). Néanmoins, la protéine de la capsidie s'oligomérisent au niveau de gouttelettes lipidiques et interagiraient avec la région 5'UTR de l'ARN (+) avec l'aide de la protéine NS5A afin de former la nucléocapsidie. D'autres études ont montré que le complexe NS2-p7 jouerait un rôle clef dans la production de nouveaux virions. Ce complexe (NS2-P7) interagiraient avec l'enzyme NS3-4A afin, de libérer la capsidie des gouttelettes lipidiques pour former une particule virale neosynthésisée. La formation de l'enveloppe se réaliserait par bourgonnements à travers les membranes intracellulaires. Les protéines structurales ont été localisées au niveau du réticulum endoplasmique mais aussi au niveau de l'appareil de Golgi prouvant que les virions formés en suivant les voies normales de sécrétion [Serafino et al., 2003].

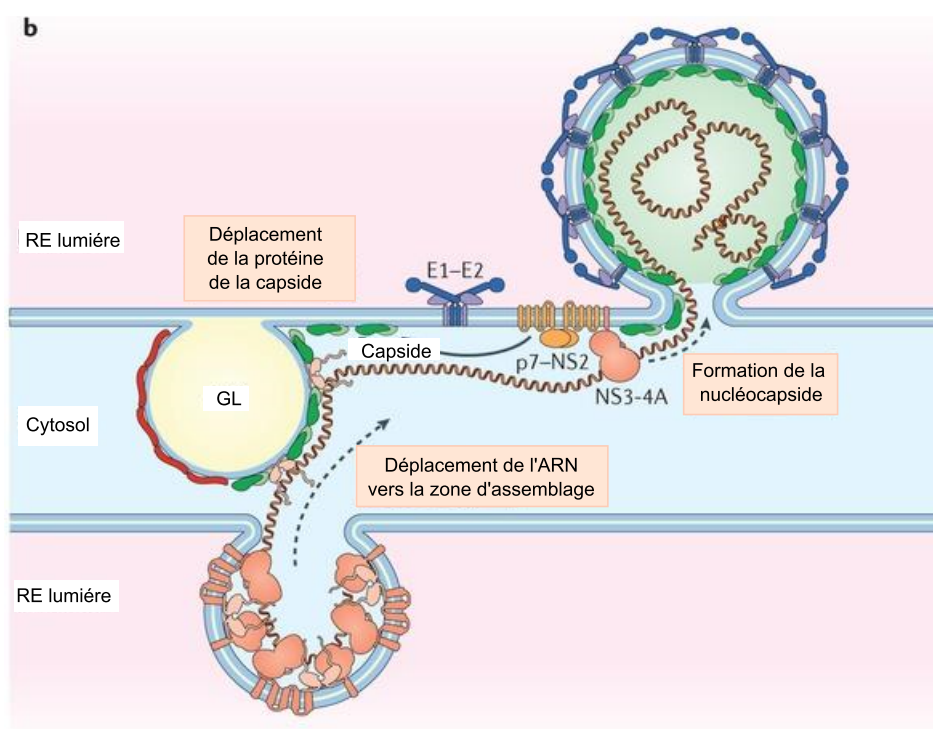


FIGURE 2.10.: **Assemblage de la particule virale**

L'ARN viral est décalé pendant la réplication ce qui permet l'assemblage du virus. L'interaction entre p7-NS2 et NS3-4A permet le recrutement de la protéines de la capsidie au niveau du site d'assemblage du virus. Les particules virales s'assemblent par le recrutement de complexes E1-E2 et le bourgonnement dans le RE [Lindenbach and Rice, 2013].

2.7. Les modèles d'études

2.7.1. Les modèles animaux

2.7.1.1. Chimpanzés (cf. Figure 2.11)

Le chimpanzé (*Pan troglodytes*) est l'un des modèles les plus utilisés en ce qui concerne l'étude des voies d'infections, de réplication et pour l'étude des réponses immunitaires (innée ou humorale) du HCV [Alter et al., 1978, Hollinger et al., 1978]. Il est estimé que dans plus de 70% des cas, le virus de l'hépatite C persiste chez le chimpanzé, qui est une propriété que l'on retrouve chez l'homme. Dans la majorité des cas, l'infection par le HCV entraîne chez l'animal une augmentation des aminotransaminases due à l'inflammation et à la nécrose des tissus hépatiques. Malgré ces ressemblances, l'infection chez le chimpanzé se fait à faible niveau. Les différences majeures entre l'homme et le chimpanzé viennent de l'inefficacité du traitement interféron sur l'infection mais aussi du faible développement de cirrhose et de HCC lors d'une chronicité de la maladie chez le primate [Muchmore et al., 1988, Bradley, 2000]. Cependant une étude récente [Olsen et al., 2011] a montré que le chimpanzé infecté répondrait aux nouvelles thérapeutiques comme l'inhibiteur de protéase. Malgré ce nouvel intérêt, pour des raisons éthiques, de disponibilité et de coûts, l'utilisation du chimpanzé comme animal d'étude reste limitée.



FIGURE 2.11.: *Pan troglodytes*

2.7.1.2. *Tupaia belangeri* (cf. Figure 2.12)

Tupaia belangeri est une **musaraigne** génétiquement proche des primates et sensible à de nombreux virus comme l'herpes simplex (HSV), les rotavirus ainsi que l'HBV. De plus, il a été démontré que l'infection *in vivo* par le HCV [Xie et al., 1998] ainsi que la réplication dans les cellules primaires hépatocytaires était possible [Zhao et al., 2002]. Néanmoins, toutes les infections réalisées furent uniquement transitoires [Amako et al., 2010, Xu et al., 2007]. Les difficultés d'entretien, et notamment les difficultés de reproduction en captivité de cet animal proche des primates, limitent son utilisation comme animal d'étude.



FIGURE 2.12.: *Tupaia belangeri*

2.7.1.3. Les modèles murins

Un animal dit transgénique est un animal dont les gènes exogènes ont été modifiés dans le but d'analyser la fonction de ceux-ci. En ce qui concerne le virus de l'hépatite C, les souris transgéniques ont été utilisées dans le but d'étudier l'interaction entre le virus et la cellule hôte, l'effet de certains gènes du HCV *in vivo* mais aussi dans le but d'infecter *in vivo* des hépatocytes. Ce modèle d'étude a largement contribué à de nouvelles découvertes notamment sur l'impact des protéines de la capsid sur la physiologie de l'hôte et du virus. Néanmoins, l'infection directe par le HCV des souris transgéniques étant impossible, il est difficile de considérer les observations comme étant le reflet de l'infection *in vivo* par le HCV. Afin de pallier cette limitation, d'autres groupes de recherche ont utilisé des souris transgéniques dite chimériques ou humanisées (*cf.* Figure 2.13). Un des exemples de souris humanisées est **la souris transgénique SCID/Alb-uPA** [Meuleman et al., 2005]. Elle provient du croisement d'une souris Alb-uPA (urokinase plasminogen activator) ayant des lésions hépatiques sévères avec des souris SCID immunodéficientes. A partir de ce modèle, ces souris subissent une transplantation d'hépatocytes humains, puis sont infectées par du sérum humain infectieux. Il a été démontré que la réplication virale apparaissait après 35 semaines. Ces résultats prouvent que la réplication du HCV à l'échelle animale est possible. Ce nouveau modèle animal a aussi permis d'étudier l'efficacité de nouvelles thérapeutiques comme l'interféron alpha2b et les inhibiteurs de protéase BILN2061.

D'autres modèles de souris humanisées ont été élaborés pour étudier la réplication virale ainsi que l'activité de molécules anti-HCV. C'est notamment le cas des **souris Trimera** qui étaient utilisées à l'origine dans l'étude du développement des cellules B et T [Ilan et al., 2002, Lubin et al., 1994, 1991]. Ces souris ont été obtenues après élimination puis reconstruction de la moelle épinière provenant des souris immunodéficientes SCID, suivie d'une greffe de cellules hématopoïétiques et hépatiques humaines sous la capsule rénale. Infectées *ex vivo* avec du sérum HCV positif, 50% des souris développent une virémie pouvant aller jusqu'à 1×10^5 copies/mL. Néanmoins, l'utilisation de ce modèle dans l'évaluation de la cytotoxicité des traitements est impossible du fait de l'apparition d'anomalies histologiques dues à la transplantation extra hépatique. De plus, l'étude de l'entrée et de la neutralisation virale à l'aide de ce modèle reste impossible du fait de l'incapacité d'infecter *in vivo*. Plus récemment, Dorner *et al* ont développé un autre modèle de souris humanisée exprimant les récepteurs potentiels du HCV permettant ainsi l'étude de l'entrée virale [Dorner et al., 2011].

2.7.2. Les modèles cellulaires

Un des problèmes majeurs pour étudier le cycle viral du HCV est l'absence de modèle de culture cellulaire robuste réalisant le cycle complet de réplication.

Un des seules modèles cellulaires possible pour l'étude du HCV passe par l'utilisation de **cultures primaires d'hépatocytes humains** et les cellules mononuclées du sang périphérique [Cribier et al., 1995, Kao et al., 1997]. Les cellules hépatocytaires sont particulières car elles sont différenciées, polarisées (pôle apical et un pôle basolatéral) et possèdent des jonctions serrées (claudine 1 et occludin), récepteurs essentiels à l'entrée virale du HCV. Il a été démontré que des cellules isolées à partir du foie d'origine humaine ou de chimpanzé pouvaient répliquer le virus [Ito et al., 1996] mais aussi produire des particules potentiellement infectieuses. Étant très proches des conditions *in vivo*, elles furent une des seules possibilités pour l'étude du HCV. Néanmoins, un des inconvénients majeur à leur utilisation fut **la faible capacité répliquative de ces modèles et leur obtention (biopsie chirurgicale)**. Pour cela, d'autre équipe ont travaillé sur des lignées cellulaires.

Les plus connues sont d'origine hépatique comme WRL68 (Hépatocytes embryonnaires), Hep G2 (hépatoblastome), Huh-7, PH5CH (hépatocytes non néoplasiques) et les lignées d'origine lymphocytaire de type T et B, MOLT-4, MT-2 et Daudi. Les cellules PH5CH peuvent être infectées avec des particules virales provenant de sérum de patients chroniquement infectés par le HCV. La plupart de ces lignées utilisés ont **un niveau de réplication virale faible et transitoire (persistance des brins ARN+ et ARN-)**. En effet, les cellules Hep G2 sembleraient avoir un brin (+) ne persistant

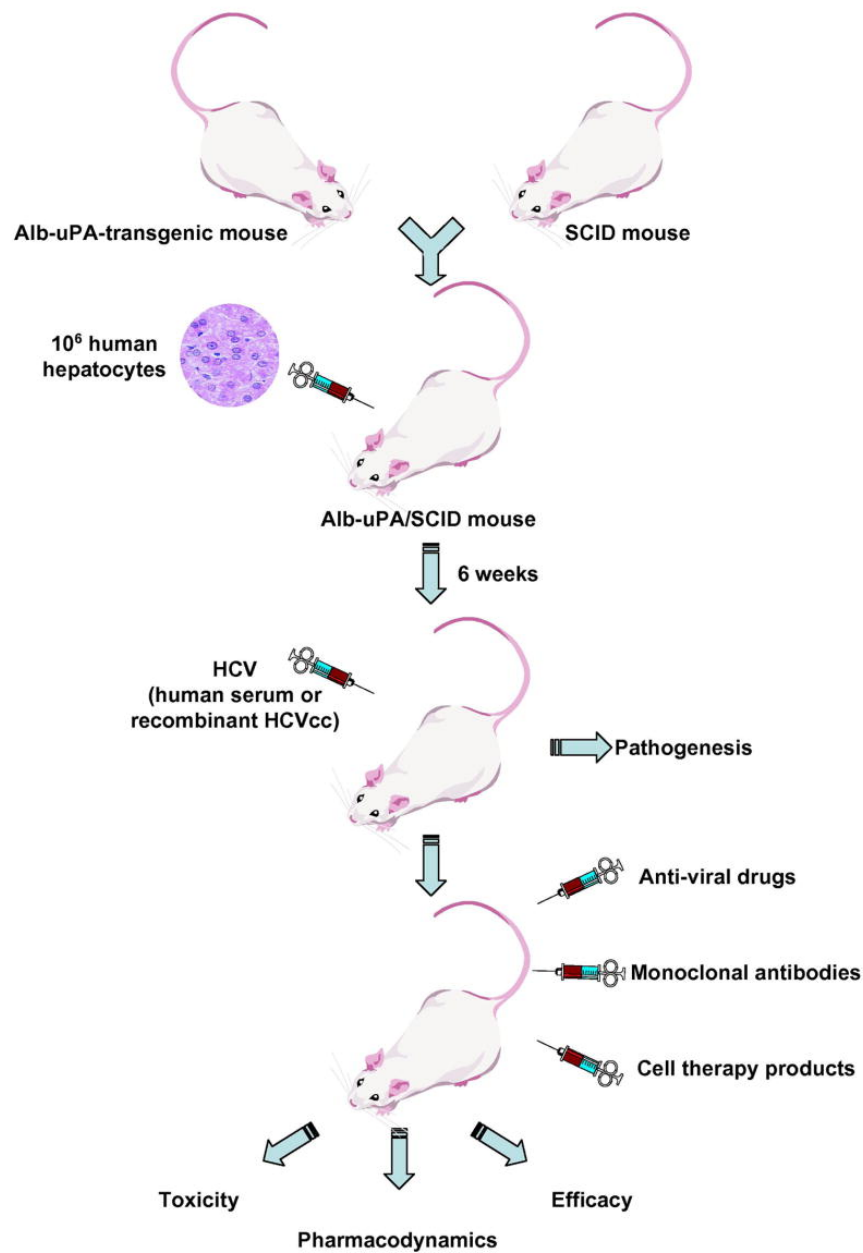


FIGURE 2.13.: **Modèle de souris chimérique Alb-uPA/SCID pour l'étude du HCV.**

Des souris Alb-uPA (hétérozygote) ont été croisées avec des souris SCID (homozygotes). La génération Alb-uPA/SCID sont transplantées avec des hépatocytes humain infectées par du sérum HCV positif ou par des particules recombinants HCVcc [Barth et al., 2008].

que deux jours ce qui prouverait l'existence d'un cycle viral incomplet. Par ailleurs, l'infection de ces cellules activerait la voie de signalisation de l'interféron et une réponse autophagique [Kanda et al., 2006, Ait-Goughoulte et al., 2008].

2.7.3. Les modèles viraux

2.7.3.1. Les modèles pseudoviraux : les Viral-Like Particles (VLP ou HCV-LPs)

Face à l'inefficacité des systèmes cellulaires à répliquer le virus de l'hépatite C, des modèles d'études viraux ont du être développés. Dans un premier temps, des *viral-like particles* (HCV-LPs) ont été synthétisées *in vitro* afin d'étudier l'étape de liaison aux récepteurs cellulaire. Ces particules contiennent les protéines structurales du HCV (core, E1, E2) et sont exprimées via des vecteurs viraux d'expression (le virus Semliki forest virus SFV) en cellules de mammifères ou d'insectes [Baumert et al., 1998, Blanchard et al., 2002]. Du fait de leurs propriétés antigéniques identiques aux particules naturelles, ces HCV-LPs sont intéressantes dans l'établissement de vaccins [Baumert et al., 1999]. Cependant, l'intérêt des ces HCV-LPs reste limité du fait de l'absence de matériel génomique.

2.7.3.2. Les réplicons subgénomiques

La mise au point d'un réplicon subgénomique fait suite au problème d'étude de la réplication du HCV. Le premier réplicon fut construit en 1999 sur la base du génotype 1b exprimant les gènes de résistance de la néomycine à la place des protéines structurales et les protéines non structurales du HCV contrôlées par l'IRES du EMCV (Virus de l'EncéphaloMyocardite) [Lohmann et al., 1999]. Afin d'établir une lignée produisant le réplicon subgénomique, cet ARN est transfecté dans les cellules hépatocytaires Huh-7 sous la pression d'une sélection antibiotique. D'autres lignées nommés Huh7.5 et Huh7-lunet ayant une forte réplication ont par la suite été sélectionnées. Cependant, il a été démontré que de nombreuses mutations adaptatives apparaissent, notamment dans les régions NS3, NS4B, NS5A, augmentant le facteur de réplication de 104 [Blight et al., 2000]. Une des conséquences de ces mutations est la phosphorylation de NS5A dont l'hyperphosphorylation agit négativement sur HCV [Evans et al., 2004]. Par la suite, d'autres réplicons ont été établis à partir d'autres isolats (1a et 2a). Malgré leur intérêt pour l'étude de la réplication et l'effet inhibiteur des thérapeutiques, ces réplicons adaptés à la culture n'ont jamais permis la production de virions infectieux [Pietschmann et al., 2002].

2.7.3.3. Les pseudoparticules (HCVpp) (cf. Figure 2.14)

Les HCVpp sont obtenues par transfection des vecteurs d'expression contenant uniquement les protéines E1 et E2 du HCV et la protéine core de la capside ainsi que le génome rétroviral (le virus de la leucémie murine, MLV) ou lentiviral. Les cellules ainsi transfectées produisent des pseudoparticules appelées HCVpp. La présence d'un marqueur et du génome n'étant pas celui du HCV permet le suivi de l'infection mais aussi le travail en laboratoire de catégorie de niveau 2 alors que la mise en culture du HCV se fait habituellement en niveau 3. Ces particules ont été très utilisées pour l'étude de l'entrée virale [Bartosch et al., 2003b] mais ne permettent cependant pas l'étude du cycle complet et plus précisément du système réplcatif viral.

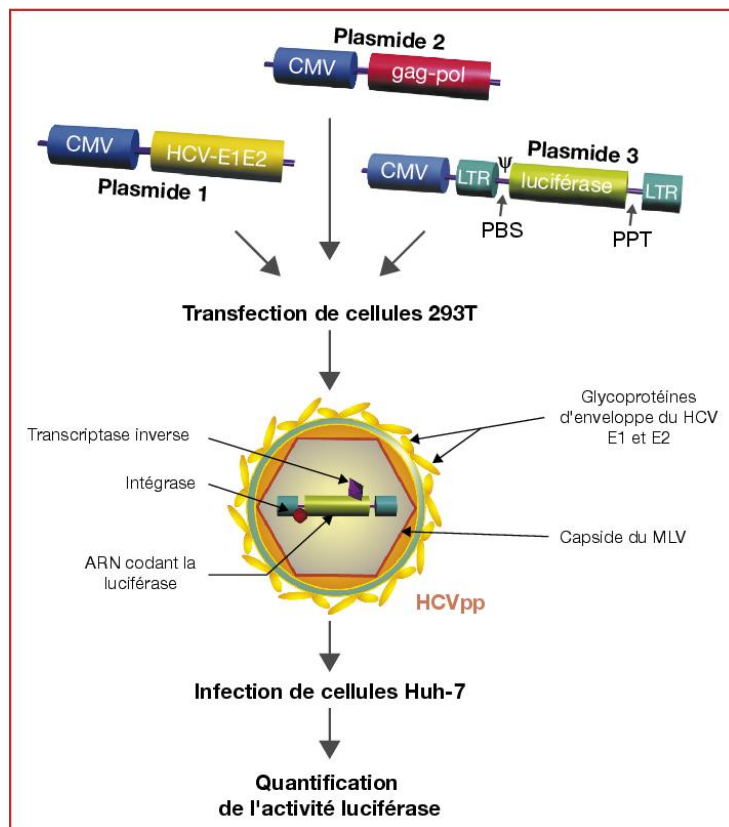


FIGURE 2.14.: Production de pseudoparticules du HCV [Helle and Cocquerel, 2008].

2.7.3.4. Formes plasmatiques du HCV (cf. Figure 2.15)

Le virus a été étudié à partir de son réservoir naturel c'est-à-dire à partir du sang et de sérum. Plusieurs inconvénients peuvent être notés :

1. Les particules virales obtenues à partir de sérum de patient HCV positif présentent des grandes disparités que ce soit au niveau de la taille, de la population et de ces caractéristiques morphologiques.
2. Les particules virales du HCV circulent dans l'hôte sous plusieurs formes. Elles peuvent circuler sous forme de virions libres, être associées aux immunoglobulines ou être associées aux lipoprotéines de faible ou de très faible densité [André et al., 2002].
3. Il faut ajouter à cela, que le HCV circulerait sous forme de **lipoviroparticules** à faible densité (LVP). Cette particularité explique l'hétérogénéité des particules virales, ainsi que leur faible densité (environ 1,10 g/mL) rendant ainsi difficile leur caractérisation. Pour remédier à cela, d'autres modèles ont été développés.

2.7.3.5. Le HCV produit en culture de cellule (HCVcc)

En 2005, le clone JFH1 a été isolé à partir d'une hépatite fulminante de génotype 2a chez une patiente japonaise. Son ARN a été transfecté dans des cellules dérivées de la lignée Huh-7 ayant été sélectionnées pour leur grande permissivité au HCV [Wakita et al., 2005]. Ce réplicon ne nécessite pas de modifications adaptatives pour se répliquer et peut donc produire des particules infectieuses appelées HCVcc (cc étant utilisé pour cell culture). Malgré ces nombreuses implications dans l'étude du HCV (entrée cellulaire, réplication et assemblage), l'utilisation de ce système reste très réglementé et est restreint à un seul génotype.

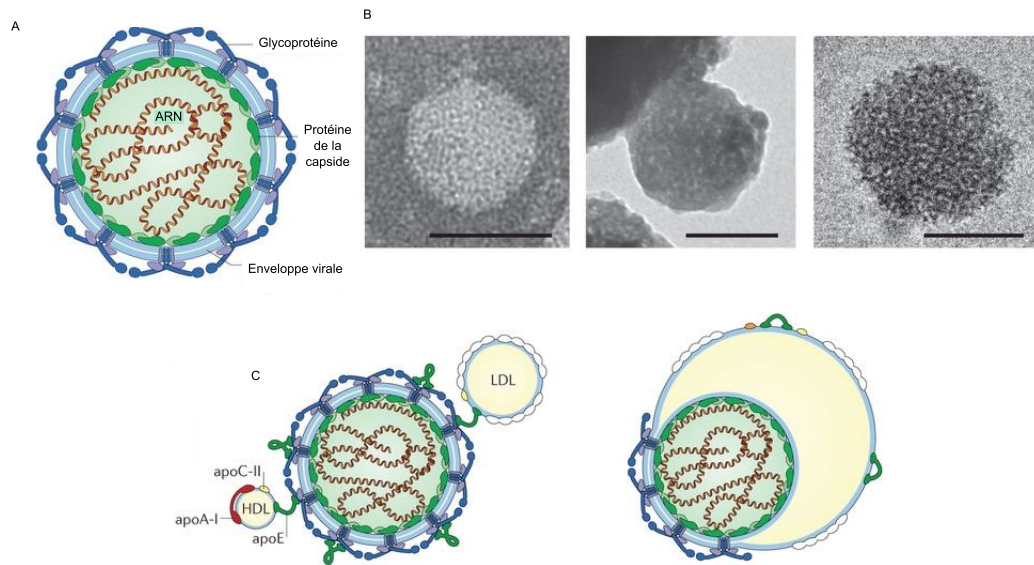


FIGURE 2.15.: **Virolipoparticules du HCV**

(A) schématisation d'une particule virale du HCV. (B) Clichés de microscopie électronique présentant la particule virale dans 3 états : fixée par affinité sur une grille (gauche), liée à des billes magnétiques interagissant avec la glycoprotéine E2 (milieu) et en cryomicroscopie (droite). (C) modèle d'une particule HCV interagissant avec des lipoprotéines. [Lindenbach and Rice, 2013].

Chapitre 3

Physiopathologie

Afin de compléter l'étude du virus qui nous intéresse, ce chapitre présentera la physiopathologie ainsi que les thérapeutiques passées et en voie de développement.

3.1. Les hépatites Virales C

Le scénario clinique de la maladie commence par une incubation moyenne de 7 à 8 semaines (*cf.* Figure 3.1). Néanmoins, celle-ci peut être très variable suivant les individus et les caractéristiques de l'inoculum et peut s'étaler de 2 à 26 semaines. L'infection donne lieu à une hépatite aiguë qui est asymptomatique dans 80% des cas.

3.1.1. Hépatite C aiguë

Dans les cas d'hépatites aiguës symptomatiques, les symptômes ne sont pas réellement typiques et passent très souvent inaperçus, rendant **le diagnostic clinique et biologique difficile**. Les symptômes les plus décrits sont l'anorexie, la fatigue, les nausées, la fièvre et dans 25% des cas le patient peut déclarer une jaunisse. Ces symptômes sont présents de 2 à 12 semaines suivant les individus [Orland et al., 2001]. Les hépatites aiguës fulminantes sont très rares [Farci et al., 1996]. L'infection virale sera donc diagnostiquée essentiellement par la recherche de marqueurs biologiques dans le sang qui sont :

1. la présence d'ARN viral¹ détectable par PCR 1 à 3 semaines après la contamination [Farci et al., 1991];
2. une augmentation transitoire de 10 fois la normale des transaminases telles que l'alanine aminotransferase (ALAT) et l'aspartate aminotransferase (ASAT);
3. une apparition d'anticorps anti-HCV détectés² lors d'une sérologie dès 6 à 8 semaines après la contamination. Cette recherche est la plupart du temps réalisée par technique immunoenzymatique ELISA. Dans tous les cas, un premier résultat positif sera confirmé par un second prélèvement.

Après la phase aiguë, la maladie évolue vers une infection chronique ou, dans 20% des cas, peut évoluer vers une guérison totale. Dans ces circonstances les patients élimineront spontanément le virus, le plus souvent dans les trois mois suivant les signes cliniques [Corey et al., 2006, Micallef et al., 2006, Santantonio et al., 2006].

1. Virémie
2. Séroconversion

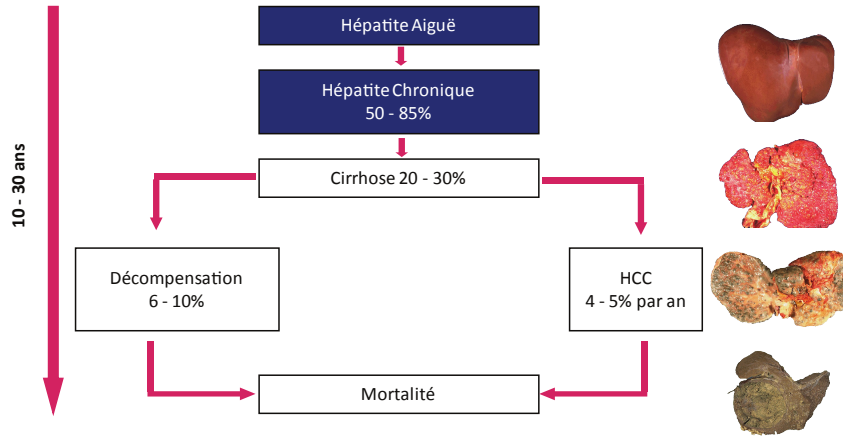


FIGURE 3.1.: Histoire naturelle de l'infection par le HCV.

3.1.2. La guérison spontanée

Selon les études, 10 à 40% des personnes ayant développé une hépatite aiguë guérissent de façon spontanée. Cette guérison se traduit par une chute du taux des transaminases, une virémie nulle et des anticorps anti-HCV encore présents mais en nette diminution. Cependant, il n'est pas encore clairement établi si la guérison du sujet est totale ou si l'infection persiste malgré une absence d'ARN du HCV dans le sérum. Néanmoins, cette guérison spontanée ne protège pas l'individu contre une ré-exposition mais les chances d'une évolution vers une chronicité restent faibles [Mehta et al., 2002].

3.1.3. Hépatite C chronique

On parle de chronicité lorsque l'ARN du HCV est détectable dans le sérum pendant plus de 6 mois. Ainsi, 80% des personnes ayant eu une infection aiguë développent une infection chronique à développement lent. Les conséquences de la maladie sont une inflammation du tissu hépatique, puis une fibrose hépatique appelée cirrhose et dans certains cas évoluant vers un carcinome hépatocellulaire (HCC) ou à une insuffisance hépatique. L'issue de l'infection chronique varie selon l'hygiène de vie du patient : l'alcool, le tabac, la consommation de cannabis, l'âge ou bien une co-infection HIV peuvent être des facteurs aggravants [Vaquer et al., 1994]. Le diagnostic de l'infection chronique est réalisé par la recherche de marqueurs biologiques de l'infection aiguë et peut parfois être complété par une analyse histologique par ponction biopsie hépatique (PBH). Les personnes atteintes par le virus de l'hépatite C développeront une maladie du foie nommée fibrose qui évoluera dans le temps. 20% de ces malades développeront une cirrhose en 20 ans [Persico et al., 2000]. Parmi celles-ci, des personnes vont alors dans certains cas développer un cancer du foie ou HCC (Hepatocellular Carcinoma) qui sera mortel dans 33% des cas dans la première année.

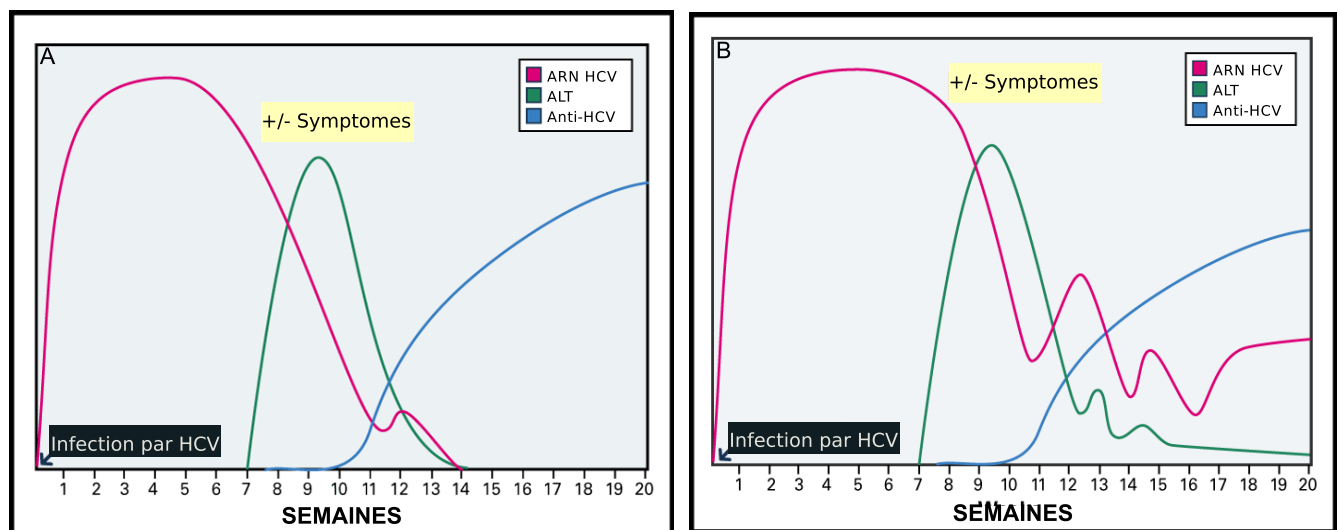


FIGURE 3.2.: Profils sérologiques d'une hépatite C aiguë suivie d'une phase évoluant vers la guérison (A) ou vers la chronicité (B).

3.2. La réponse immunitaire

Une infection virale entraîne chez une personne non immuno-déprimée une réponse non spécifique rapide dite innée suivie d'une réponse immunoadaptative spécifique de l'agent viral. Le but de cette réponse innée est d'identifier et de limiter la propagation de l'infection. Pour cela, les cellules de l'hôte infecté et les cellules effectrices de l'immunité (les cellules macrophagiques, les cellules *natural killer*, les cellules neutrophiles) déclenchent une réponse antivirale qui conduit à l'expression de facteurs de transcription et à la production de cytokines. Dans un second temps, les cellules présentatrices d'antigènes matures entraîneront l'activation d'une réponse spécifique humorale (production d'anticorps par les lymphocytes B différenciés) et une réponse cellulaire qui passe par l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et auxiliaires.

3.2.1. La réponse immunitaire innée (cf. Figure 3.3)

Pendant la phase précoce de l'infection, la charge virale augmente dès les premiers jours de l'infection et reste élevée pendant toute la période d'incubation. A ce stade, le virus va être reconnu comme un agent pathogène à motifs moléculaires associés (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) via les récepteurs cellulaires de reconnaissances de motif (*Pattern Recognition Receptor*, PRR) [Akira and Hemmi, 2003, Saito and Gale, 2007]. Les PRRs sont divisés en plusieurs catégories : les PRRs sécrétés, les PRRs membranaires, les PRRs vésiculaires (TLR-3, TLR-7/8, TLR 9) et les PRRs cytoplasmiques (les récepteurs à ARN double brin cytoplasmique-PKR). Dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux, trois grandes familles de PRRs jouent un rôle dans la réponse immunitaire innée : les TLRs (notamment les TLR3, TLR7, 8 et 9 qui sont localisés au niveau des endosomes de certains types cellulaires), les récepteurs de la famille des RIG like receptors (RLRs) avec RIG-I qui sont exprimés dans le cytoplasme.

3.2.1.1. Les récepteurs de type Toll

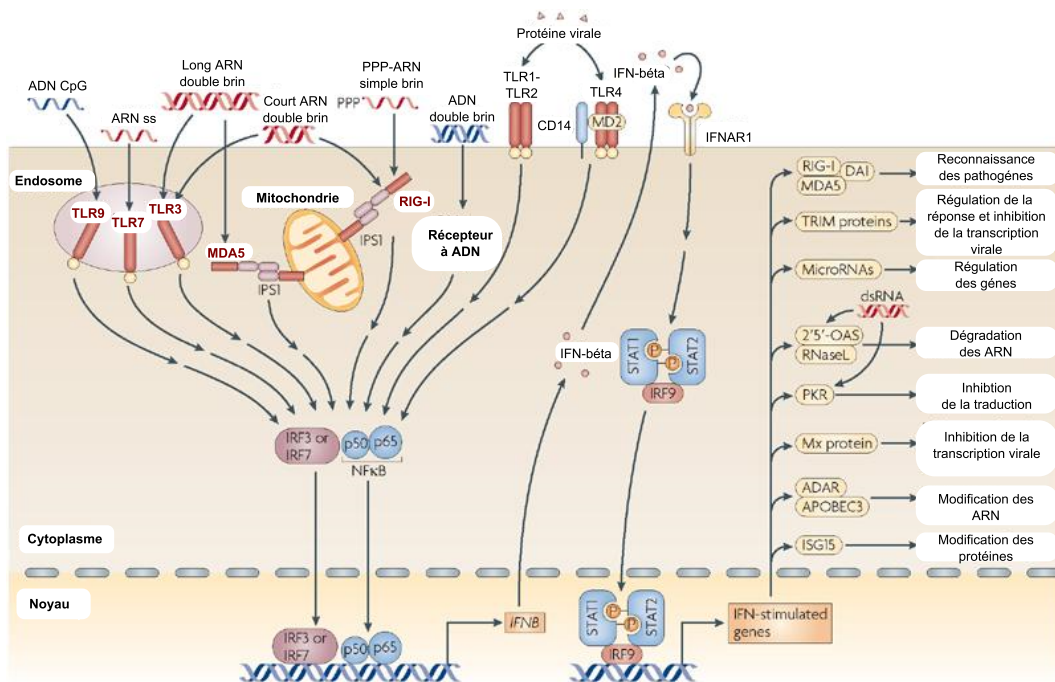
Les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor*, *TLR*) font partie de la famille des récepteurs de type interleukin-1. Il existe 11 TLR différents reconnaissant chacun un ligand spécifique. Lors d'une infection virale par HCV, les TLRs majoritairement recrutés sont les TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissant soit de l'ARN double brin (TLR3), de l'ARN simple brin (TLR7/8) ou de l'ADN (TLR9) [Imler and Hoffmann, 2000, Tsan, 2006]. L'ensemble des TLR possède une structure identique composée d'un domaine riche en leucine (*Leucine-rich repeat*, LRR) et d'un domaine Toll/IL-1R (TIR). Tous les TLRs à l'exception de TLR3 utilisent la même voie de signalisation passant par le recrutement de l'adaptateur MyD88 via le domaine TIR [Akira and Takeda, 2004, Tsan, 2006]. Celui-ci, grâce à la kinase IL-1R (IRAK), active TRAF6 qui permettra la stimulation de la voie de signalisation TAK1 entraînant la production de NF- κ B et de cytokines. En parallèle, d'autres voies d'activation faisant intervenir TRAF3 et IRF7 entraînent la production d'interféron de type I. Contrairement aux autres TLRs, TLR3 utilise l'adaptateur TRIF pour initier l'induction du facteur de transcription IRF3 entraînant la production de l'IFN-beta et la production de NF- κ B.

3.2.1.2. Les récepteurs de type RLRs

Les récepteurs de type RLRs sont intracellulaires et sont des *senseurs* de l'ARN viral. En effet, ceux-ci reconnaissent les ARN double brin mais aussi les ARN simple brin ayant une extrémité 5'PPP accessible du fait de l'absence de coiffe et les séquences 3'UUU ou 3'AAA [Maire et al., 2008a, Saito et al., 2008, Kato et al., 2008]. les RLHs sont communément décrits comme ayant un domaine hélicase permettant le déroulement des duplex d'acide nucléique, un domaine reconnaissance de l'ARN (RD ou CTD) et pour certains RLHs un domaine CARD interagissant avec les voies de signalisation. Ils sont composés de trois membres : RIG-I [Yoneyama et al., 2004], *melanome differentiation antigen 5* (MDA5) et *physiology-2* (5LGP2). La reconnaissance d'un des ligands viraux par RIG-I et MDA5

amène l'ubiquitination de ces deux récepteurs au niveau du domaine CARD, ce qui permettra le recrutement de leurs adaptateurs nommés selon les études MAVS/IPSI/CARDIF/VISA. Ce complexe permettra alors le recrutement de TRAF3 et STING qui permettra via TBK-1, la phosphorylation de IRF3 et IRF7 [Oganesyan et al., 2006] mais aussi le recrutement de TRAF6/TRAF3 qui mènera à l'activation de NF- κ B.

L'ensemble de ces récepteurs sont recrutés conduisant à l'activation des facteurs de transcription IRF : IRF3, IRF7 et NF- κ B qui à son tour, conduit à la synthèse d'IFN de type I dont IFN- β . La production d' IFN- β active alors la voie de signalisation JAK-STAT qui induit la synthèse de l'interféron- α et de dizaines d'autres IFN-stimulated genes (ISG).



Nature Reviews | Immunology

FIGURE 3.3.: Bilan des voies de détection, de signalisation des pathogènes viraux et activation de la réponse interféron classique.

La détection du pathogène viral par les récepteurs PRRs aboutit à l'activation des facteurs de transcription IRF-3, IRF7 et NF- κ B entraînant la synthèse de l'IFN de type I qui activera la réponse interféron. A titre d'exemple, les PKR s'auto-activent en kinase lorsqu'ils se lient à de l'ARN bicaténaire virale. Cette reconnaissance n'est pas dépendante de la séquence, mais demande un ARN de plus de 30 pb. Une fois activé, la PKR provoque la phosphorylation du facteur de traduction eIF2, inhibant par la même occasion la traduction de protéines virales et cellulaires [Nallagatla et al., 2007]. La PKR agit également de façon positive sur l'expression de certains gènes, notamment en soutenant l'induction du gène de l'IFN. Pour cela, la PKR n'utilise pas sa fonction kinase mais entre directement en contact, par sa partie N terminale, avec un complexe de kinases (IKK) conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Par ces deux mécanismes, la PKR participe donc de façon importante à l'action antivirale de l'IFN α/β : 1) en bloquant les synthèses protéiques dans la cellule infectée, et 2) en participant aux mécanismes d'induction de l'IFN via l'activation de NF- κ B, ce qui renforce la protection des autres cellules. [Bowie and Unterholzner, 2008]

3.2.1.3. Les cellules natural killer

Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la phase aiguë de l'infection virale HCV. Présentes dans le foie, ces cellules ne possèdent pas de TCR (récepteur des cellules T) mais peuvent reconnaître certaines modifications membranaires de la cellule infectée [Racanelli and Rehermann, 2006]. A leur surface, les cellules NK possèdent des récepteurs inhibiteurs de leur activité tels que KIR, CD94/NKG2A qui reconnaissent les molécules du complexe majeur histocompatibilité (CMH) de classe I et des récepteurs activateurs tels que CD16, CD94/NKG2D, TLR. Lors d'une infection virale, l'expression membranaire des molécules CMH diminue, entraînant par la même occasion l'activation des cellules NK. Celles-ci peuvent aussi être activées par l'interféron de type I et les IL-12 sécrétées par les cellules dendritiques. Une fois actives, ces cellules peuvent entraîner la lyse de cellules infectées par la production de granules cytotoxiques comme les perforines et les granzymes. De plus, celles-ci sécrètent de nombreuses cytokines (IL3, GM-CSF etc..) qui régulent les cellules dendritiques, ce qui est la base de la réponse adaptative. Néanmoins, même si ces cellules jouent un rôle clef dans la réponse innée, il a été démontré que le HCV peut inhiber la réponse des cellules NK via la fixation des particules virales au récepteur CD81 [Crotta et al., 2002].

3.2.1.4. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques jouent un rôle majeur dans la mise en place de la réponse adaptative. Ces cellules ont la capacité de présenter des peptides antigéniques associés aux molécules CMH de classe II qui sont les cellules T CD4+. Leur maturation est favorisée par l'IFN- α de type I, l'activation du récepteur TLR 3 et par les cytokines produites par les cellules NK. Lors d'une infection virale, la fonction des cellules dendritiques pourrait être compromise du fait de leur infection possible par le HCV mais aussi par la protéine d'enveloppe E2 [Bain et al., 2001]. Néanmoins, une inhibition des cellules lors d'une infection *in vivo* n'a pas été prouvée [Pachiadakis et al., 2005].

3.2.2. La réponse immunitaire adaptative (cf. Figure 3.4)

3.2.2.1. La réponse cellulaire

Lors de la réponse innée de nombreux facteurs comme les cytokines sont produits et circulent dans le sang. Ces molécules conduisent à la maturation des cellules dendritiques et à l'activation d'autres cellules présentatrices d'antigènes responsables de la réponse adaptative. Cette réponse fait intervenir les lymphocytes auxiliaires CD4+ (TCD4+), les lymphocytes T cytotoxiques (TCD8+ ou CTL) et les lymphocytes B.

3.2.2.1.a. La réponse CD4+

Pendant l'infection aiguë (environ 3 à 4 semaines après contamination), la réponse TCD4+ est détectable dans le sang et se restreint à la reconnaissance du système CMH de classe II. Deux types de réponses peuvent alors se mettre en place. La première réponse est de type Th1 entraînant la production des IL-2 et interféron- γ , deux cytokines capables d'activer les CTL, les cellules NK et les cellules macrophagiques. L'autre réponse est de type Th2 qui induit la réponse humorale qui est principalement médiée par la production d'IL-4, IL-6, IL-10 et IL-13 [Zinkernagel et al., 1993]. Cette réponse CD4+ joue un rôle important dans la réponse immunitaire et particulièrement au niveau de l'activation de la réponse CD8+. En effet, une réponse forte et soutenue de type Th1 serait liée à la clairance virale du fait de son implication dans l'activation de la voie cytolytique des CTL [Tsai et al., 1997, Pape et al., 1999]. A l'inverse, lors d'une persistance virale, la réponse CD4+ serait plus courte, transitoire et majoritairement de type Th2 évoluant vers une réponse de type Th1 lors du passage à la chronicité [Schulze Zur Wiesch et al., 2012]. Cette réponse plus faible et de type variable entraîne la persistance virale et, sur du long terme, des lésions hépatiques pouvant devenir pathologiques (ex. fibrose).

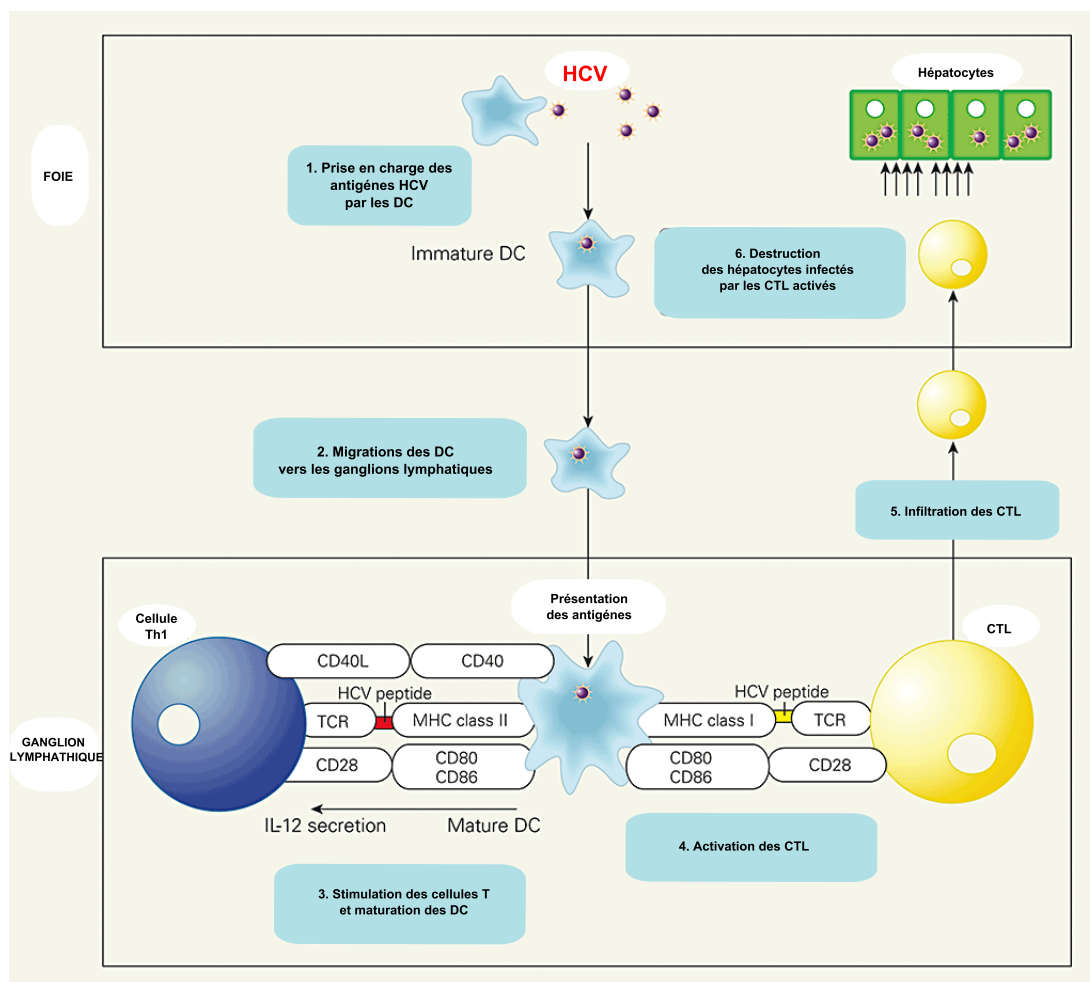


FIGURE 3.4.: Schématisation de la réponse adaptative spécifique du HCV.

Au niveau du foie, les cellules dendritiques prennent en charge de nombreux déterminants antigéniques du HCV puis migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques. Ceux-ci vont activer les cellules T auxiliaires et induire la maturation des cellules dendritiques qui sécrètent à leur tour, certaines cytokines notamment les IL-12 qui entraîneront la différenciation des cellules Th helper en Th1 ou Th2. L'ensemble de toutes les cytokines et des facteurs de transcription activeront la réponse humorale anti-HCV et les CTL qui migreront vers le foie afin de détruire les cellules infectées porteur des molécules CMH de classe I [Hiroishi et al., 2008].

3.2.2.1.b. La réponse CD8+

L'apparition de la réponse CD8+ est détectable dans le sang de 6 à 8 semaines après l'infection et se restreint à la reconnaissance du peptide HCV associé au système CMH de classe I. Cette réponse est associée à une cytolysse hépatique, la plupart du temps symptomatique et liée à une augmentation des transaminases mais aussi à une chute du titre viral [Bowen and Walker, 2005]. Ainsi la cytolysse est liée à la reconnaissance des peptides viraux présentés par les cellules infectées par HCV. Classiquement l'action cytolytique est médiée par la sécrétion d'enzymes comme les granzymes/perforines ou par l'activation de la voie apoptotique FAS [Berke, 1995]. L'autre voie dite non cytolytique est médiée par la sécrétion de cytokines comme interféron- γ et de facteur de transcription comme TNF- α .

3.2.2.2. La réponse humorale : les épitopes neutralisants (cf. Figure 3.5)

Lors d'une infection par HCV, l'organisme développe une réponse humorale spécifique par le biais des cellules lymphocytaires. Il a été démontré que l'émergence de la réponse humorale lors de la phase précoce de l'infection pourrait être un des facteurs de la clairance virale entraînant la guérison spontanée des personnes infectées. Ces réponses humorales précoces diminueraient progressivement jusqu'à disparaître au bout de quelques années. Dans le cas d'une hépatite chronique, la réponse immunitaire humorale serait beaucoup plus faible, voire même absente, lors de la primo infection et augmenterait de façon importante mais de manière décalée. Cette inaptitude à développer une réponse humorale précoce et efficace pourrait donc favoriser l'échappement viral et serait responsable des états chroniques et des conséquences physiopathologiques du HCV. Néanmoins, l'absence de modèle cellulaire répliquant des particules virales rend difficile l'étude de la réponse humorale. Cet échappement viral peut s'expliquer par la présence de régions particulières comme les régions hypervariables ou l'apparition de mutations ponctuelles et d'altérations des sites de glycosylation. Dans le but de comprendre l'échappement viral et ainsi d'établir une thérapeutique spécifique et efficace, de nombreux groupes de recherche ont travaillé sur l'identification des épitopes dits neutralisants. Les premiers travaux sur les épitopes neutralisants ont été réalisés sur le chimpanzé. Les travaux se sont focalisés sur la région HVR1 de la protéine E2 du fait de son importance dans l'entrée du HCV. Les plus connus pour leurs capacités neutralisantes sont le mAb 9/27 ainsi que l'anticorps monoclonal de souris AP213 [Bartosch et al., 2003a, Hsu et al., 2003]. Ceux-ci reconnaissent la région C-terminale et plus précisément les aa 396-407 de HVR1 en ce qui concerne le mAb 9/27. Néanmoins, d'autres anticorps monoclonaux comme 7/59, 6/16 et 6/82a reconnaissant les aa 384-391 localisés en N-terminale de HVR1 ont été décrits comme non neutralisants prouvant ainsi l'existence de deux régions immunogènes à l'intérieur de HVR1, comprenant la partie C-terminale contenant les déterminants de neutralisation et la partie N-terminal. Malgré son rôle important dans la réponse humorale, HVR1 aurait en plus la particularité de pouvoir protéger les déterminants d'entrée du virus [Bankwitz et al., 2010]. Ces rôles multiples et leur nature quelque peu contradictoire ont fait que cette région a été décrite par certains comme un **leurre immunologique** permettant la sélection d'anticorps d'échappement [Ray et al., 1999].

Outre HVR1, d'autres épitopes neutralisants à la fois linéaires et conformationnels ont été identifiés au niveau de la protéine E2 :

- ceux qui reconnaissent les épitopes linéaires principalement situés entre les résidus 412 et 423 de E2. Parmi tous les anticorps neutralisants ciblant cette région (H77.39 [Sabo et al., 2011], 95-2 [Broering et al., 2009], HCV-1 [Broering et al., 2009] et 3/11 [Flint et al., 1999]) l'anticorps AP33 possède une large capacité de neutralisation des HCVpp de génotype 1 à 6 [Owsianka et al., 2005, Tarr et al., 2006]. Sa particularité est de reconnaître une région immunogène très conservée. Le résidu W₄₂₀ de cette région interviendrait de plus dans la reconnaissance du récepteur CD81. Cependant, peu d'anticorps ciblant la région aa 412-423 ont été identifiés *in vivo* chez les personnes infectées chroniquement et chez les personnes ayant éliminé le virus de façon spontanée. Ces

résultats laissent penser que les anticorps ciblant cette région ne serait pas impliqués directement dans l'élimination spontanée du HCV [Tarr et al., 2007] ;

- ceux qui reconnaissent des épitopes conformationnels où les résidus de contact clés sont situés entre les résidus 424-443, 523-540 et les résidus 416 et 420. L'ensemble des anticorps ciblant cette région ont été décrit comme neutralisants les HCVpp (CHB-5 [Hadlock et al., 2000] HC-1 [Keck et al., 2004]) et les HCCc (HC-1), du fait de leur interaction avec les sites de fixation au récepteur CD81 de E2. Par ailleurs, d'autres anticorps comme les anticorps AR 1, 2 et 3 ont été identifiés comme ayant des propriétés neutralisantes contre les HCVpp. Ceux-ci permettraient aussi une protection partielle de la souris en cas d'infection par HCV. D'autres anticorps comme A8 , 1 :7 [Allander et al., 2000, Johansson et al., 2007], e137 [Mancini et al., 2009] et e20 [Perotti et al., 2008a] ont été étudiés du fait de leur capacité à reconnaître des acides aminés particuliers (W₅₃₉, G₅₃₀ et D₅₃₅). L'ensemble de ces études suggèrent que ces deux régions pourraient être utilisées pour l'élaboration d'un vaccin anti-HCV. Néanmoins, l'apparition de mutations dans ces régions sous la pression de la réponse immunitaire semble être une des raisons de l'échappement viral du HCV.

D'un point de vue générale, l'identification de ces régions d'intérêt fut difficile du fait des nombreux modèles de E2 existant. Néanmoins, des résidus particuliers du fait de leur grande conservation à travers les génotypes furent identifiés comme étant impliqués dans la fixation au récepteur CD81 : W₄₂₀, Y₅₂₇, W₅₂₉, G₅₃₀ et D₅₃₅ et le motif 440 GLFY 443 [Johansson et al., 2007, Law et al., 2008, Perotti et al., 2008b, Owsianka et al., 2008].

En ce qui concerne les épitopes neutralisants au niveau de E1, ceux-ci semblent être très rares du fait de la faible immunogénicité de E1. Néanmoins, certains anticorps neutralisants d'origine humaine ont été identifiés. C'est notamment le cas de l'anticorps H-111 qui reconnaît les acides aminés 192-202 de l'extrémité N-terminale de E1 et des l'anticorps IGH526 et IGH505 reconnaissant les épitopes 313-327 [Bankwitz et al., 2010, Tarr et al., 2006, Broering et al., 2009]. Cependant, cette neutralisation reste faible en ce qui concerne l'anticorps H-111 [Owsianka et al., 2005].

Parmi tous les anticorps neutralisants décrits, l'anticorps monoclonal D32.10 murin possède un épitope neutralisant dit discontinu se trouvant à la fois sur la protéine E1 et E2. Celui-ci reconnaît les acides aminés 297-306 de E1 et les deux motifs 480-494, 613-621 de la protéine E2 provenant de particules virales authentiques (HCVsp³) de génotypes 1a, 1b, 2a et 3a [Petit et al., 2003]. De plus, du fait de son interaction avec les HCVsp et de la reconnaissance des sites de fixation/interaction avec la cellule CD81 [Olenina et al., 2005], l'anticorps D32.10 est neutralisant contre l'infection par HCV [Petit et al., 2003, 2005, Ndongo et al., 2009, 2010, 2011]. Ces caractéristiques le rendent unique car il possède un épitope discontinu capable de reconnaître des particules virales authentiques et en même temps la capacité de reconnaître des régions immunogènes sur E1 et E2 différente de celle décrite précédemment .

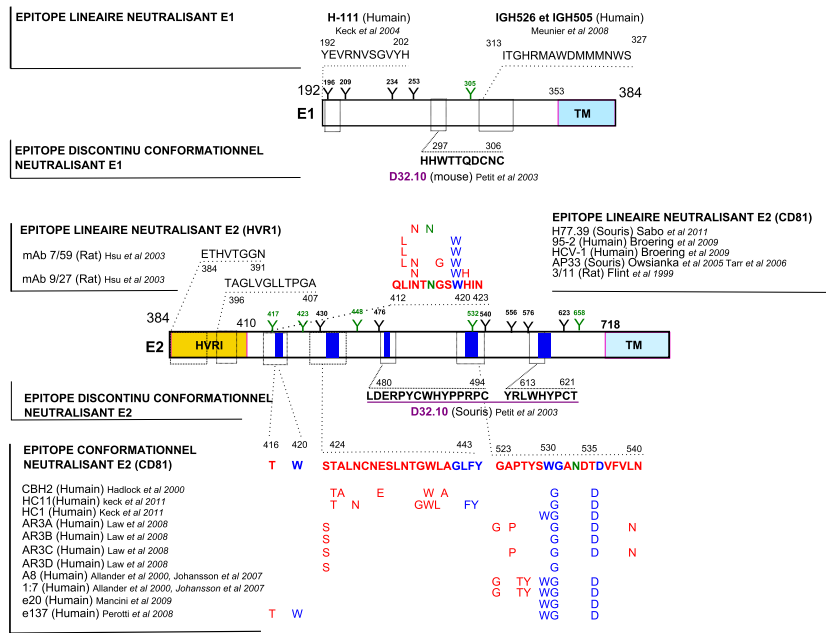


FIGURE 3.5.: Bilan des régions antigéniques de E1 et E2 et des épitopes des principaux anticorps anti-E2

Les glycoprotéines E1 et E2 sont représentées par des rectangles ayant en C-terminal leurs domaines transmembranaire identifiés par TM. Les positions des acides aminés ont été inscrites au niveau de chaque domaine, N et C-terminal. Les anticorps sont classés suivant les épitopes linéaires et conformationnels. Les fourches indiquent les glycosylations présentes sur E1 et E2. Les acides aminés en vert au dessus des fourches représentent les sites de glycosylation qui peuvent affecter la neutralisation. De plus, les acides aminés indiqués en bleu représentent les acides aminés impliqués dans la fixation au récepteur CD81.

3.3. Traitements

Dans cette partie, seul les anti-viraux les plus connus seront exposés.

3.3.1. Interféron (IFN) et Ribavirine (RBV)

Actuellement, le traitement le plus utilisé contre le HCV est une combinaison d'interféron alpha et de ribavirine. Sa prescription aux malades ayant des ARN viraux détectables et des signes d'atteinte hépatique évidents (score de fibrose mesuré par l'index METAVIR) peut se faire à n'importe quel stade de la maladie. Néanmoins sa durée de prescription est variable suivant l'infectiosité et le génotype du HCV. L'efficacité de cette thérapeutique est limitée et le mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé. Il semblerait que ces deux molécules fassent intervenir à la fois des mécanismes immunomodulateurs et antiviraux.

3.3.2. Nouvelles thérapeutiques

Du fait des faiblesses des thérapeutiques actuelles et des effets indésirables de l'IFN, de nouvelles voies de recherche se sont développées. Les principales orientations données à la thérapeutique du HCV sont de développer de nouvelles molécules visant la protéase NS3-4A, NS5A et l'ARN polymérase NS5B (cf. Figure 3.6).

3.3.2.1. Les anti-protéase NS3-4A

Ces molécules sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique NS3/4A et sont décrites comme étant des NS3/4A peptidomimétiques (NS3/4A Pis). Elles sont divisées en deux catégories. La première catégorie regroupe deux familles :

- les linéaires Pis dont les plus connus sont le Telaprevir® (Janssen/Vertex) et le Brocprevir® (Merck) qui ont été homologués pour le traitement contre le HCV ;
- les nouveaux tri-peptides, le Faldaprevir ou BI201335 (Boehringer) et l'Asunaprevir qui sont actuellement en phase III⁴.

Dans l'autre catégorie, se retrouve les macrocycliques Pis qui incluent le Simeprevir ou TMC435350 (Janssen/Medivir) et le Danoprevir ou RG7227 (interMune/Roche), qui sont tous deux en phase III des essais cliniques. Les dernières études ont démontré que le Telaprevir, administré en combinaison à la bithérapie pégylée chez les patients non-répondeurs infectés par le virus de génotype 1, augmente significativement les taux de guérison. Cette trithérapie n'est pas utilisée systématiquement en première intention du fait de son protocole difficile et de sa forte variabilité selon les personnes. Elle est généralement prescrite aux personnes ayant un génotype 1.

3.3.2.2. Les anti NS5A

Du fait de la méconnaissance de son rôle précis dans le cycle viral, le développement de médicaments anti-HCV ayant pour cible NS5A est limité. Néanmoins, il a été démontré que le Daclatasvir (BMS-790052) aurait un impact sur la réplication mais aussi l'assemblage de nouveaux virions. Les mécanismes ne sont pas encore clairement connus mais il semblerait qu'il perturberait la phosphorylation de NS5A.

3.3.2.3. Les anti NS5B

L'ARN polymérase étant une des protéines clefs lors de la réplication virale, elle fut une des cibles préférentielles dans le développement de nouveaux anti-viraux. Cette gamme d'antiviraux est divisée

4. Phase des essais cliniques permettant la comparaison du traitement à un placebo ou à un traitement de référence

en deux types de produits : les inhibiteurs nucléosidiques (NIs) qui agissent directement sur le site actif de l'enzyme quelque soit le génotype, et les inhibiteurs non nucléosidique (NNIs). La molécule NI la plus connue est le Sofosbuvir (GS-7977) développée par Gilead et qui est actuellement en phase III. Concernant les NNI, le Deleobuvir développé par Boehringer Ingelheim est actuellement aussi en phase III.

3.3.2.4. Autres cibles

D'autres cibles comme le récepteur d'entrée de l'ARN viral avec l'utilisation des agents Anti-mir122 et les inhibiteurs de la cycloohilin A (CypA) ont été étudiées. Néanmoins, toutes ces molécules ne sont que pour la majorité d'entre eux en phase II⁵ des essais cliniques.

De nos jours seuls le Brocprevir et le Telaprevir sont commercialisés mais de nombreuses autres molécules sont en attente d'approbation clinique. Ces nouvelles substances laissent penser que le traitement du virus sera possible dans le futur. Néanmoins, les premiers retours sur les trithérapies montrent que même si la proportion de personnes en voie de guérison est plus importante que lors du traitement par bithérapie, il existe encore des personnes non répondeurs. Cette limite peut s'expliquer par l'apparition de mutation des zones cibles de la thérapeutic mise en œuvre.

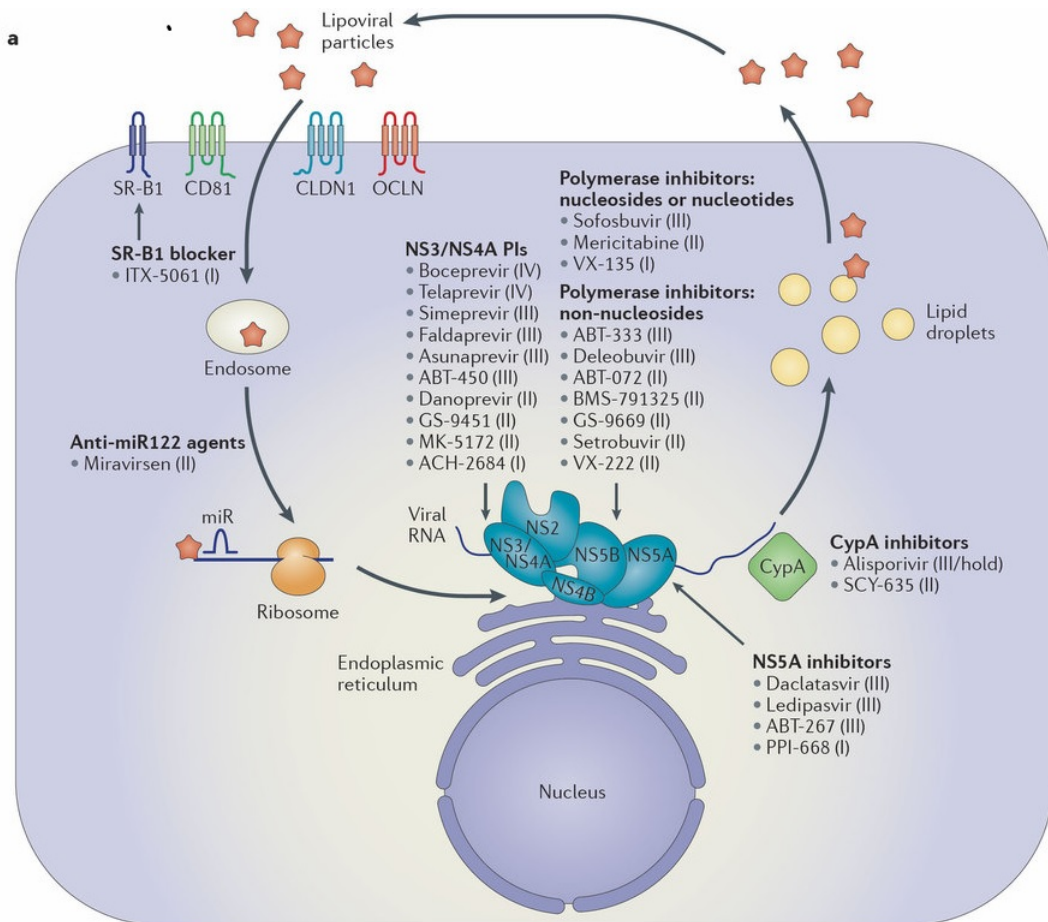


FIGURE 3.6.: Liste des molécules anti-HCV en cours de développement, leurs cibles et leurs avancées dans les phases cliniques (I, II, III, IV) [Manns and von Hahn, 2013].

5. Étude pilote qui consiste à déterminer la dose optimale du médicament et ses éventuels effets indésirables

Chapitre 4

Objectifs

4.1. Partie I : production d'une sonde immunologique : le scFv anti-HCV E1E2 D32.10

La découverte d'anticorps neutralisant large spectre (bNabs *broadly neutralizing antibodies*) a été une avancée majeure pour mieux comprendre le contrôle naturel d'infections chroniques telles que celle du VIH ainsi que l'élaboration d'une nouvelle génération de vaccins [Klein et al., 2013]. Néanmoins en ce qui concerne le virus de l'hépatite C, les avancées dans ce domaine restent minimes malgré la description de nombreux épitopes neutralisant. En effet, les caractères hypervariables des régions immunogènes (HVR1 HVR2) et l'utilisation des modèles chimériques viraux comme HCVcc et HCVpp rendent difficile l'application des avancées *in vitro* vers les conditions *in vivo*. Néanmoins, les progrès récemment réalisés pour exprimer aisément les régions CDRs des anticorps monoclonaux hypervariables par exemple via les « single chain fragment variable » scFV [Weisser and Hall, 2009] ainsi que le développement de techniques de clonage de lymphocytes (single B cells) capables de reconnaître des épitopes conservés chez les souches virales [Scheid et al., 2009] ont permis le développement de nouvelles sondes immunologiques. Etant donné les performances de l'anticorps anti-HCV E1E2 D32.10 à reconnaître des particules virales authentiques (HCVsp) et la nature unique de son épitope (reconnaissance des sites de fixation au CD81, discontinu) (*cf.* Figure 3.5), celui-ci possède tous les avantages pour être un candidat à un développement d'un scFv [Petit et al., 2003, 2005, Ndongo et al., 2009, 2010, 2011].

Par définition, un *Single Chain Fragment Variable* (scFv), aussi appelé mini-anticorps, est une protéine totalement chimérique ayant les mêmes propriétés que l'anticorps de référence correspondant. Ces molécules sont généralement composées de deux domaines immunoglobulines possédant les CDR des régions variables des chaînes lourdes et légères reliées par un linker. Ces molécules sont de nos jours en fort développement car n'ayant plus de partie constante (Fc), elles sont alors beaucoup moins immunogènes que les anticorps monoclonaux. De plus, elles gardent une affinité satisfaisante contre les épitopes cibles. Leur petite taille (environ 30 kda) leur permet de plus d'atteindre des cibles qui peuvent être totalement inaccessibles pour un anticorps monoclonal (environ 5 fois plus grand). Par ailleurs, les scFv peuvent être utilisés comme sonde immunologique car il est possible de leurs fixer de nombreuses étiquettes (par exemple MBP ou his-tag). Pour toutes ces raisons, au cours de ce travail, nous avons fait le choix de développer le scFv de l'anticorps de référence D32.10 anti-HCV E1E2.

Dans le but de développer une sonde immunologique performante et efficace, nous avons fait le choix de confronter plusieurs techniques de production, à savoir le flash refolding, la production en cell-free et la production en baculovirus. Ces points seront présentés et discutés.

4.2. Partie II : avons-nous découvert tous les modes de transmission du HCV ?

Comme nous l'avons abordé dans les chapitres précédents, la transmission du virus de l'hépatite C (HCV) se fait essentiellement par contact avec du sang contaminé. De nombreux moyens de prévention et thérapeutiques ont été mis en place pour bloquer la dispersion épidémique¹ de ce virus à travers le monde. Malgré cette prise de conscience il y a 20 ans avec le contrôle du HCV dans les produits sanguins et il y a 10 ans avec le développement de nouvelles thérapeutiques, le HCV est toujours présent, à l'état épidémique aux Etats unis [Ward, 2013]. Il a été démontré que certains génotypes prédomineraient au niveau de certaines régions, démontrant ainsi une endémicité du virus. C'est notamment le cas au niveau de l'Afrique centrale et de la péninsule asiatique où les génotypes 1, 4 et 6 sont respectivement retrouvés [Mellor et al., 1995]. Ces niches écologiques suggèrent ainsi une origine ancienne du virus et par le même occasion soulèvent la question de la persistance et de la transmission de celui-ci bien avant l'arrivée de la médecine moderne. De plus, comme il a été évoqué dans les chapitres précédents, l'origine de l'infection au HCV reste encore méconnue dans au moins 20% à 40% des cas, soit chez 17 millions de personnes infectées par ce virus, soulevant par le même occasion la question suivante :

Connaissons-nous ou maîtrisons-nous tous les modes de transmission du virus de l'hépatite C ?

Vues ces informations, certains auteurs ont commencé à suggérer d'autres moyens de transmission du HCV, notamment la possibilité de transmission par les arthropodes. Cette hypothèse requiert évidemment que certains arthropodes puissent être compétents pour le HCV, nécessitant d'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. L'équipe du professeur Oliver Pybus fut une des premières équipes à rechercher le lien entre 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) [Pybus et al., 2001]. Elle a démontré par des études épidémiologiques, qu'il existait une co-localisation des souches endémiques² du HCV et des zones de distribution de certains vecteurs. Ces recherches soutiennent fortement l'hypothèse d'une transmission du HCV par des vecteurs *Aedes aegypti* et/ou *Culex pipiens quinquefasciatus* et ou *Aedes albopictus*. Cependant, la relation virus-vecteur semble être complètement exclue entre le HCV et le moustique *Ixodes sp.*, suggérant ainsi que cette possible transmission serait dépendante de l'espèce. Il convient aussi de souligner les recherches du Docteur Raphelle Germi qui en 2001 démontra que le HCV pouvait se fixer sur les cellules AP61 (cellules de larves de moustique *Aedes pseudoscutellaris*) [Germi et al., 2001], ainsi que le travail du docteur Yassine Rechoum (thèse EDISCE UJF 2009) qui lors de sa thèse avait détecté le génome du HCV par RT-PCR chez *Ae. vexans* à partir de 21 jours post-infection (*cf.* Figure 4.1) et avait révélé par séquençage des mutations au niveau de la séquence amino-acide (gène NS5B). D'après ces recherches, le génome viral semble persister et se répliquer chez les espèces *Ae. vexans*, *Ae. pseudoscutellaris* et serait aussi décelable par RT-PCR.

L'objectif global de la deuxième partie de mon travail de thèse visait à d'étudier la possibilité de répllication du HCV chez le moustique et plus particulièrement chez *Aedes vexans*, *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*. Ces deux dernières espèces sont en effet les vecteurs de nombreuses arboviroses. De plus, les trois espèces sélectionnées sont les acteurs potentiels d'une transmission atypique du HCV [Pybus et al., 2007]. Afin de comprendre et de visualiser l'interaction qui pourrait exister entre HCV et les moustiques, nous avons fait le choix de travailler à l'échelle cellulaire, plus précisément sur des lignées cellulaires établies et des cellules primaires de moustiques.

Mon travail de thèse pour cette première partie se divise donc essentiellement en deux axes :

- Le premier axe était un travail de biologie cellulaire.

1. large distribution et éventuellement haute prévalence

2. Souche dont l'aire de répartition est limitée à une région donnée et ayant une forte hétérogénéité génétique

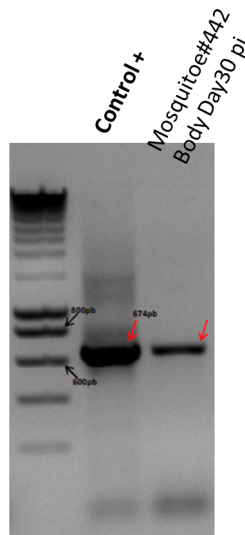


FIGURE 4.1.: **Détection de l'ARN du HCV chez *Aedes vexans* trente jours après infection (Résultat du Dr Yassine Rechoum)**

1. Dans un premier temps, devant l'absence de lignée cellulaire concernant l'espèce *Aedes vexans*, nous avons dû développer notre propre matériel cellulaire. Le premier but de cet axe était de mettre au point le protocole de mise en culture de cellules primaires à partir de larves de moustiques puis, dans une optique à plus long terme, d'établir des lignées cellulaires immortelles à partir de cette espèce. Afin d'établir ce protocole de mise en culture, nous avons pris en référence les premiers travaux réalisés par Singh sur *Aedes aegypti* et le travail du Docteur Florence Fouque sur *Aedes aegypti*. Pour les autres espèces, nous travaillerons avec des lignées commerciales déjà établies, à savoir C6/36 et AAG2.
 2. Ensuite, dans le but d'infecter les cellules d'insectes par HCV, nous avons dû développer un protocole d'infection cellulaire adapté aux cellules d'insectes. Afin de réaliser cela, nous avons pris en référence le protocole d'infection d'une des seules lignées cellulaires primaires hépatocytaires permissive au HCV [Ndongo-Thiam et al., 2011]. L'essentiel de ce travail fut d'adapter le protocole d'infection par HCV au laboratoire P3 de l'IBP (CHU de Grenoble) et de vérifier qu'il était effectivement opérationnel dans ces conditions, afin de reproduire le protocole sur les lignées cellulaires d'insectes.
- Le deuxième axe était principalement un travail de biologie moléculaire et d'immunodétection.
1. Afin de prouver que les cellules d'insectes étaient permissives au HCV, nous avons fait le choix de rechercher l'ARN (+) intracellulaire lors d'une cinétique d'infection. Pour cela nous avons dû mettre au point un protocole de transcription inverse et d'amplification spécifique du génome entier du HCV. Tout cela a été réalisé dans le but de détecter les mutations occasionnées par le complexe de réplication du fait de l'absence d'une activité correctrice de celui-ci.
 2. Le deuxième point de cette axe était de visualiser le virus en utilisant des outils immunologiques. Pour cela, nous avons utilisé les capacités d'un anticorps monoclonal IgG D32.10 pour reconnaître un épitope discontinu conformationnel des particules virales.

Toutes ces techniques ont été développées dans le but final de suivre l'évolution du génome par des sondes biomoléculaires et de visualiser le virus par des sondes immunologiques à partir de cultures cellulaires commerciales et établies en laboratoire infectés par HCV .

Deuxième partie .

Le ScFv anti-HCV E1E2 D32.10

Chapitre 5

Production du scFv D32.10 et caractérisation structurale et fonctionnelle

Dans un premier temps, le scFv D32.10 sera réalisé via l'étude des séquences de l'immunoglobuline D32.10. Puis, différentes techniques d'expression (*flash refolding*, *cell-free*, baculovirus) ont été utilisées afin de produire le scFv D32.10 en condition soluble et fonctionnelle. Dans ce chapitre chaque technique sera décrite ainsi que ces résultats.

5.1. Construction du scFv D32.10 et production par *flash refolding*

5.1.1. Préambule

Les anticorps sont des glycoprotéines présentes dans les tissus y compris les tissus sanguin et lymphatique. Elles sont classées en isotypes tels que les IgG, les IgM, IgA, IgE, IgD (*cf* Figure 5.1(A)). Chacun d'entre eux est produit à différentes étapes de l'infection et possède des structures différentes suivant leurs isotypes. L'anticorps D32.10 est une **IgG monoclonal murine d'isotype IgG1, κ** . Celui-ci a été obtenu par immunisation de souris avec des particules virales provenant de sérum d'un patient chroniquement infecté [Petit et al., 2003]. Cet anticorps, comme tous les IgG, est composé de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères (*cf* Figure 5.1(B)). Toutes ces chaînes possèdent une partie constante très conservée et une partie variable qui confère sa spécificité à l'immunoglobuline. D'un point de vue structural, une chaîne lourde est composée de quatre domaines *immunoglobulines* et une chaîne légère de deux domaines *immunoglobulines*. Chaque partie variable contient des régions responsables de la reconnaissance des épitopes appelés *complementary determining regions* (CDR). Plusieurs produits dérivés peuvent être synthétisés à partir d'une immunoglobuline, comme par exemple un Fab, un Fab', des anticorps chimériques humanisés si l'anticorps est d'origine animale (souris) ou bien un **scFv** (*cf* Figure 5.1(C)).

5.1.2. Développement du scFv D32.10

Un scFv est composé d'une seule valence antigénique contrairement aux immunoglobulines qui en possèdent deux. Il possède trois CDR sur la chaîne lourde et trois sur la chaîne légère, tous deux reliés par un *linker*. Le scFv étant une construction *non naturelle*, il existe plusieurs façons de le concevoir. La plus courante est de lier la chaîne lourde (VH) à une chaîne légère (VL) par un *linker*, généralement composé d'un motif répétitif composé d'une sérine et de trois glycines et d'ajouter une étiquette polyhistidine afin de faciliter sa purification. Ce motif peut être répété à volonté suivant la flexibilité à apporter à la construction. Pour le scFv D32.10, ce motif a été répété 3 fois et la construction a été exprimée chez *E.coli* (B121 gold). Du point de vue structural, le scFv relie deux domaines immunoglobulines ayant un pont disulfure intra-chaîne. Généralement, les scFv sont de petite taille et largement exprimés en bactérie. La taille du scFv D32.10 a été estimée à 28 kDa sur gel et à 29.6 kDa via l'étude de sa séquence. Les tests d'expression ont montré que le scFv D32.10 était retrouvé dans les corps d'inclusion et ce, malgré l'essai de nombreuses conditions d'expression.

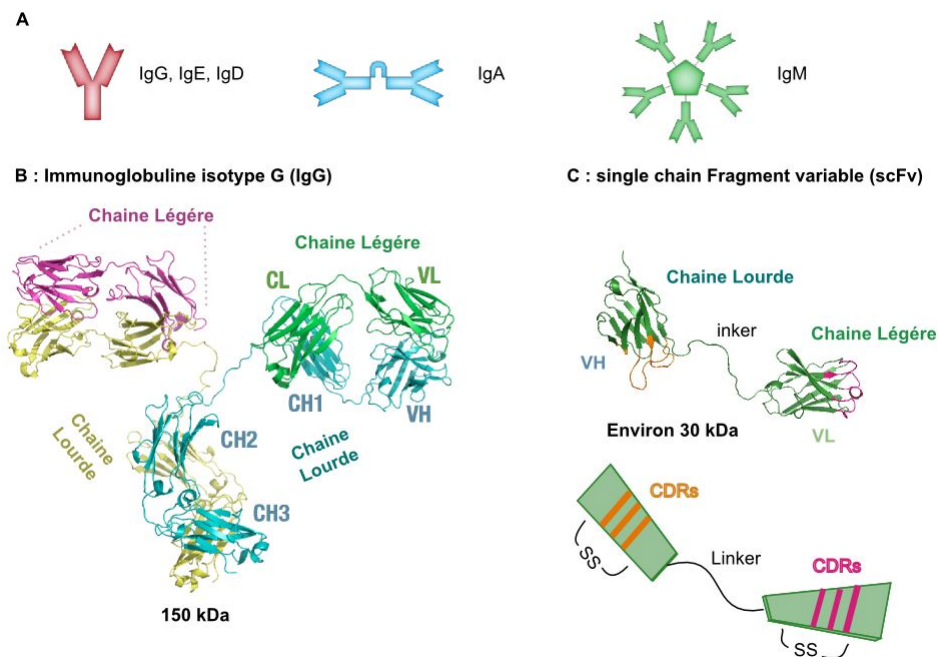


FIGURE 5.1.: **Bilan structural d'un anticorps et d'un scFv**

(A) Schématisation des différentes structures d'une immunoglobuline suivant son isotype. (B) **Modèle d'une l'immunoglobuline.** Les deux chaînes légères sont représentées en rose et vert et les chaînes lourdes en jaune et bleu. Le domaine immunoglobuline représentant la région variable de la chaîne légère est indiqué par VL, VH pour la chaîne lourde. CL et CH1 à CH3 indiquent le partie constante des chaînes lourdes et légères. (C) **Modèle d'un scFv.** les deux domaines VH et VL sont reliés par un linker (PyMOL). Les CDR de chaque chaîne sont indiqués en orange et rose. En dessous, le scFv est schématisé en illustrant les CDR présents sur chaque domaine ainsi que la présence des ponts disulfures.



Structural and functional characterization of the single-chain Fv fragment from a unique HCV E1E2-specific monoclonal antibody



Catherine Fallecker^{a,b,c}, Nicolas Tarbouriech^{a,b,c}, Mohammed Habib^{a,b,c}, Marie-Anne Petit^{d,e,*}, Emmanuel Drouet^{a,b,c,*}

^aUniv. Grenoble Alpes, Unit for Virus Host-Cell Interactions, F-38000 Grenoble, France

^bCNRS, Unit for Virus Host-Cell Interactions, F-38000 Grenoble, France

^cUnit for Virus Host-Cell Interactions, Univ. Grenoble Alpes-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble, France

^dCentre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) INSERM U1052/CNRS UMR5286, 68424 Lyon Cedex 03, France

^eUniversité Claude Bernard Lyon 1, 69008 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2013

Revised 12 July 2013

Accepted 19 July 2013

Available online 7 September 2013

Edited by Hans-Dieter Klenk

Keywords:

Hepatitis C virus

E1E2

Antibody engineering

Single chain Fv fragment

Anti-HCV therapy

ABSTRACT

The nucleotide sequence of the unique neutralizing monoclonal antibody D32.10 raised against a conserved conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived hepatitis C virus (HCV) envelope was determined. Subsequently, the recombinant single-chain Fv fragment (scFv) was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and its molecular characterization was assessed using multi-angle laser light scattering. The scFv mimicked the antibody in binding to the native serum-derived HCV particles from patients, as well as to envelope E1E2 complexes and E1, E2 glycoproteins carrying the viral epitope. The scFv D32.10 competed with the parental IgG for binding to antigen, and therefore could be a promising candidate for therapeutics and diagnostics.

© 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infects an estimated 2–3% of the world population and is a major cause of chronic liver disease. The majority (80%) of infected individuals progress to chronic hepatitis that

increases their risk for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. The standard of care (SOC) therapy for chronic infection uses a combination of pegylated interferon- α (PEG-IFN) and ribavirin (RBV), which is effective in only 50% of treated patients infected and has many side effects. Two new direct-acting antivirals (DAAs) targeting the virus protease NS3 have recently been approved for triple therapy with PEG-IFN and RBV to improve success rates and to shorten treatment [2]. This approach to treatment still suffers a number of drawbacks: regimen restricted to patients with genotype 1, and increased rate of adverse effects. There is therefore a pressing need to develop alternative anti-HCV therapies, particularly in the arena of prophylactic or therapeutic vaccines. The observation that some HCV-infected individuals (20%) can resolve spontaneously infection with virus-specific immune responses [3] has spurred interest in the potential of HCV vaccines, but as yet no such vaccine exists. Progress toward this goal has been hampered by a number of factors, in particular the extreme genetic diversity of HCV (six major genotypes and more than 50 subtypes) [4]. Therefore, identification of protective conserved immune epitopes of the virus is essential for understanding the role of neutralizing responses in disease pathogenesis, and for developing

Abbreviations: CDR, complementarity-determining region; DAAs, direct-acting antivirals; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FR, framework region; GT, genotype; HCV, hepatitis C virus; HCVsp, serum-derived HCV particles; HRP, horseradish peroxidase; IgG, immunoglobulin G; IMAC, immobilized metal affinity chromatography; IPTG, isopropylthio- β -galactoside; LB medium, Leibovitz medium; mAb, monoclonal antibody; MALLS, multi-angle laser light scattering; NDSB, 3-(1-pyridino)-1-propanesulfonates; NR, non-reducing; PCR, polymerase chain reaction; PEG-IFN, pegylated interferon- α ; PVDF, polyvinylidene difluoride; RBV, ribavirin; R, reducing; scFv, single chain antibody fragment; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; SOC, standard of care; TBS, Tris buffer saline; V_H, heavy chain variable region; V_L, light chain variable region

* Corresponding authors. Address: CRCL INSERM Unit 1052, 151, Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France. Fax: +33 (0)472 681 971 (M.-A. Petit). Address: Unit for Virus Host Cell Interactions UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, B.P. 181, 38042 Grenoble Cedex 9, France. Fax: +33 (0)4 76 20 94 00 (E. Drouet).

E-mail addresses: marie-anne.petit@inserm.fr (M.-A. Petit), drouet@embl.fr, emmanuel.drouet@ujf-grenoble.fr (E. Drouet).

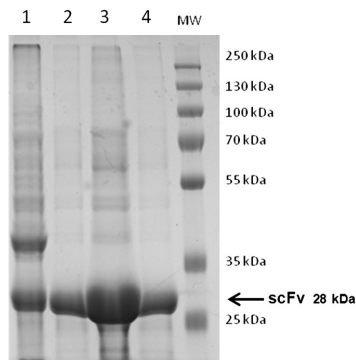


Fig. 1. scFv D32.10 purification (using a Ni²⁺-charged column). Control of the purified His-tagged scFv D32.10 by 10% SDS-PAGE after Coomassie staining. Lane 1, crude cell extract; Lanes 2, 3 and 4, eluates with 300 mM imidazole. MW, Molecular Weight markers in kilodaltons (kDa).

L-arginine, 100 mM NDSB (3-(1-pyridino)-1-propanesulfonates), 2 mM reduced glutathione, 1 mM oxidized glutathione) for 30 min. A FLPC (Biologic DuoFlow system, Biorad) was performed using a commercially packed high resolution 10/30 Superdex 75 column equilibrated with 100 mM Tris at pH 9 and 500 mM NaCl.

2.5. Antigen-binding and competitive binding of scFv

Two different HCV RNA-positive enriched pellet preparations or HCVsp (HCV-Fan, genotype 1a/2a; HCV-Lat, genotype 3) prepared as previously described from two different HCV chronically-infected patients [6,7] were used as antigenic probes in dot blot and western blot experiments for testing the scFv D32.10 recognition to natural complete HCV particles, to E1E2 envelope complexes and to E1 and E2 proteins. For dot blot assay, the HCV preparations (HCVsp-Fan and HCVsp-Lat, 5 µg of protein) were spotted onto nitrocellulose paper. The immunoblotting was performed by incubation overnight at 4 °C with either 5 µg/ml of mouse IgGs D32.10 or 10 µg/ml of scFv D32.10 as the primary antibodies. Mouse IgGs or scFv bound were detected by incubation for 1 h with peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins (diluted 1/10 000) or anti-His-tag (diluted 1/5000) as the secondary antibodies (Sigma–Aldrich). For competitive binding experiments, a mixture of a constant amount of IgG D32.10 (5 µg/ml) and increasing amounts of scFv D32.10 (10, 20 or 50 µg/ml) diluted in PBS, supplemented with 0.02% BSA and 0.05% Tween 20, were added for 1 h of incubation. Conversely, a mixture of a constant amount of scFv D32.10 (10 µg/ml) and increasing amounts of IgG D32.10 (5, 10, 20, 50 µg/ml) diluted in the same conditions were added for 1 h of incubation. Spots were then visualized by chemiluminescence detection using SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer solution (Thermo Scientific). Densitometric

measurement was performed by using ImageJ 1.43u software (National Institute of Health, USA).

For western blotting assay, the preparations (HCVsp-Fan and HCVsp-Lat, 5 µg of protein) were subjected to SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions (2% SDS ± 5% 2-ME). After transfer, the mouse IgGs D32.10 (10 µg/ml) or scFv (20 µg/ml) diluted in TBS-Tween-5% milk were added as primary antibodies. The revelation phase was performed using peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-His-tag antibodies.

To assess the specificity of the antibody staining (IgG and scFv D32.10), normal human serum (NHS) was used as control probe in both dot and western blot experiments. His-tag protein was used as positive control for revelation using anti-His tag antibodies.

2.6. Biophysics characterization and structure determination

Online MALLS detection was performed with a DAWN-HELEOS II detector (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, United States). Data were analyzed, and weight-averaged molecular masses (M_w) were calculated using the ASTRA software (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, United States). The S75 Superdex column (GE Healthcare) was equilibrated with 100 mM Tris at pH 9 containing 500 mM NaCl.

3. Results

3.1. Production, purification and structure of the scFv D32.10

The nucleotide sequence obtained from the rearranged V region genes of D32.10 is shown in Fig. S1 (Supplementary data) and was deposited at EMBL (European Bioinformatics Institute, United Kingdom) with WEBIN ID number Hx2000032426. The scFv was constructed by introducing the 15-residue linker, (Gly₄Ser)₃, connecting the C-terminus of V_H to the N-terminus of V_L (Fig. 2). The recombinant protein contains a hexahistidine tail to facilitate purification and identification. An induction of 4 h at 37 °C with 1 mM IPTG was performed. The final crude bacterial extract (Fig. 1, lane 1) was subjected to purification by denaturing IMAC chromatography, and SDS-PAGE analysis of fractions showed that elution of the protein was obtained at 300 mM imidazole in quite pure form (Fig. 1, lanes 2, 3 and 4). The yield of recombinant scFv was 10 mg/L of culture medium corresponding to the scFv present in the starting material. Although the molecular weight (MW) was estimated from the sequence to be 29.6 kDa, SDS-PAGE analysis gave an apparent MW of approximately 28 kDa.

In order to determine the oligomeric state in solution of the scFv, a western blotting assay (Fig. 3B) and a multiangle laser light scattering study (MALLS) (Fig. 3C) were performed on renatured and gel filtration purified products (Fig. 3A). Fig. 3A showed one large shoulder (numbered as 1 & 2) and two peaks (numbered 3 & 4). The corresponding fractions were subjected to SDS-PAGE and western blotting in reducing (R) and non-reducing (NR) conditions (Fig. 3B). Under NR conditions, Fig. 3B, lanes 1 and 2 showed

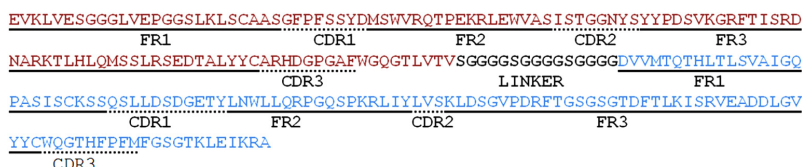


Fig. 2. Encoded amino acid sequence of the scFv D32.10. The red color show the V_H domain of D32.10, the black color the linker (Gly₄Ser)₃, and the blue color the V_L domain of D32.10. Framework (FR) and CDR were in solid and dotted lines, respectively.

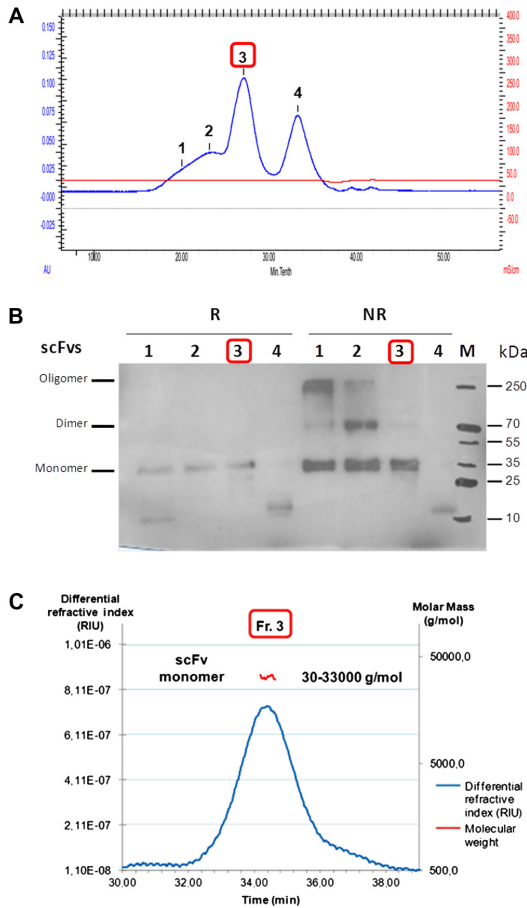


Fig. 3. Analysis of the purified scFv D32.10 by using MALLS methodology. After purification of the scFv on high resolution 10/30 Superdex 75 column (A), the fractions 1, 2, 3 and 4 were subjected to SDS-PAGE (B) under reducing (R) and non-reducing (NR) conditions, and the fraction 3 was analyzed by MALLS (C).

the presence of misfolded oligomeric and dimeric scFv, in the peaks 1 and 2, respectively. Only scFv monomers were detected in the fractions 3 under both NR and R conditions (Fig. 3B).

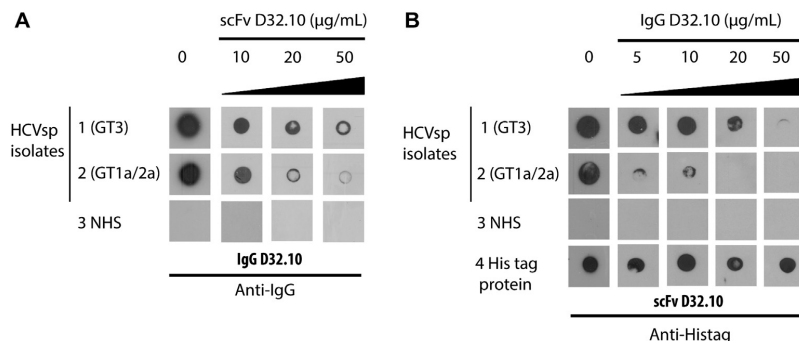


Fig. 4. Cross-competition of scFv with the parental IgG D32.10. Dot blot experiments with two HCVsp isolates 1 (GT3) and 2 (GT1a/2a), NHS as control antigenic probe (3) and His tag protein (4) as positive control for anti-Histag antibodies. (A) Competition with increasing amounts of scFv. (B) Competition with increasing amounts of parental IgG.

Possibly, the fraction 2 may also contain functional non-covalent dimers or diabodies [10]. The results achieved by MALLS confirmed that the fraction 3 is pure and consists of a homogenous monomeric scFv D32.10 species with a MW of 30–33 kDa (Fig. 3C).

3.2. The scFv specifically recognizes serum-derived HCV particles (HCVsp), E1E2 envelope complexes and E1, E2 glycoproteins and competes with the full IgG

Two HCVsp isolates, from patient 1 with genotype (GT) 3, and from patient 2 with two distinct GT1a and 2a [12], were used in dot blot experiments for their recognition by IgG D32.10 as positive controls in comparison with the scFv. As shown in Fig. 4, IgGs and scFv D32.10 specifically and strongly reacted with both HCVsp isolates, whereas did not react with NHS used as control probe (Fig. 4A and B, lanes 0). As the native antibody, the scFv showed a higher reactivity with the HCVsp isolate 1 (HCV-Lat, GT3) than with the HCV isolate 2 (HCV-Fan, GT1a/1b), independently of the genotype but dependent on surface pattern of HCV particles [6,7]. It is worth noticing that the scFv significantly inhibited in a concentration-dependent manner the binding of IgG D32.10 to both HCVsp isolates (>50% for the isolate 1 and >70% for the isolate 2 at a concentration of 50 µg/ml corresponding to a molecular ratio IgG/scFv = 2) (Fig. 4A). Conversely, IgG D32.10 inhibited the binding of scFv to both HCVsp isolates in a concentration-dependent manner with a complete (100%) inhibition at a concentration of 50 µg/ml for the isolate 1 and at a concentration of 20 µg/ml for the isolate 2 (Fig. 4B). This supports that the scFv and full IgG molecule of D32.10 recognize the same epitope and exhibit similar binding affinities to antigen.

The monoclonal antibody D32.10 has been shown to also react with large E1E2 complexes and E1 and E2 glycoproteins [5]. Therefore, using the same HCVsp isolates as antigenic probes, the HCV polypeptide specificity of scFv D32.10 was tested by western blot analysis (Fig. 5) under non-reducing (NR) and reducing (R) conditions. When the two GT3 and GT1a/2a isolates (corresponding to lanes 1 and 2, respectively) were analyzed under NR conditions (Fig. 5A), scFv D32.10 recognized disulfide-linked complexes recovered in the upper part of the gel (≥ 250 kDa) as IgG D32.10. These high MW bands likely correspond to hetero-oligomeric E1E2 complexes [6,13]. Under R conditions (Fig. 5B), scFv D32.10 recognized two (HCVsp GT1a/2a, lane 2) or three (HCVsp GT3, lane 1) bands at 31 kDa, 62 kDa and around 100 kDa, corresponding to E1, E2, and heterodimer E1E2, respectively. Same patterns were observed with IgGs D32.10. No reactivity was detected with NHS (lanes 3) as control antigenic probe. As positive control, His tag protein (lane 4) was detected by anti-His tag antibodies.

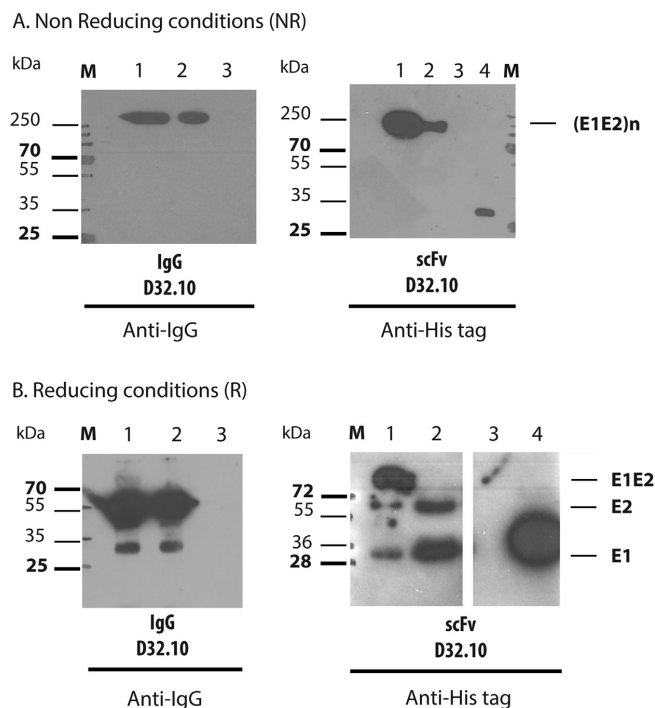


Fig. 5. scFv D32.10 reactivity with serum-derived HCV E1E2 proteins. Western blot with two HCVsp isolates (lanes 1, GT3 & lanes 2, GT1a/2a), NHS (lanes 3) and His tag protein (lanes 4) as control probes, tested under NR (A) and R (B) conditions. Immunoblotting was performed using IgG or scFv D32.10. The molecular masses of markers are indicated in kilodaltons (kDa).

Altogether, these results confirm that the scFv D32.10 exhibits the same HCV E1E2 antigenic specificity as the native antibody.

4. Discussion

The scFv construction of anti-HCV E1E2 D32.10 mAb is functional since it recognizes serum-derived HCV 1a/2a and HCV 3a particles, as well as large E1E2 complexes and E1 and E2 glycoproteins [5–7]. Moreover, it competes with D32.10 IgG for binding to antigen. By using size-exclusion chromatography associated with light-scattering, we show that the scFv D32.10 forms misfolded dimers and oligomers as frequently observed with scFv constructions, but functional well-refolded monomers are in great majority.

HCV envelope glycoproteins, which are involved in HCV entry into host cells, represent the major targets of neutralizing antibodies (nAbs). To date the majority of neutralizing mAbs against HCV infection target conserved regions on E2 [14]. Mapping of neutralization epitopes on the HCV E2 protein sequence showed that nAbs to linear epitopes targeted a segment adjacent to HVR1, encompassing aa 410–425 as the mouse mAb AP33 having contact residues within aa 412–423 [15,16], and to conformational epitopes targeted mainly two discontinuous regions, aa 424–443 and aa 523–540 [15]. However, the 412–423 epitope appeared to be weakly immunogenic and AP33-like antibodies are less prevalent in HCV-infected patients suggesting that such nAbs do not play a major role in natural clearance of HCV infection [17]. Moreover, AP33-escape mutants arose under selection pressure and are resistant to AP33-mediated neutralization [18].

The anti-HCV E1E2 mAb D32.10 is the unique antibody obtained by immunization with HCV particles isolated from infected patients. Epitope mapping identified the D32.10 epitope being formed by three well-conserved discontinuous E1 (aa 297–306) and E2 segments (aa 480–494 and aa 613–621), obviously highly immunogenic and juxtaposed on the surface of native circulating enveloped HCV particles (HCVsp) in chronic hepatitis C patients [5,6]. Unlike well-characterized anti-HCV E2 human mAbs with potent cross-neutralizing activity, D32.10-like antibodies have been shown to be associated with spontaneous virus clearance and predictive for complete viral response in chronically-infected patients under SOC antiviral therapy [9]. The E1E2 epitope targeted by the D32.10 mAb has been shown to be preferentially involved in interactions between the virus and polarized hepatocytes [7]. In the recently proposed 3D-model of HCV E2 ectodomain (E2e) [19], the E2 segment, aa 613–621, recognized by D32.10 encompassed residues 613–618 important for CD81 binding. The E2 segment, aa 480–494, also recognized by D32.10 encompasses a highly conserved stretch of residues stabilized by disulphide bridge 3 (Cys486–Cys494). This segment was close to the putative highly conserved fusion peptide, which may also form a contact with E1 glycoprotein [19]. Obviously, these three segments which composed the discontinuous antigenic determinant identified by the D32.10 mAb were exposed and physically very close in the quaternary structure of the E1E2 envelope glycoprotein complexes expressed on the surface of natural HCVsp of all genotypes.

The unique properties of mAb D32.10 highlighted the relevance of developing D32.10-based anti-HCV therapy. Therefore, this study was conducted to generate a scFv more convenient to use

than the full-length mAb, for medical applications. Here, we demonstrate that the scFv D32.10 fragment with a V_H -linker- V_L orientation is expressed mainly as functional forms. Indeed, it binds native HCVsp as well as E1 and E2 antigens and significantly inhibits the binding of the IgG D32.10 to HCVsp. Therefore, it efficiently recognizes the same epitope than the original parental mAb. Future studies should include investigations in *in vitro* neutralization assay and *in vivo* animal models to enhance the therapeutic applicability of this scFv, especially in the issue of HCV reinfection after liver transplantation.

Acknowledgements

We particularly thank Laura Tengo and Julien Pérard for their expert technical assistance. C. F. is the recipient of MENRT fellowship. This work used the platforms of the Grenoble Instruct Centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.057>.

References

- [1] Lemon, S.M., Walker, C., Alter, M.J. and Yi, M. (2007) Hepatitis C Viruses in: Fields Virology (Knipe, D., Howley, P., Griffin, D.E., Lamb, R.A. and Martin, M.A., Eds.), Lippincott Williams, Philadelphia.
- [2] Ciesek, S. and Manns, M.P. (2010) Hepatitis in 2010: the dawn of a new era in HCV therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 69–71.
- [3] Micallef, J.M., Kaldor, J.M. and Dore, G.J. (2006) Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J. Viral Hepat.* 13, 34–41.
- [4] Kuiken, C. and Simmonds, P. (2009) Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol. Biol.* 510, 33–53.
- [5] Petit, M.A., Jolivet-Reynaud, C., Peronnet, E., Michal, Y. and Trepo, 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.
- [6] Petit, M.A., Lievre, M., Peyrol, S., De Sequeira, S., Berthillon, P., Ruigrok, R.W. and Trepo, C. (2005) Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* 336, 144–153.
- [7] Ndongo, N., Rechoum, Y., De Sequeira, S., Zoulim, F., Trepo, C., Drouet, E. and Petit, M.A. (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.
- [8] Ndongo-Thiam, N., Berthillon, P., Errazuriz, E., Bordes, I., De Sequeira, S., Trepo, C. and Petit, M.A. (2011) Long-term propagation of serum hepatitis C virus (HCV) with production of enveloped HCV particles in human HepaRG hepatocytes. *Hepatology* 54, 406–417.
- [9] Ndongo, N., Berthillon, P., Pradat, P., Vieux, C., Bordes, I., Berby, F., Maynard, M., Zoulim, F., Trépo, C. and Petit, M.A. (2010) Association of anti-E1E2 antibodies with spontaneous recovery or sustained viral response to therapy in patients infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 52, 1531–1542.
- [10] Weisser, N.E. and Hall, J.C. (2009) Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* 27, 502–520.
- [11] Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61–68.
- [12] Trepo, C., Berthillon, P. and Vitvitski, L. (1998) HCV and lymphoproliferative diseases. *Ann. Oncol.* 9, 469–470.
- [13] Yagnik, A.T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R.M., Ercole, B.B., Nicosia, A. and Tramontano, A. (2000) A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40, 355–366.
- [14] Sautto, G.A., Diotti, R.A. and Clementi, M. (2012) New therapeutic options for HCV infection in the monoclonal antibody era. *New Microbiol.* 35, 387–397.
- [15] Wang, Y., Keck, Z.Y. and Fong, S.K. (2011) Neutralizing antibody response to hepatitis C virus. *Viruses* 3, 2127–2145.
- [16] Tarr, A.W., Owsianka, A.M., Timms, J.M., McClure, C.P., Brown, R.J., Hickling, T.P., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., Patel, A.H. and Ball, J.K. (2006) Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology* 43, 592–601.
- [17] Tarr, A.W., Owsianka, A.M., Jayaraj, D., Brown, R.J., Hickling, T.P., Irving, W.L., Patel, A.H. and Ball, J.K. (2007) Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J. Gen. Virol.* 88, 2991–3001.
- [18] Gal-Tanamy, M., Keck, Z.Y., Yi, M., McKeating, J.A., Patel, A.H., Fong, S.K. and Lemon, S.M. (2008) *In vitro* selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19450–19455.
- [19] Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C.M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, L., Johansson, D.X., Tawar, R.G., Baron, B., England, P., Persson, M.A. and Rey, F.A. (2010) The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog.* 6, e1000762.

Étant donné sa production en corps d'inclusion, nous avons choisi de totalement dénaturer la protéine scFv D32.10 en condition urée et d'appliquer la technique du *flash refolding* en diluant celle-ci 50 fois dans un tampon spécifique composé de glutathion réduit et oxydé afin d'aider à la reformation des ponts disulfures. Ce mécanisme est absent dans le système d'expression bactérien. Les produits ayant subi la technique du *flash refolding* ont été purifiés par chromatographie d'exclusion afin d'éliminer les *protéines de grande taille*. La technique du *western blot* a montré que les *protéines de grande taille* correspondaient à des oligomérisations du scFv D32.10. Des techniques de biophysique comme le MALLS ont néanmoins révélé que 10% de la protéine soumise au *flash refolding* était mono-dispersée c'est-à-dire composée de protéines identiques du point de vue de la taille et structure. De ce résultat, nous avons conclu qu'une partie aurait possiblement été renaturée correctement. Dans le but de vérifier cette hypothèse, des tests de fonctionnalité ont été réalisés par des techniques d'immunochimie sur des particules virales inactives tout en faisant le parallèle avec l'anticorps D32.10. De cette étude, nous avons conclu que le scFv D32.10 a été renaturé efficacement de façon à être fonctionnel. Cette technique a été répétée de nombreuses fois prouvant ainsi sa robustesse. De plus, afin de faire une étude comparative entre l'anticorps entier et le scFv, une compétition entre les deux entités a été réalisée et visualisée par Dot Blot. Ces résultats montrent que le scFv D32.10 est moins efficace que l'anticorps entier mais qu'il reste néanmoins très compétitif par rapport à l'anticorps.

CONCLUSION

Par la technique du *flash refolding*, il a été démontré que la construction élaborée était fonctionnelle et compétitive. Cependant, même si cette production est adaptée pour les études immunochimiques, ce n'est malheureusement pas le cas pour des études structurales qui demandent de grandes quantités de protéine. Pour cela, d'autres moyens de production ont été testés pour améliorer le rendement d'expression. En particulier, nous nous sommes tournés vers deux types de techniques comme (i) le système d'expression acellulaire (*cell-free*) qui est une technique innovante permettant de tester différentes conditions d'expression et plus particulièrement celle permettant de faciliter la création de pont disulfure, étape pouvant être limitante dans notre cas et (ii) le système d'expression baculovirus.

5.2. Test d'expression en *cell-free* et fonctionnalité du scFv D32.10

5.2.1. Qu'est ce que l'expression en système *cell-free* ?

L'expression en *cell-free* est une technique de production acellulaire de protéines recombinantes utilisant des lysats cellulaires eucaryotes ou procaryotes et leurs machineries traductionnelles. Cette technique permet donc de produire de grande quantité de protéines d'intérêt tout en évitant les phénomènes de cytotoxicité ou d'insolubilité (corps d'inclusion) se produisant couramment dans les systèmes cellulaires. La production se faisant dans un système ouvert, de nombreux éléments ou cofacteurs peuvent être ajoutés afin de faciliter la production protéique. La production en *cell-free* du scFv D32.10 a été testée par la société grenobloise **Synthelis** qui a optimisé ce système pour l'expression des protéines membranaires (*cf* Figure 5.2). Les échantillons de production ont ensuite été purifiés et testés à l'UVHCl. Ces points seront développés dans ce chapitre.

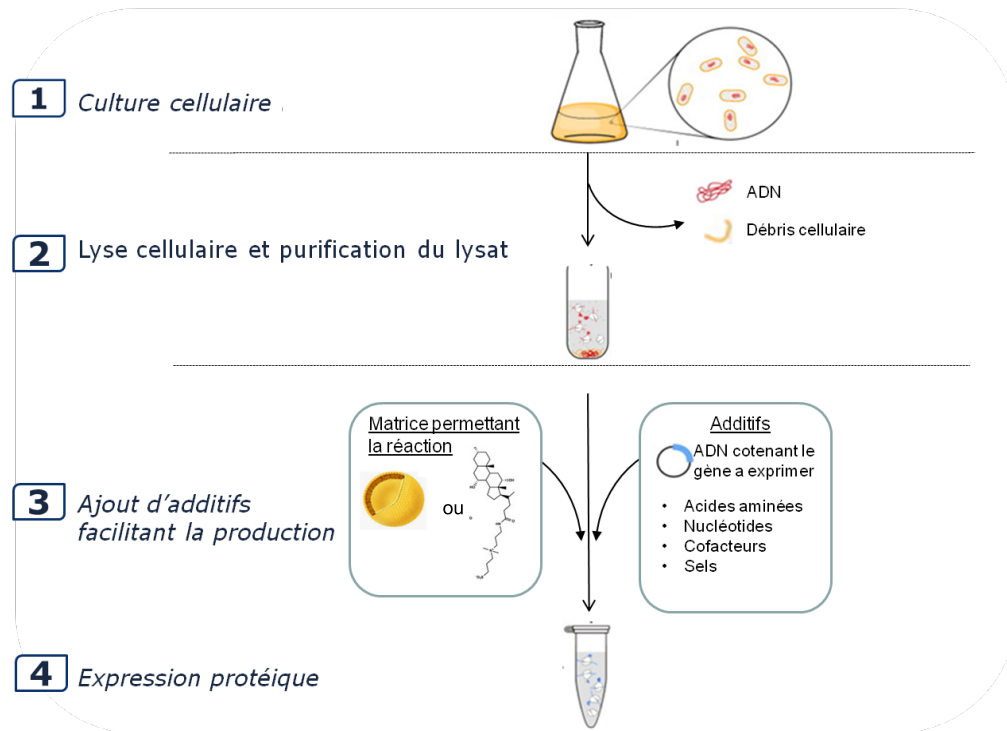


FIGURE 5.2.: Schéma de production en cell-free de protéines recombinantes

La production de protéines en système acellulaire commence par la mise en culture de cellules procaryotes (ex : *E.coli*) ou eucaryotes (ex : levures, germe de blé ou insectes). Ensuite, les cellules sont lysées, fractionnées et purifiées afin d'en retirer l'ADN et l'ensemble des membranes et organelles. Ce lysat constituera la base du milieu réactionnel contenant l'ensemble des composants nécessaires à la transcription et traduction. La réaction démarrera lors de l'ajout soit du plasmide contenant le gène à exprimer ou soit d'un produit PCR. Bien que le lysat soit suffisant pour l'expression de la protéine il est possible de favoriser la production protéique en complétant le milieu réactionnel avec des cofacteurs et les substrats nécessaires à l'ARN polymérase, ainsi qu'aux ribosomes. Généralement, des sels (ex : K^+ et Mg^{2+}), l'ensemble des acides aminés, des ARN_t et des formes énergétiques seront rajoutés. Leurs quantités optimales devront être criblées car de grandes variations sont observées en fonction du type du lysat, de la protéine et de sa construction moléculaire [Carlson et al., 2012].

5.2.2. Purification

Sur les neuf conditions testées par l'entreprise, une seule a démontré son intérêt du point de vue de la quantité et de la solubilité. Une production à grande échelle a alors été réalisée, et deux tests de purification en condition native et dénaturante ont été réalisés sur résine nickel .

5.2.2.1. Matériel et méthodes

5.2.2.1.a. Purification en condition native

L'étiquette polyhistidine fusionnée du côté N-terminal de la protéine scFv D32.10 permet sa purification par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Le principe de cette technique repose sur les interactions ioniques qui se forment entre les résidus histidines chargés négativement et les ions nickel de la résine chargés positivement. Afin de purifier la protéine scFv D32.10, la colonne contenant de la résine Ni-NTA (Qiagen) a été équilibrée avec du tampon d'équilibration contenant 100 mM Tris-HCl pH=8, 300 mM NaCl et 0.5% Brij-35. Le produit d'expression cellulaire a ensuite été déposé sur colonne après centrifugation et filtration (0.2 μ m). Une étape de lavage a été réalisée avec du tampon de lavage contenant 100 mM Tris-HCl pH=8, 300 mM NaCl, 5 mM d'imidazole et 0,5% brij-35. La protéine a été éluée avec le tampon élution contenant 100 mM Tris-HCl pH=8, 300 mM NaCl, 300 mM d'imidazole et 0.5% brij-35. L'échantillon avant et après dépôt sur colonne, les fractions du lavage et l'élution ont été récupérés et analysés en western blot afin de localiser la protéine .

5.2.2.1.b. Purification en condition dénaturante

Pour ce qui est de la purification en condition dénaturante¹, l'échantillon a préalablement été traité en le diluant au tiers avec le tampon d'équilibration ajusté à 8 M d'urée et purifié sur résine nickel. Les étapes de purification de la protéine sont identiques à celles mentionnées dans le paragraphe précédent, sauf pour le tampon d'équilibration de lavage et des éluions auquel sont ajoutés 8 M d'urée, afin de maintenir la condition dénaturante. Le produit, les fractions de lavages et d'élutions ont été récupérés puis analysés en western blot.

5.2.2.1.c. Électrophorèse et western blot

Afin de visualiser la protéine purifiée sur résine nickel en condition native et dénaturante, une analyse en western blot a été réalisée. Dans un premier temps, les fractions du produit brut, du lavage et de l'élution ont été déposées sur gel de polyacrylamide 13% et transférées sur membrane PVDF (20V pendant 1 h). Après saturation pendant 30 minutes dans du tampon TBS-tween 5% lait, la membrane est incubée pendant une heure avec un anticorps monoclonal reconnaissant l'étiquette poly histidine couplé à une *horseradish peroxidase* (HRP - 1/10 000, Sigma-Aldrich). Les résultats sont révélés par la mise en présence du substrat de la HRP : 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich).

5.2.2.2. Résultats et interprétation (cf Figure 5.3)

La bande attendue pour la protéine scFv D32.10 se situe au niveau de 29 à 30 kDa. Sur la figure 5.3 elle est indiquée par une flèche. Le western blot de contrôle des purification se divise en deux parties représentant la condition native et la dénaturante. L'éluat 1 est commun aux deux et montre que la protéine est présente avant toute étape de purification.

- **Pour la purification en condition native** : une bande de forte intensité est présente dans la fraction 2 représentant la partie de l'échantillon étant passé à travers la colonne mais ne s'étant pas accroché soit pour des raisons de saturation de la colonne ou bien de la non reconnaissance de l'étiquette polyhistidine par la résine. La présence d'une bande de faible intensité au niveau

1. Cette étape permet de rompre toutes les liaisons assurant les structures secondaires et tertiaires

de la fraction de lavage (fraction 3) et de l'éluat (fraction 4) démontre que la protéine est peu présente à ces étapes là. La présence du scFv D32.10 dans la fraction de dépôt (1), laisse penser que la protéine n'est pas accrochée à la résine nickel.

- **Pour la purification en condition dénaturante** : La fraction 2 démontre que la protéine est présente en plus faible quantité après passage sur la colonne que dans la condition native. Ceci est cohérent avec le fait que l'échantillon de dépôt a été dilué au tiers avec du tampon de dénaturation. Le fraction 3 (étape de lavage) montre qu'une légère quantité de protéine est éluée lors du lavage. Néanmoins, le scFv se retrouve majoritairement dans l'éluat (fraction 4).

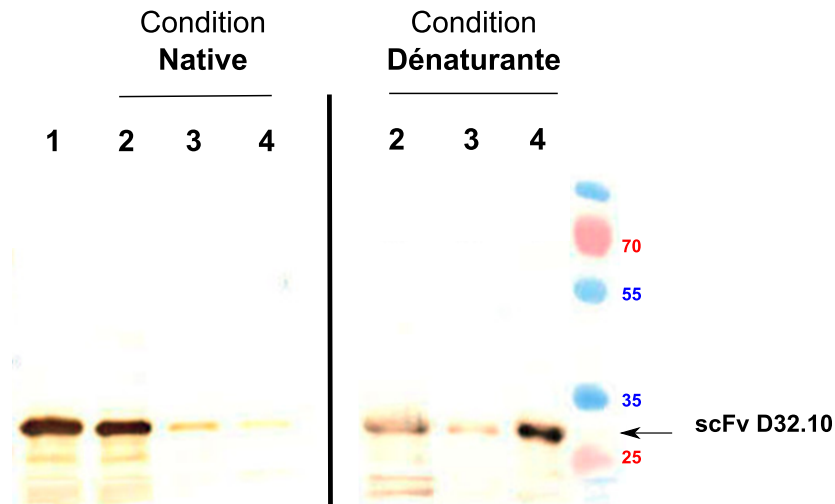


FIGURE 5.3.: Western blot du test de purification du scFv D32.10 exprimé en cell-free

Sur la figure, les blots correspondant à la purification en condition native ou dénaturante sont représentés. (1) L'échantillon avant purification (2) Fractions après passage sur colonne en condition native ou dénaturante. (3) Lavage de la colonne. (4) Récupération de la protéine fixée à la résine.

Étant donné ces résultats, nous concluons que la protéine en condition native ne s'accroche pas à la résine nickel. Cela peut s'expliquer par la non disponibilité de l'étiquette polyhistidine dans la condition native contrairement à la condition dénaturante. Ceci inciterait à dire que la protéine serait mal repliée. Afin de compléter ces expériences, un test d'activité a été réalisé pour valider cette hypothèse.

5.2.3. Test d'activité (cf Figure 5.4)

Les tests d'activité ont été réalisés comme décrit au niveau de l'article dans le paragraphe 2.5, *Antigen-binding and competitive binding of scFv* (page 15). Néanmoins, dans le cas de l'expression en système cell-free, un extrait purifié n'ayant pas pu être obtenu, le produit brut fourni par l'entreprise a été utilisé à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en raison d'un nombre élevé de contaminants (Dot Blot 1). Des particules HCV LAT (génotype 3), FAN (génotype 1a/2a) [Ndongo et al., 2011], un contrôle négatif composé de sérum humain normal et un contrôle positif ont été déposés sur une membrane nitrocellulosique. En parallèle, en tant que contrôle positif de l'expérience, un Dot Blot (Dot Blot 2) avec les mêmes dépôts a été réalisé avec le scFv D32.10 produit par *flash refolding* ayant déjà montré une réactivité anti-HCV contre les particules virales. L'absence de signal au niveau des dépôts de particules HCV démontre que le scFv D32.10 produit en cell-free ne reconnaît pas les particules virales contrairement au scFv D32.10 produit en *flash refolding* dans les conditions utilisées.

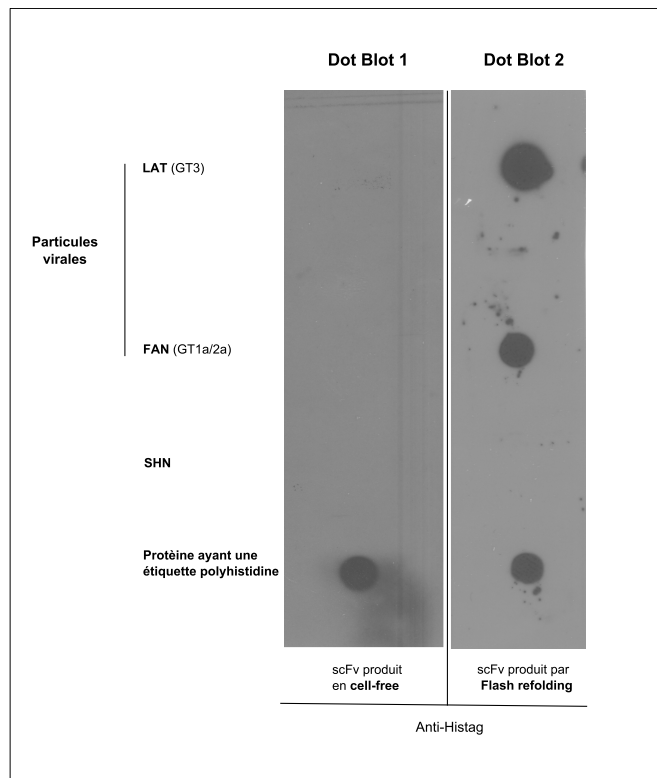


FIGURE 5.4.: **Activité du scFv produit en cell-free (Dot Blot 1) versus scFv produit par *flash refolding* (Dot Blot 2)**

Des particules HCV LAT génotype 3 (GT3) et FAN génotype 1a/2a (GT 1a/2a) ont été utilisées comme antigènes. Du sérum humain normal (SHN) est utilisé comme contrôle négatif de l'expérience et une protéine ayant une étiquette polyhistidine comme contrôle positif du western blot.

CONCLUSION

L'analyse réalisée sur la production protéique en *cell-free* démontre que malgré son apparente solubilité, la protéine ne reconnaît pas les particules HCV. Cette observation est appuyée par celle qui a été faite lors de la purification en condition native, qui permet de faire l'hypothèse d'un mauvais repliement de la protéine. Étant donné le large éventail d'additifs testés afin de reformer les ponts disulfures, il semblerait que celui-ci ne soit pas l'unique élément empêchant la production d'une protéine ayant conservé son activité anti-HCV. De ces deux expériences, nous pouvons conclure que ce moyen d'expression n'est pas adapté à notre construction. Afin d'expérimenter un autre mode de production, l'expression en baculovirus a été sélectionnée afin de produire en parallèle une protéine cytoplasmique et une protéine sécrétée.

5.3. Expression en baculovirus et fonctionnalité du scFv D32.10

5.3.1. Qu'est ce que l'expression en baculovirus ?

La technique d'expression en baculovirus est de nos jours, l'une des techniques les plus utilisées afin de produire des protéines recombinantes (*cf* Figure 5.5). Elle consiste à utiliser le baculovirus pour infecter naturellement des cellules d'insecte afin qu'elles produisent la protéine d'intérêt. Pour cela, ce virus aura été au préalable modifié afin d'intégrer le gène de la protéine à produire. Dans

ce cas, le virus est utilisé comme un vecteur infectieux qui détournera à son avantage la machinerie cellulaire des cellules infectées pour produire une protéine. L'intérêt de ce système est de produire les protéines eucaryotes ou d'expression difficile en bactérie mais aussi de produire des protéines en grande quantité tout en assurant la majeure partie des modifications post-traductionnelles essentielles à l'activité biologique des protéines sécrétées. Le système utilisé dans le cas de la production du scFv D32.10 est celui développé par la plateforme Eukaryotic Expression Facility (EEF) de l'EMBL dirigé par le Dr Imre Berger.

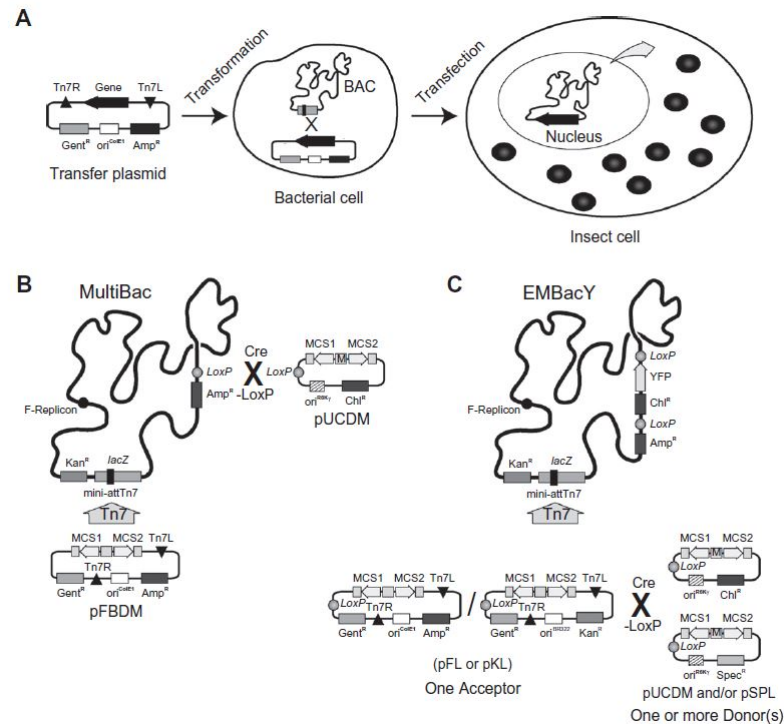


FIGURE 5.5.: Principe de production par le système baculovirus

(A) Le gène d'intérêt est intégré au génome du baculovirus grâce au système Tn7 (phénomène de *recombinaison*). Les cellules d'insecte seront ainsi *transfectées* pour exprimer la protéine désirée et sécréter un baculovirus portant le gène d'intérêt. Le virus pourra sera collecté et utilisé pour ré-infecter de nouvelles cellules (B et C) Mutlibac et EmbacY sont les deux systèmes baculovirus pouvant être utilisés [Trowitzsch et al., 2010].

5.3.2. Matériel et méthodes : construction et production du scFv D32.10

Le gène codant pour le scFv D32.10 utilisé pour la production en baculovirus est le même que celui utilisé pour l'expression en bactérie. Néanmoins, celui-ci se trouvant dans un plasmide d'expression bactérienne, il a fallu dans un premier temps réaliser un nouveau clonage pour l'intégrer dans un plasmide d'expression en baculovirus. Deux plasmides ont été sélectionnés :

- **pFastBac (Life technology)** : plasmide permettant la production intracellulaire de la protéine cible ;
- **pFastBac-SS** : plasmide élaboré par le docteur Nicolas Tarbouriech possédant une étiquette melitine (Signal seq) permettant à la protéine d'être sécrétée (*cf* Figure 5.6). Le passage de celle-ci par les voies de sécrétion permet à la protéine de subir certaines modifications post-traductionnelles qui sont réalisées au niveau des voies de sécrétion (phosphorylation, glycosylation).

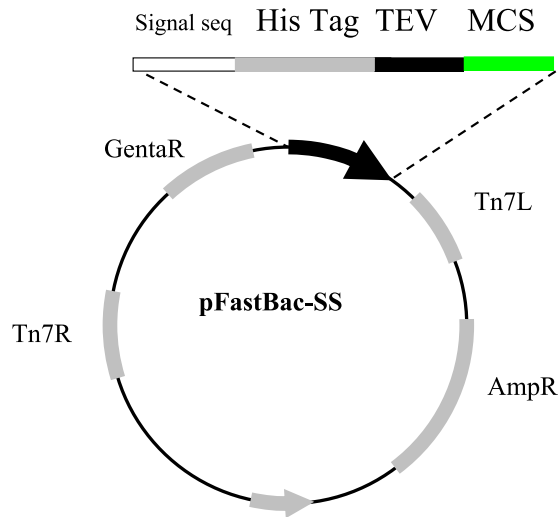


FIGURE 5.6.: Schéma du plasmide pFastBac-ss

Tn7L et Tn7R sont les sites permettant la transposition du gène du plasmide au bacmide qui deviendra un bacmide recombinant. *AmpR* et *GentaR* sont les deux gènes de résistance aux antibiotiques. *MCS* : site multiple de clonage. Les étiquettes polyhistidine et le site de coupure à la *TEV* sont respectivement indiqués par *HIS Tag* et *TEV*. Le tag de la mellitine est indiqué par *Signal seq*

5.3.2.1. Préparation du bacmide recombinant scFv D32.10 : digestion, ligation et transformation des bactéries DH10EMBacY

Afin de créer le **bacmide recombinant scFv D32.10**, 2 μg du plasmide d'expression pFastBac, du pFastBac-SS et de la construction scFv D32.10 ont été digérés par 10 U de *NcoI*, 10 U de *XhoI*, 1x de tampon 4 (New England Biolabs). Les 20 μL de volume réactionnel ont ensuite été digérés pendant 2h à 37°C. Une fois la digestion terminée, les deux plasmides ont été dephosphorylés afin d'éviter toute recircularisation de ceux-ci lors de la ligation par une Phosphatase Alcaline (CIP) (New England Biolabs).

Par la suite, les trois échantillons ont été purifiés. Pour cela, chaque produit de digestion a été séparé sur un gel d'agarose de 1% afin de récupérer les deux plasmides digérés deux fois et le gène destiné à être cloné dans les deux vecteurs. Les bandes d'intérêts sont extraites à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Les ligations du gène d'intérêt dans chaque plasmide sont réalisées suivant le rapport molaire 1/3 en présence de la ligase dans son tampon pendant deux heures à température ambiante. Les bactéries DH10EMBacY ont été transformées avec 100 ng de plasmide pFastBac et pFastBac-SS. Après transformation par choc thermique (45 secondes à 42°C puis 5 min dans la glace), la suspension bactérienne est mise en culture dans 400 μL de milieu de LB pendant toute la nuit à 37°C afin de permettre la recombinaison du gène contenu dans le plasmide et le bacmide du baculovirus. Elles sont ensuite étalées sur un milieu LB-Agar contenant :

- 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine pour sélectionner les bactéries transformées possédant le bacmide ;
- 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine utilisée pour garder les bactéries ayant intégré le gène d'intérêt situé entre les éléments transposables Tn7 du vecteur donneur ;
- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tétracycline afin de sélectionner les bactéries possédant le plasmide «helper» nécessaire à la transposition ;
- 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'IPTG qui permet d'induire l'expression de la β -galactoside (gène *lacZ*) ;
- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BluOGal, un substrat de la β -galactosidase qui sera dégradé en galactose plus un

composé bleu, quand le gène ne sera pas intégré.

Les boîtes de Pétri sont alors incubées pendant 48 h à 37°C. Une colonie blanche prouvant que le gène du scFv D32.10 s'est intégré au niveau du gène lacZ (empêchant la dégradation du bluOGal) a été sélectionnée et mise en culture dans 2 mL sur la nuit à 37 °C. Le bacmide recombinant a été extrait à l'aide du Kit Qiagen MiniPrep (Qiagen).

5.3.2.2. Production du stock viral et production de la protéine cible

Après avoir créé le bacmide recombinant, les cellules sont transfectées avec celui-ci afin qu'elles produisent et amplifient le virus recombinant. La suite des étapes est illustrée dans la figure 5.7.

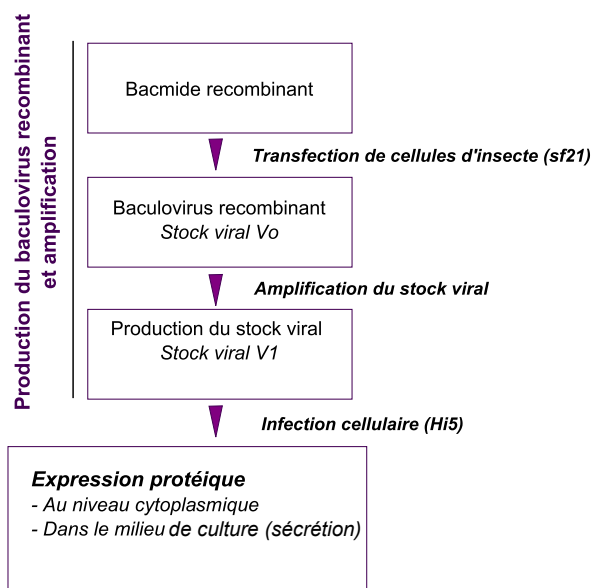


FIGURE 5.7.: Schéma global du protocole utilisé afin de produire le scFv D32.10.

Dans un premier temps, le virion infectieux contenant le gène du scFv D32.10 est produit et amplifié par une première culture cellulaire en sf21 qui constituera (V0). La production protéique démarrera lors d'une nouvelle mise en culture de cellules d'insecte (HI5). Celle-ci sera infectée par le baculovirus recombinant produit en V1 qui détournera la machinerie cellulaire afin de produire la protéine scFv D32.10

5.3.2.2.a. Production du stock viral

Les cellules utilisées dans le système d'expression baculovirus sont issues du tissu ovarien de larves du lépidoptère *Spodoptera frugiperda*, portant le nom de Sf21. Elles ont été cultivées en monocouches dans des boîtes 6 puits pour la préparation du virus dans le milieu Hyclone. 150 μ L d'un mix réactionnel contenant le XtremeGene (l'agent de transfection), l'ADN bacmidique recombinant ont été déposés sur les cellules Sf21. Après une incubation de 5h à 27°C, 3 mL de milieu Hyclone sont ajoutés puis le surnageant de culture contenant les baculovirus recombinants est récupéré après 72h de culture, toujours à 27°C. Afin d'amplifier le stock viral, 1 mL de milieu de culture contenant les virions recombinants précédemment produits a été utilisé pour infecter une nouvelle culture de cellules d'insecte sf21 à 1 million cellules/mL. La production et l'amplification des virions ont été suivies en mesurant la fluorescence de la Yellow Fluorescent Protein (YFP). Pour cela, les mesures ont été réalisées sur 1 million de cellules à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission à 525 nm par l'appareil

infinite M200 Pro (Tecan). Le stock viral ainsi produit a été nommé V1 pour la protéine intracellulaire et V1-SS pour la protéine sécrétée.

5.3.2.2.b. Production protéique

Les cellules d'insectes utilisées afin de produire la protéine scFv D32.10 sont des cellules provenant de *Trichoplusia ni* nommé HI5. Celles-ci ont été mises en culture en suspension dans du milieu Express 5 (Life Technology) ajusté en L-glutamine à 27°C. Le volume viral utilisé pour produire les protéines cytoplasmiques et sécrétées a été estimé à 250 μL du stock viral (V1 et V1-SS) pour 100 mL de culture cellulaire concentrée à 1,5 million de cellules/mL. Les cellules infectées ont été mises en culture pendant trois jours pour les deux constructions afin de produire la protéine recombinante. Du milieu Express 5 a été rajouté tout au long de l'infection afin de conserver une concentration cellulaire d'environ 1,5 million cellules/mL.

5.3.2.3. Extraction et purification des protéines recombinantes

Comme précisé auparavant, la protéine scFv D32.10 a été produite à la fois au niveau du cytoplasme mais aussi sécrétée. Dans le cas d'une production au niveau cytoplasmique, les cellules sont avant tout lysées par sonication dans un tampon de lyse contenant 50mM Tris pH=7.2 100mM KCl, 0.1% NP40. L'extrait a été centrifugé afin d'éliminer tous les débris cellulaires puis filtré et purifié. Dans le cas de la protéine du scFv D32.10 sécrétée dans le milieu, celle-ci est filtrée puis purifiée. Les purifications suivantes ont été réalisées :

5.3.2.3.a. Purification sur résine nickel

Du fait de la présence d'un agent chélateur des ions nickel present dans le milieu de culture Express 5, deux résines différentes ont été utilisées. La protéine cytoplasmique a été purifiée sur une colonne contenant de la résine nickel (Ni-NTA, Qiagen) et la protéine sécrétée sur une colonne contenant de la résine cOmplete His-tag (Roche). Ces deux colonnes ont été équilibrées avec du tampon TN300 (100mM Tris-HCl pH=8, 300 mM NaCl) et le produit issu de la lyse pour la production cytoplasmique et le milieu de culture pour la protéine sécrétée ont été passés sur les colonnes. Un lavage a été réalisé avec du tampon contenant 100mM Tris-HCl pH=8, 300 mM NaCl, 5mM Imidazole. L'élution de la protéine a été réalisée avec un tampon contenant 100mM Tris-HCl pH=8, 300 mM NaCl, 300mM Imidazole. Les étapes d'équilibration et de lavage ont été réalisées avec 5 volumes/colonne pour chaque expérience. Les éluions d'un volume/colonne ont été récupérées et chargées sur gel de polyacrylamide (13%) afin de contrôler leur pureté (*cf* Figure 5.9).

5.3.2.3.b. Purification par gel filtration

La purification par chromatographie d'exclusion ou gel filtration est une technique de purification qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille. Les protéines seront ainsi éluées dans l'ordre décroissant des masses moléculaires. L'échantillon protéique est concentré à l'aide d'un concentrateur Amicon (volume inférieur à 500 μL) puis injecté à un débit de 0,5 mL/min sur une colonne d'exclusion Superdex 200 10/300 GL 24 mL (GE Healthcare). La colonne est au préalable équilibrée dans du tampon TN300 100 mM Tris HCl, 0,3 M NaCl, pH=8. Des fractions de 500 μL sont récoltées et analysées sur gel SDS PAGE 13% (*cf* Figure 5.10). La fraction représentative de la protéine scFv D32.10 a ensuite été étudié en MALLS comme il a été décrit dans l'article 2.6 *Biophysics characterization and structure determination*.

5.3.2.4. Test d'activité

Afin de contrôler la qualité de notre nouveau mode de production, des Dot Blot ont été réalisés selon le protocole décrit au niveau de l'article dans le paragraphe 2.5 *Antigen-binding and competitive binding of scFv*.

5.3.3. Expression et purification de la protéine cytoplasmique et sécrétée

5.3.3.1. Expression

Afin de vérifier l'expression de la protéine scFv D32.10 en cellules d'insecte, un western blot a été réalisé sur les produits d'expression cytoplasmique et sur la protéine sécrétée (cf Figure 5.8).

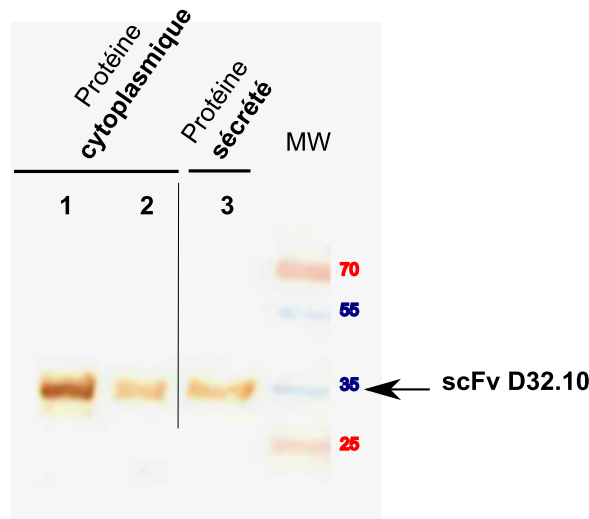


FIGURE 5.8.: Western blot de la protéine cytoplasmique et de la protéine sécrétée scFv D32.10 produites en baculovirus

La protéine scFv D32.10 est indiquée par une flèche. Pour le western blot représentant la protéine produite dans le cytoplasme, le puits 1 indique la fraction insoluble. Le puits 2 représente la fraction soluble du lysat cellulaire. Le puits 3 indique la protéine présente au niveau du milieu de culture cellulaire

- **Dans le cas de la protéine produite au niveau cytoplasmique**, les cellules d'insecte ont été lysées puis centrifugées afin de séparer la partie soluble du surnageant (puits 2) et la partie insoluble composée de débris cellulaires (puits 1). On observe une bande de plus forte intensité dans la partie insoluble du lysat (puits 1) que dans la partie soluble (puits 2). Cela montre qu'une grande partie de la protéine est présente sous forme d'agrégats. Un test de purification sur résine nickel a été réalisé sur la fraction soluble (cf Figure 5.9 Gel 1).
- **Dans le cas où la protéine est sécrétée**, le milieu de culture est centrifugé et le surnageant est débarrassé des gros débris par filtration, puis déposé dans le puits 3. Une bande équivalente au puits 2 est observée démontrant qu'une partie de la protéine sécrétée dans le milieu est soluble. Le milieu sera aussi purifié sur résine nickel.

5.3.3.2. Purification

Purification sur Résine nickel Afin de purifier la protéine produite dans le cytoplasme et celle sécrétée dans le milieu, 100 mL de chaque culture sont produits et purifiés sur résine nickel. Afin de contrôler la qualité de la purification, les échantillons ont été analysés sur gel SDS-PAGE à 13% et

visualisés directement par coloration du gel. La bande attendue se situe aux alentours de 30 kDa. Les deux gels sont représentés sur la figure 5.9.

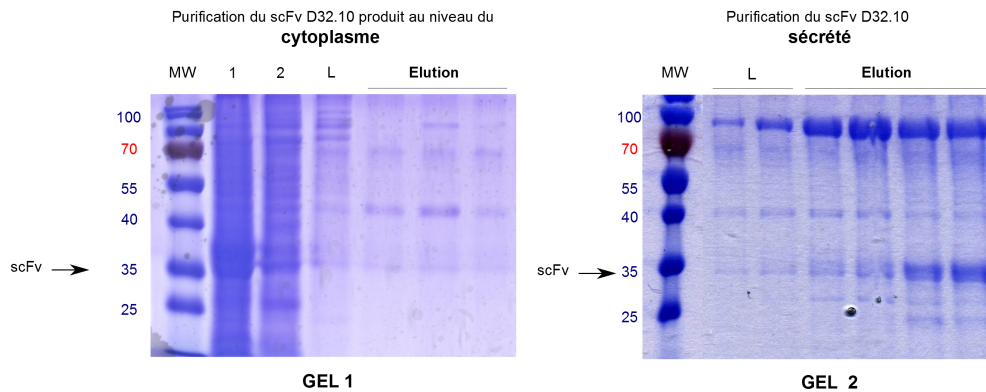


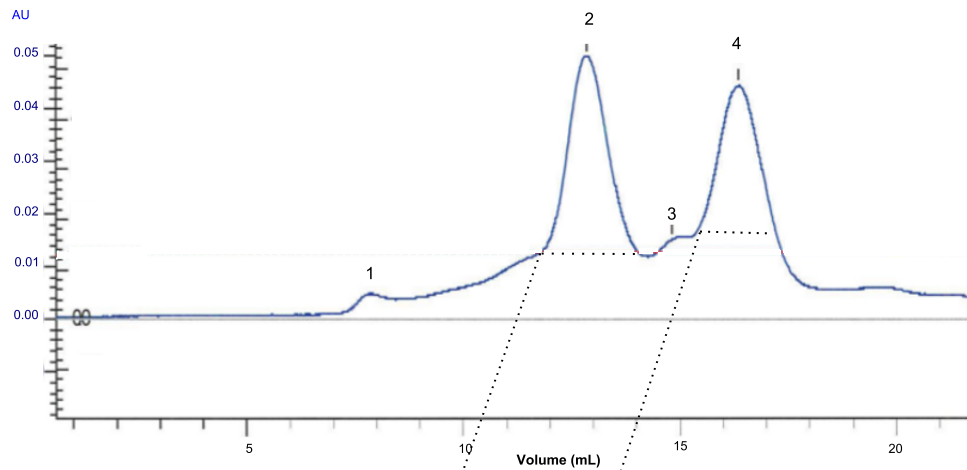
FIGURE 5.9.: Purifications sur résine Nickel de la protéine scFv D32.10 produite au niveau cytoplasmique (Gel 1) et sécrétée (Gel 2)

Pour le gel 1, les chiffres 1 et 2 indiquent respectivement la fraction insoluble et soluble de la protéine scFv D32.10. En ce qui concerne, le gel 1 et 2, les étapes de lavage et d'éluion sont indiquées par la lettre L et le mot éluion.

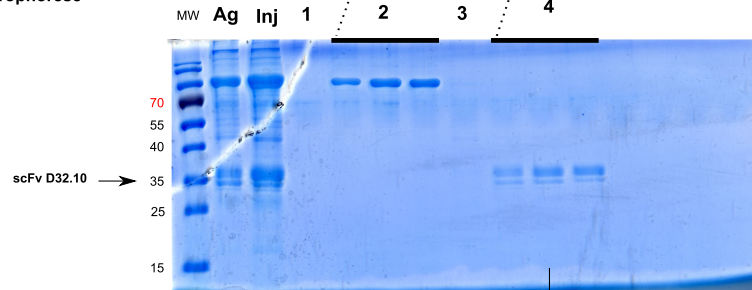
- **Purification de la protéine produite au niveau cytoplasmique**, celle-ci est encore largement présente au niveau des débris cellulaires (puits 1), indiquant par la même occasion sa forte propension à rester sous forme d'agrégats, ce qui est cohérent avec les observations en western blot (*cf* Figure 5.8)). De plus, malgré la présence de nombreux contaminants, on distingue la protéine scFv dans l'échantillon passé sur la résine nickel, démontrant qu'une large partie de la protéine ne s'accroche pas à celle-ci. De plus, une très faible bande est observée au niveau du lavage et de l'éluion. D'après ces observations, la protéine scFv D32.10 produite dans le cytoplasme n'est que très faiblement purifiable.
- **Purification de la protéine sécrétée**, l'échantillon après le lavage et après l'éluion de la résine sont déposés sur gel. Dans ces conditions, nous observons que la protéine sécrétée est faiblement présente au niveau du lavage mais largement présente au niveau de l'éluion. D'après ce gel, nous avons conclu que la protéine est présente dans la condition sécrétée mais aussi purifiable sur résine nickel. Afin d'éliminer les contaminants encore présent, une partie du produit de purification est purifiée dans une seconde étape grâce à une colonne d'exclusion de taille.

Purification par gel filtration Avant injection, la protéine est centrifugée afin d'éliminer les protéines qui se seraient agrégées lors de la concentration. Le précipité obtenu à cette étape a été resuspendu puis a été déposé sur gel avec le produit injecté sur la colonne afin de contrôler l'état de la protéine pré-injection. Au niveau du profil de gel filtration (*cf* Figure 5.10(B)), 4 pics sont distinguables et sont déposés sur le même gel (*cf* figure Figure 5.10(B) 1-4). Celui-ci montre qu'une partie de la protéine s'est effectivement agrégée pendant la concentration mais néanmoins, la grande majorité de celle-ci reste présente sous forme soluble. Les pics 1, 2, et 3 proviennent de l'absorbance de protéines contaminantes qui pour le pic 2 migre au alentour de 100 kDa. La protéine scFv D32.10 est présente au niveau des fractions du pic 4 avec un léger produit de dégradation. Dans le but, de déterminer sa masse molaire exacte et de savoir si le pic 4 est composé d'une protéine monodisperse, elle est concentrée puis injecté sur MALLS. Par cette technique, la masse de la protéine a été estimée à 30 kDa avec une marge d'erreur de 3 kDa. De plus, l'indice de refraction (dRI) indique que la protéine est monodisperse. Afin de tester sa fonctionnalité, un Dot Blot a été réalisé.

A : Purification par chromatographie d'exclusion de taille



B : Gel d'électrophorese



C : multi-angle laser light scattering (MALLS)

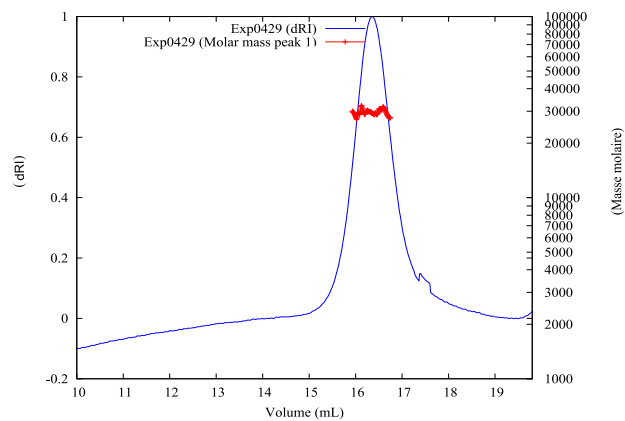


FIGURE 5.10.: Purification du scFv D32.10 secreté

(A) *Profil d'éluion de la gel filtration.* Les fractions ayant été déposées sur gel ont été numérotées de 1 à 4. (B) *Gel SDS PAGE (13%).* MW indique le dépôt du marqueur de taille protéique, Ag les agrégats après concentration, Inj l'échantillon injecté sur colonne et les numéros 1 à 4 les fractions correspondant aux pics d'éluion de la gel filtration. (C) *Etude biophysique de la protéine scFv D32.10.* La courbe bleue indique l'indice de refraction du profil d'éluion de la protéine et la courbe rouge sa masse molaire en fonction de son volume d'éluion.

5.3.3.3. Fonctionnalité (cf Figure 5.11)

Les particules virales LAT (GT3), FAN (GT1a/2a), un contrôle négatif (sérum humain normal SHN) et un contrôle positif correspondant à une protéine polyhistidine ont été déposés. La présence d'un signal au niveau des dépôts LAT et FAN montre que le scFv sécrété produit en baculovirus reconnaît les particules virales, mais pas les protéines présentes dans le sérum humain normal ce qui prouve que le scFv produit par la technique de baculovirus est fonctionnel et aussi réactif que le scFv produit par la technique *flash refolding*.

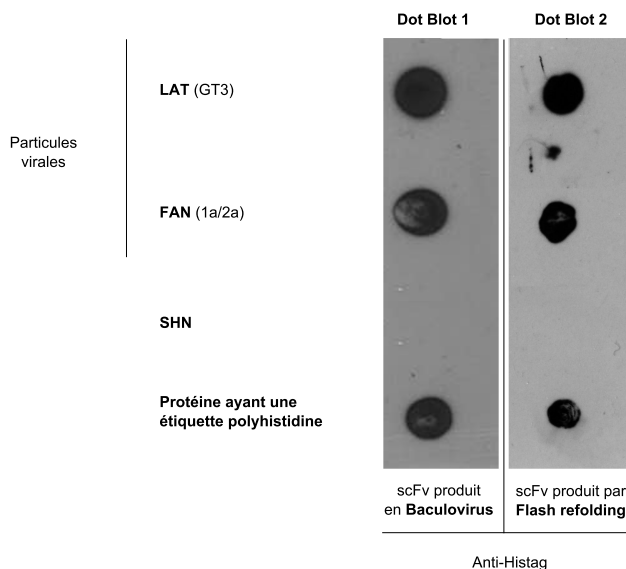


FIGURE 5.11.: **Activité du scFv produit en baculovirus (Dot Blot 1) versus scFv produit par *flash refolding* (Dot Blot 2)**

Les particules HCV LAT génotype 3 (GT3) et FAN génotype 1a/2a (GT 1a/2a) ont été utilisées comme antigènes. Le sérum humain normal (SHN) est utilisé comme contrôle négatif de l'expérience et une protéine ayant une étiquette polyhistidine comme contrôle positif.

5.4. Conclusion générale sur la production du scFv D32.10

Trois techniques différentes ont été utilisées dans le but de produire la protéine recombinante soluble scFv D32.10. Dans un premier temps, la technique du *flash refolding* nous a permis de valider la fonctionnalité de notre construction sur d'authentique particule virale. Cette technique n'est néanmoins pas adaptée pour la production en grande quantité, élément important pour la mise en échelle industrielle. La seconde approche réalisée via l'expression en système cell-free, nous a démontré que malgré l'addition de nombreux additifs facilitant la formation des ponts disulfures, la protéine restait malgré tout soit insoluble soit sous forme d'agrégats solubles. L'utilisation de la technique d'expression en baculovirus, avec les résultats encourageants obtenus, constitue par contre une avancée importante en vue de la production du scFv D32.10 à grande échelle (fermenteurs, ...). Cette forme sécrétée, une fois produite et purifiée, conserve l'activité anti-HCV de l'anticorps monoclonal original mise en évidence avec celle obtenue par la technique du *flash refolding*. Le travail actuel a apporté des solutions pour faciliter la production du scFv D32.10, il reste maintenant à régler la question de sa concentration (supérieure à 5 mg.mL⁻¹) pour pouvoir mener des études structurales plus poussées, solutions qui serviront de base moléculaire pour le *drug design*.

Troisième partie .

**Infection par HCV des lignées cellulaires
d'insecte**

Chapitre 6

Préparation de lignées cellulaires

Dans le but d'infecter des cellules d'arthropodes par HCV et de reproduire les résultats du Dr Yassine Rechoum (2009) et du Dr Raphaëlle Germi (2002) mais n'ayant pas de lignées de référence pour le moustique *Aedes vexans*, notre premier objectif fut d'en créer une. Du fait des travaux déjà existants, nous avons fait le choix de prendre en référence *Aedes vexans* souche KK (Institut Pasteur, Paris) mais aussi *Aedes aegypti* souche bora bora (Laboratoire d'écologie Alpine, Grenoble). Le protocole utilisé pour développer ces lignées est décrit dans ce chapitre.

6.1. Présentation des arthropodes étudiés

6.1.0.4. *Aedes vexans* (cf Figure 6.1 [A])

Aedes vexans a été pour la première fois décrit par Meigen en 1830. Il est largement présent à travers le monde, notamment en Amérique, en Europe et même dans en région Rhône-Alpes. *Aedes vexans* est un moustique généralement présent dans les vallées jusqu'à l'étage collinéen¹. A l'état naturel, le lieu de ponte se situe à l'interface eau/air ou sur le sol humide et plus généralement dans des prairies inondables, des marais et des fossés [Mondet et al., 2005]. Les premières inondations sont responsables d'une large éclosion de larves. Dans des conditions de laboratoire, *Aedes vexans* pond généralement sur de la mousse humide. *In vivo*, les œufs nécessitent au minimum 7 jours à l'état sec et éclosent dans l'eau au bout de 4 à 15 jours [Fontenille et al., 1998, Mondet et al., 2005]. *Aedes vexans* pique généralement les ruminants et plus rarement l'homme [Yamar et al., 2005]. Néanmoins, il peut devenir exclusivement anthropophile si les conditions environnementales l'y obligent. Sa capacité de vol fait qu'il peut couvrir de longues distances (entre 15 et 17 km suivant les conditions) [Briegel et al., 2001]. De plus, il est responsable de la vectorisation du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ([Turell et al., 2008]. De nos jours, aucune lignée de référence ne figure dans les collections internationales.

6.1.0.5. *Aedes aegypti* (cf Figure 6.1 [B])

Aedes aegypti est un moustique tropical qui est largement répandu au niveau des régions dont la température annuelle est supérieur à 20°C. Cette espèce comporte plusieurs souches (dont Bora-Bora étudiés aux cours de ce travail) entraînant l'existence d'une large diversité biologique aux niveaux morphologiques, physiologiques. Son habitat naturel peut être soit selvatique (forêt vierge équatorial), péri-domestique (pneu, coquille d'escargot) ou domestique (gouttière, pot de fleur). Cette espèce est abondamment présente dans les régions tropicales. Les œufs peuvent rentrer en diapause² si les conditions lui sont défavorables. Au stade larvaire, il existe une vraie compétition inter-espèce qui lui est généralement favorable. Par ailleurs, ses larves peuvent métaboliser certains insecticides à l'aide d'enzymes de détoxification (cytochrome P450)[Strode et al., 2008]. Cette caractéristique confère à ce moustique une résistance aux environnements pollués ou en cours de démoustication. Cependant, l'espèce présente une compétence de vol réduite, limitant ainsi la zone géographique d'action des individus. *Aedes aegypti* est un moustique diurne ayant un pic d'agressivité en fin de journée et étant majoritairement anthropophile pour les femelles. Il est responsable de la vectorisation de nombreuses

1. L'étage collinéen (colline) se situe à moins de 900 m

2. Une diapause est un arrêt temporaire de l'activité ou du développement chez les insectes

arboviroses dont les plus connues sont la Dengue et le Chikungunya. *Aedes aegypti* est le modèle biologique par excellence car une lignée de référence portant le nom de Aag-2 a été établie [Singh, 1967] et son génome est complètement séquencé [Nene et al., 2007].

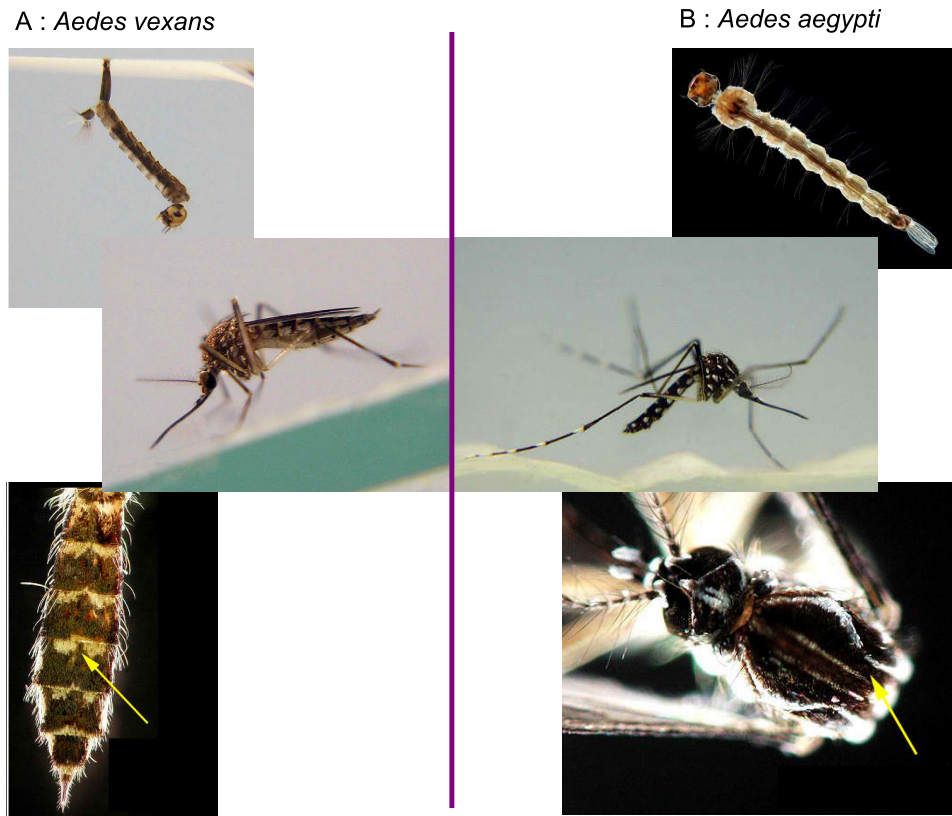


FIGURE 6.1.: Photographie d'*Aedes vexans* et d'*Aedes aegypti* au stade larvaire et adulte. Les flèches jaunes indiquent une des spécificités de chacune des espèces : la présence d'une bande pâle et un V inversé au niveau de l'abdomen pour *Aedes vexans* et la présence d'une lyre pour *Aedes aegypti*

6.2. L'exemple d'*Aedes aegypti*

6.2.1. Matériel et méthodes

6.2.1.1. Mise en culture

L'ensemble des étapes est schématisé sur la figure 6.2 Dans un premier temps, un échantillonnage a été réalisé afin de récupérer des œufs *Aedes aegypti* provenant de la souche Bora Bora. Celle-ci a été gracieusement récoltée au laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA). Des œufs ont été récupérés puis désinfectés avec 2.6% de chlore actif. Afin d'éliminer celui-ci, chaque échantillon a été rincé par deux lavages successifs avec de l'eau distillée autoclavée. Entre chaque lavage, les œufs sont centrifugés 1 minute à température ambiante à 800 rpm. Un dernier lavage est réalisé avec le milieu de culture L-15 Leibovitz (Gibco). Afin de travailler sur un modèle unique, nous avons choisi d'utiliser comme échantillon de base de jeunes larves de moustiques juste écloses (stade 1). L'éclosion a été réalisée dans un tube Falcon contenant du milieu de culture L-15. Quatre types de broyage ont été testés. Ceux-ci sont le broyage avec un broyeur en verre, le broyage entre deux lames de microscopie, le broyage avec un piston de seringue et pour finir la découpe aux ciseaux de dissection qui fut inspiré de la publication

singh et al, 1967 [Singh, 1967]. Les quatre types de broyages ont été testés sur trois tailles de population (10, 50, 100 larves) pour déterminer l'échantillonnage idéal de broyage. Tous les produits issus des broyages ont été mis en culture dans des plaques 48 puits contenant 1 mL de L-15 Leibovitz contenant de 20% Sérum de veau foetal (SVF), 1% pénicilline/streptomycine, 1% L-glutamine. Les produits du broyage ont été filmés et sont disponibles sur le lien <http://www.frekilabs.fr/cfalleck/>.

6.2.1.2. Entretien cellulaire

Les cellules ont été mises en culture durant les deux premières semaines avec du L-15 Leibovitz contenant de 20% Sérum de veau foetal (SVF), 1% pénicilline/streptomycine, 1% L-glutamine. Puis progressivement le pourcentage en SVF a été diminué pour atteindre 10%. L'entretien cellulaire a été réalisé une fois par semaine par ajout de milieu composé de 10% SVF, 1% pénicilline/streptomycine, 1% L-glutamine, L-15. Les cellules ont été repiquées lorsque celles-ci étaient à confluence. Les cellules étant fortement adhérentes, celles-ci ont été décrochées par traitement mécanique (grattage) pour les plaques 24 puits et 6 puits. En ce qui concerne les plaques 48 puits, celles-ci ont été placées au frais pendant 5 minutes afin de diminuer leur adhérence puis, traiter par traitement mécanique.

6.2.1.3. Amplification de la région ITS d'*Aedes aegypti*

Afin de contrôler l'espèce d'origine de la lignée cellulaire, la région ITS a été amplifiée. Pour cela, une extraction d'ADN a été réalisée sur la lignée cellulaire développée, sur un broyat de larves d'*Aedes aegypti* (contrôle positif) et sur une lignée HEK 293 (contrôle négatif) à l'aide du kit Tri-Reagent (Sigma-Aldrich). L'extraction a été réalisée suivant les conditions du fournisseur. Chaque échantillon a été ensuite amplifié à l'aide du kit PHUSION GC master mix (life technology) suivant le protocole suivant :

- Étape de dénaturation : 98°C pendant 30 secondes

(1 cycle)

- Étape de dénaturation : 98°C pendant 5 secondes
- Étape d'hybridation : 56°C pendant 30 secondes
- Étape d'élongation : 72°C pendant 60 secondes

(30 cycles)

- Élongation finale : 72°C pendant 10 minutes

Les amorces utilisées pour l'amplification de la région ITS sont l'amorce 18SFHIN (5'GTA AGC TTC CTT TGT ACA CAC CGC CCG T 3') et l'amorce aeg.r1 (5' TAACGGACACCGTTCTAGGCCCT 3') [Higa et al., 2010].

6.2.1.4. Visualisation cellulaire

Les cellules d'*Aedes aegypti* ont été cultivées sur lame fine (0,17mm) dans deux chambres Lab-Tek. Les cellules ont été fixées à différents moments de la culture avec 2% de Paraformaldehyde (PFA) pendant 20 minutes à 37°C. Après perméabilisation avec du PBS, 0,1% Triton X100 pendant 2 minutes, les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33258 (Sigma). Les observations ont été réalisées avec un microscope optique inversé Olympus IE81, en utilisant le contraste interférentiel (differential interference contrast, DIC) et un filtre DAPI.

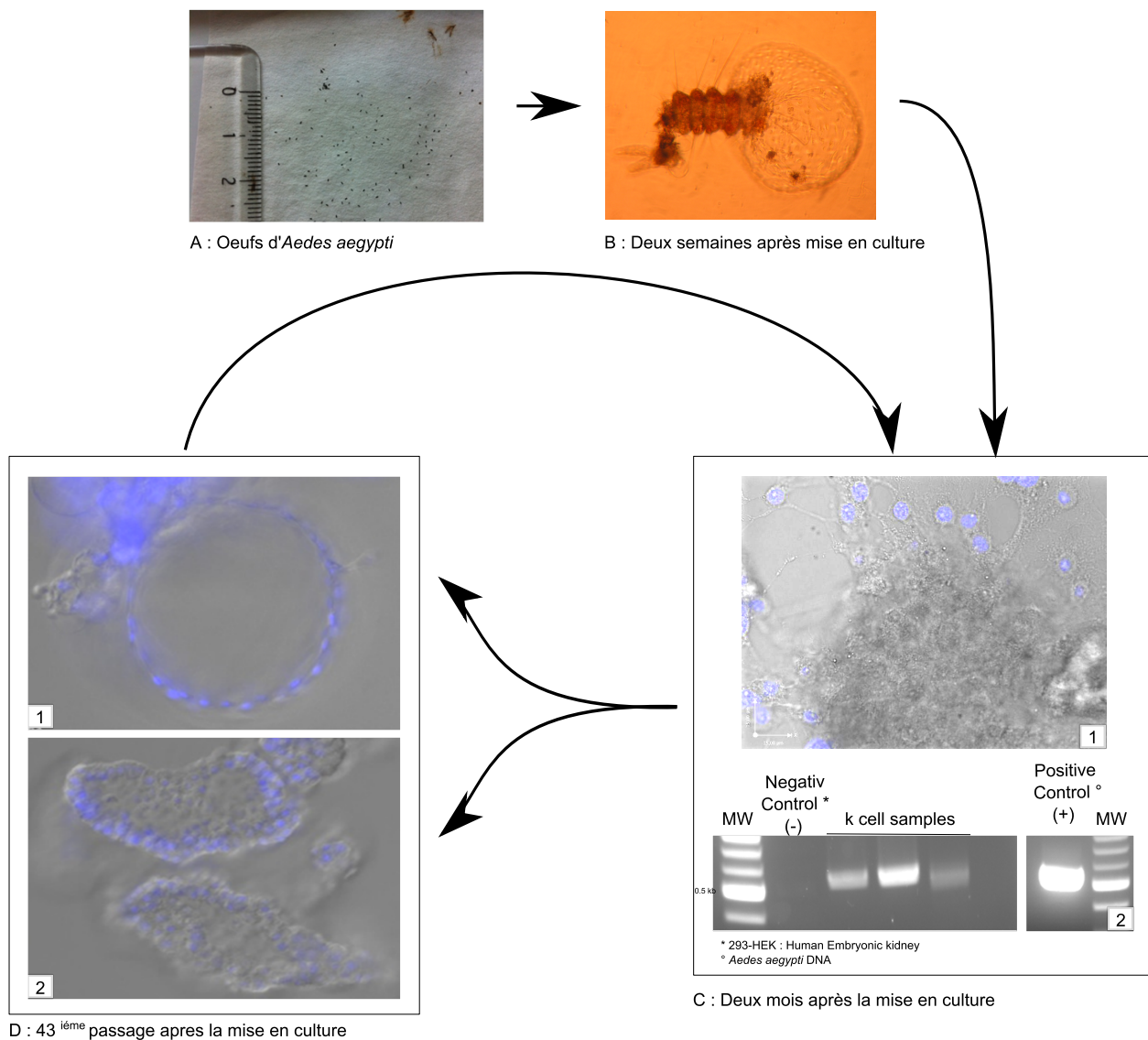


FIGURE 6.2.: **Protocole général pour l'obtention de la lignée Kt-Mos1**

(A) Photo des oeufs d'*Aedes aegypti* récoltés. (B) Développement de vésicules au niveau larvaires. (C) Observation au microscope des cellules adhérentes et identification moléculaire des extraits cellulaires et larvaires par une PCR ciblant l'ADNr ITS : la partie supérieure de l'image montre les cellules en monocouche. La partie inférieure présente les résultats de la PCR d'identification de l'espèce pour différents échantillons cellulaires : les vésicules (ligne 1), les cellules adhérentes (ligne 2) et la structure en dome (ligne 3). Les cellules HEK293 servent de contrôle négatif, le contrôle positif est réalisé avec des extraits de cellules larvaires d'*Aedes aegypti*. La taille amplifiée est d'environ 550 pb. (D) Observation au microscope des vésicules en tant que structures cellulaires.

6.2.2. Résultats

6.2.2.1. Sélection du protocole de mise en culture et contrôle de la lignée

Il s'avère que plus le nombre de larve est grand, plus la contamination des cultures est récurrente. La taille idéale de la population choisie a été de 50 larves. Au bout de deux semaines, des excroissances cellulaires ont été observées aux extrémités des zones de coupures chez la larve pour la condition *ciseaux*. Pour les conditions *broyeur en verre*, broyage entre *deux lames de microscopie*, et broyage avec un *piston de seringue*, les cellules viables étaient peu nombreuses et sont mortes quelques semaines après la mise en culture. En ce qui concerne, le produit de broyage par *ciseaux*, la séparation des ces expansions cellulaires avec le corps de la larve fut réalisée par va-et-vient lors du changement de milieu. En effet, la pression exercée sur ces expansions a permis de les faire éclater en rendant possible l'adhérence des cellules. L'élimination totale des résidus de larves a été réalisée après la réalisation de plusieurs lavages avec du milieu de culture L-15 contenant 10% Sérum de veau foetal (SVF), 1% pénicilline/streptomycine, 1% L-glutamine. Ces cultures furent repiquées dans des plaques de 24 puits 3 mois après le broyage puis dans des plaques 6 puits au bout de 6 mois. La chronologie des événements a été présentée au niveau de la figure 6.2.

6.2.2.2. observation cellulaire

6.2.2.2.a. Observation bidimensionnelle

Dans un premier temps, les cellules cultivées après 43 repiquages étaient visibles comme cellules isolées en monocouche (*cf* Figure 6.3(B)). Durant ce stade, les cellules semblent mononucléaires, avec soit une forme allongée, soit un grand cytoplasme rectangulaire et plat, observable sur la figure 6.3(A). La mitose peut être observée sur certaines cellules et trois paires de chromosomes en cours de séparation du fuseau mitotique peuvent être visualisés sur la figure 6.3(A).

6.2.2.2.b. Observation tridimensionnelle

Les cellules en monocouche tendent à se différencier et des structures supracellulaires apparaissent. En premier lieu, une structure en dome s'élève en partant de la monocouche adhérente. Sur la Figure 6.4(A), la monocouche qui d'environ 50 μm est montrée à deux positions Z différentes. Sur la figure, on voit apparaître un amas de cellules qui recouvre les cellules adhérentes (floues sur la figure), ce qui montre bien l'apparition d'une structure tridimensionnelle. Ces structures cellulaires évoluent avec le temps et tendent à se structurer de plus en plus dans la troisième dimension. Dans la Figure 6.4(B), une structure supracellulaire est observée sur un intervalle en Z de 47 μm avec un pas de 1 μm . L'observation à $Z=0$ montre que les noyaux ne sont visibles qu'à la périphérie de la structure, ce qui suggère un assemblage creux. Une fois de plus l'amas est clairement visible. En utilisant le logiciel de reconstruction 3D Volocity sur la série d'images, l'assemblage de cellule a pu être reconstitué. Dans un souci de clarification, les 10 dernières vues ont été retirées de la reconstruction, ce qui montre une forme de dôme et qui confirme donc l'aspect creux de la structure.

Dans le dernier stade de la différenciation de la structure supracellulaire, des vésicules de taille différente, mais d'un ordre de grandeur de 100 μm se détachent du support. Dans la Figure 6.4(C), ces assemblages cellulaires ressemblant à des *vésicules* avec le contraste interférentiel sont clairement visibles. Cette morphologie est liée au fait que le point a été fait dans la section médiane et il y a donc une contamination de l'image par les cellules situées au dessus et en dessous de cette section. En analysant le contenu ADN (à l'aide du marquage Hoechst) de ces structures vésiculaires, il apparaît évident que la structure est composée d'une monocouche de cellules avec un cavité creuse au centre (Figure 6.4(C)). Si on suppose que la sphère est parfaite, le volume de la structure représentée serait d'environ 4 106 μm^3 .

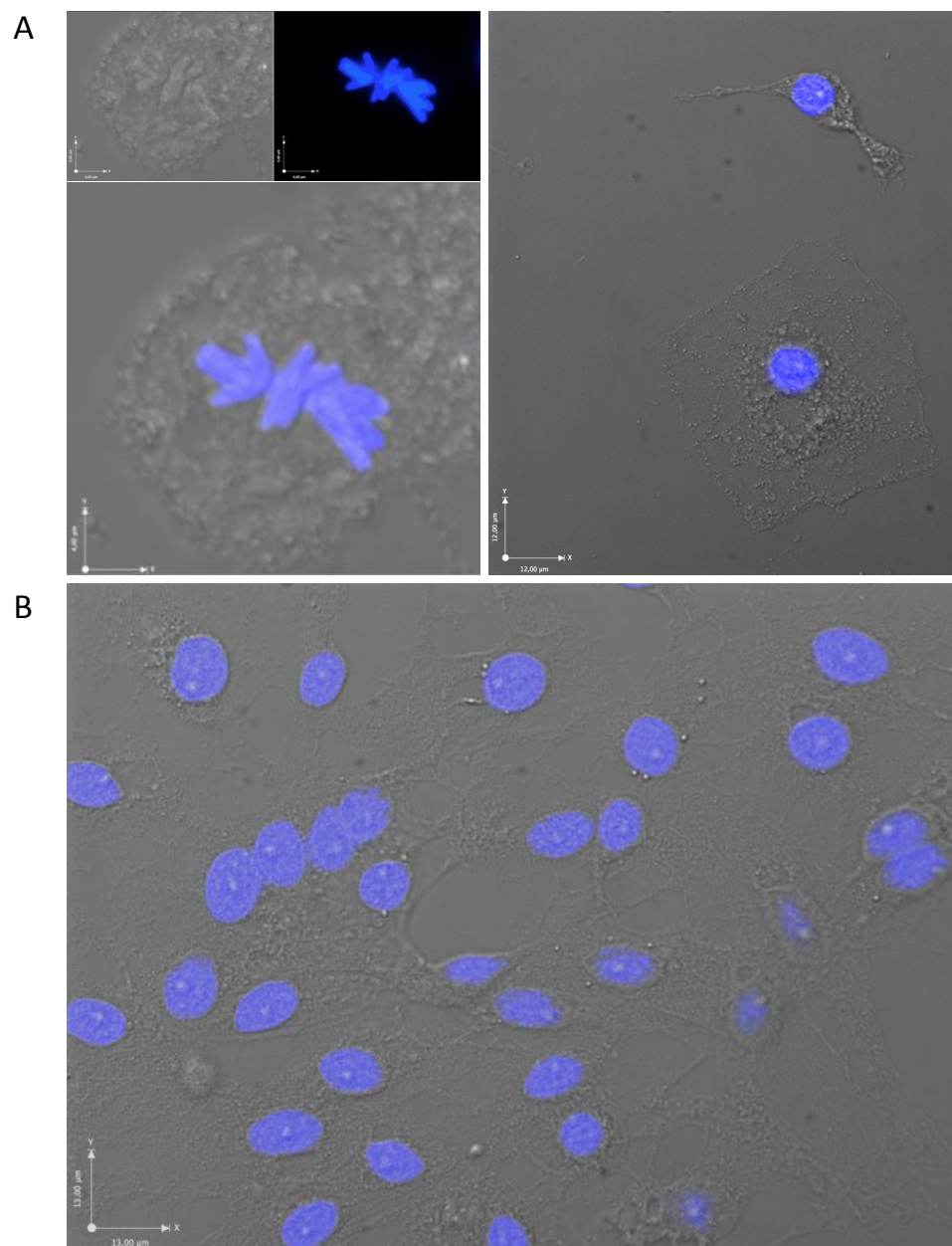


Fig1.pdf

FIGURE 6.3.: Observation des cellules Kt-Mos 1 adhérentes

(A) Cellules isolées cultivées sur plaque de verre observées Hoechst. La partie de gauche montre une cellule en mitose dans la dernière étape de la métaphase. (B) Même observation sur les cellules Kt-Mos1 en monocouche.

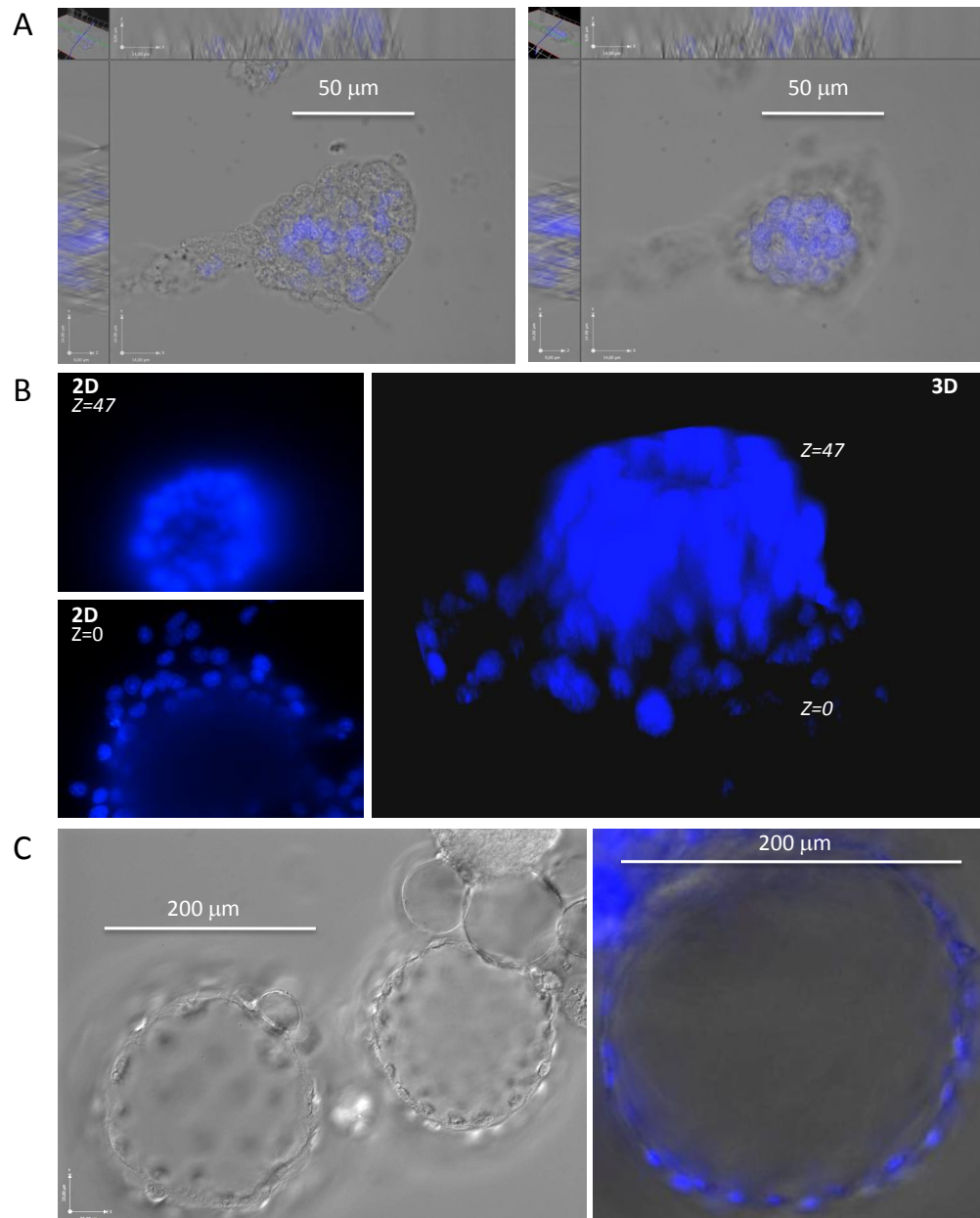


Fig2-1.pdf

FIGURE 6.4.: **Observation des structures cellulaires Kt-Mos1**

(A) Structures cellulaires en cours de formation en vue du dessous (image à gauche) et vue du dessus (image à droite), en utilisant les canaux DIC et Hoechst. (B) Images à différentes hauteurs d'une structure cellulaire bien différenciée, prises avec le canal Hoechst. Les deux positions extrêmes ($Z=0 \mu m$ et $Z=47 \mu m$) sont représentées à droite, et une reconstitution en 3D réalisée avec le logiciel Volocity est représentées à gauche. (C) Structure en "balle de golf" observée au canal DIC (gauche) et une vue en coupe (droite), montrant que ces structures sphériques sont constituées à partir d'une monocouche.

6.3. L'exemple d'*Aedes vexans*

Suite à la validation du protocole pour l'obtention de la lignée d'*Aedes aegypti*, le même protocole a été appliqué aux larves d'*Aedes vexans*. A la différence d'*Aedes aegypti*, les œufs d'*Aedes vexans* sont pondus sur de la mousse et non sur un papier buvard. Cinquante œufs ont donc été triés, désinfectés et mis en eau dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'article. Au terme de cette étape, seulement 10 larves sur les 50 œufs ont éclos dans les premières 24 heures, suivies de 5 autres dans les 48 heures. Les autres œufs n'ont malheureusement jamais éclos. Les 15 larves ont été mises en culture de la même façon que pour *Aedes aegypti*. Néanmoins, le broyat étant en trop faible quantité, la première mise culture fut un échec. En ce qui concerne l'éclosion, le protocole développé grâce à *Aedes aegypti* ne pouvait pas s'adapter au moustique *Aedes vexans* à cause de son faible rendement d'éclosion. Le protocole de celui-ci a donc été modifié. Plusieurs tests d'éclosion ont été réalisés en faisant varier deux paramètres : la température de l'eau et la proportion de CO₂. Quatre conditions ont été testées et les larves ont été récoltées au bout de 24 h et 48 h (cf Figure 6.5). Dans cette expérience, il n'a pas été possible de faire des triplicats à cause d'un nombre d'œufs insuffisant du fait des faibles pontes de la souche KK en captivité .

- Condition 1 : 50 œufs ont été plongés dans de l'eau ambiante.
- Condition 2 : 50 œufs ont été plongés dans de l'eau a 28°C
- Condition 3 : 50 œufs ont été plongés dans de l'eau ambiante enrichi en CO₂
- Condition 4 : 50 œufs ont été plongés dans de l'eau a 28°C enrichi en CO₂

	Condition			
	1	2	3	4
Éclosion après 24 h	12	15	13	18
Éclosion après 48 h	5	10	10	12
Totale	17	27	23	30

FIGURE 6.5.: Bilan des éclosions d'*Aedes vexans* suivant les paramètres de température et de % CO₂.

De ces expériences, nous pouvons conclure que la meilleur condition 4 pour l'éclosion des œufs de *Aedes vexans* en laboratoire est 28°C en présence de CO₂. Afin de conserver le même stade larvaire, les larves ayant éclos dans les premières 24 heures ont été récoltées, broyées et mises en culture suivant le protocole développé pour *Aedes aegypti*. Le broyat a été déposé dans des plaques 48 puits réalisant 3 dilutions au demi pour chacune. Les larves ont été photographiées et filmées (cf Figure 6.6 et [http ://www.frekilabs.fr/ cfalleck/](http://www.frekilabs.fr/cfalleck/) pour visualiser le film). Néanmoins, après deux jours de mise en culture, des contaminations bactériennes se sont déclarées. Du fait que nous n'avons pas pu nous procurer d'autre matériel biologique (œufs) auprès de l'institut Pasteur, nous n'avons pas pu refaire l'expérience dans les conditions définis. Suite aux expériences menées, la mise en culture de cellules d'origine larvaire d'*Aedes vexans* a été améliorée pour le protocole d'éclosion ce qui permet de mettre en culture suivant le protocole développé pour *Aedes aegypti*. Néanmoins, l'hypothèse avancée pour régler de contamination est d'ajouter des antibiotiques large spectre et un antifongique dans l'eau de l'éclosion en plus que ceux déjà présent lors de la phase de mise ne culture .

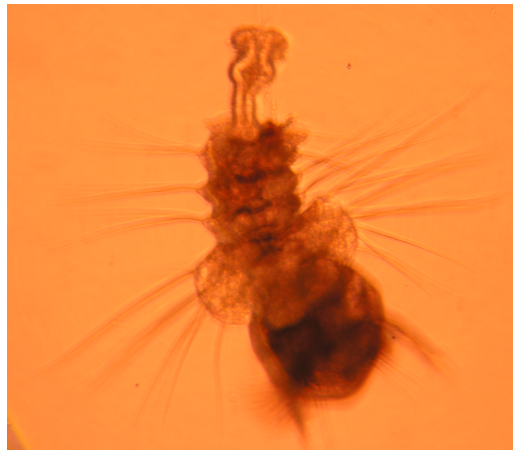


FIGURE 6.6.: Larve d'*Aedes vexans* juste après le broyage.

CONCLUSION

Sur la base de l'article *princeps* [Singh, 1967] et des travaux du Dr Fouque, nous avons développé un protocole permettant d'obtenir une nouvelle lignée d'*Aedes aegypti* d'origine larvaire. Cette lignée présente des expansions vésiculaires uniques (*hollow vesicles*) qui lui confèrent un phénotype particulier. Le même protocole a été utilisé pour développer une lignée cellulaire à partir d'*Aedes vexans*. En premier lieu, nous avons dû résoudre des problèmes liés aux conditions d'éclosion des œufs. Nous avons ainsi défini la nécessité pour *Aedes vexans* de travailler à 28°C en présence de CO₂. Étant donné la durée d'éclosion beaucoup plus longue (24-48 H) que celle d'*Aedes aegypti* (15 minutes), il apparaît également impératif d'ajouter des antibiotiques/antifongiques à l'eau lors de l'éclosion. Ce travail fait l'objet d'une publication qui sera soumise au journal *Medical and Veterinary Entomology* (cf Annexe A)

Chapitre 7

Développement d'outils biomoléculaires pour la détection du génome du HCV

A cause du taux élevé d'erreur de l'ARN-polymérase ARN-dépendante (10^4 à 10^5 par nucléotide copié), la réplication virale est responsable d'un nombre important de mutations. Afin de détecter ces mutations synonymes de réplication du HCV chez l'hôte, il a fallu dans un premier temps développer des protocoles d'extraction, de transcription reverse (RT) et d'amplification robuste de HCV. Étant donné la variabilité du génome entier et afin d'avoir une large vision des mutations, nous avons fait le choix de développer une amplification du génome entier et pan-génotypique. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Sylvie Larrat et Elodie Santoni (CHU de Grenoble).

7.1. Présentation du problème

Le génome de HCV est composé d'une molécule ARN simple de polarité positive long de 9600 bases, ce qui est de nos jours une taille amplifiable grâce à la nouvelle technologie dite *Long Range* (amplification de génome long). Cet ARN viral possède des caractéristiques particulières :

- **conservation et hypervariabilité** : le 5'UTR et le 3'UTR sont deux régions possédant environ 80% d'homologie inter-génotypique contrastant avec la région codante du virus (*cf* Figure 7.1). En effet, des régions comme E2-P7NS2 sont décrites comme des régions hypervariables. Cette grande diversité rend difficile la création d'amorces pan-génotypiques mais aussi inter-sous-génotypiques.

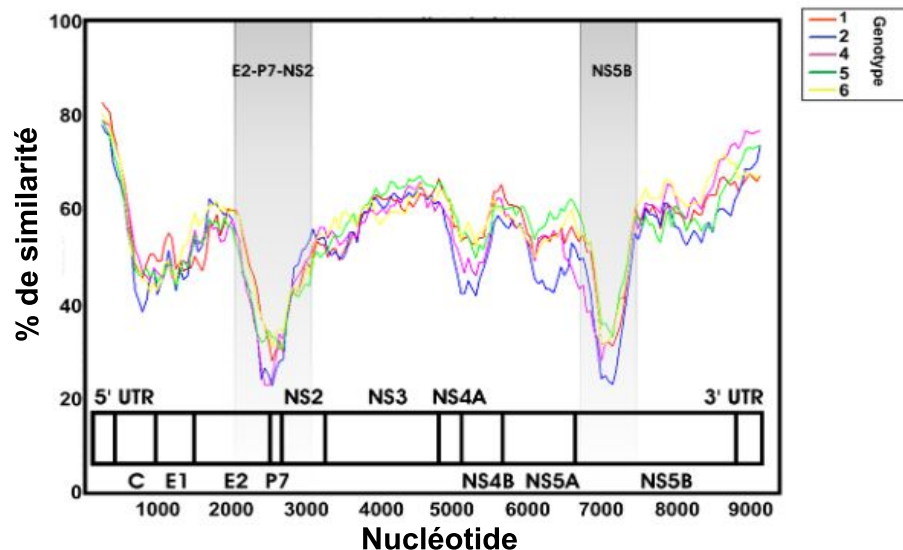


FIGURE 7.1.: Similarité entre une séquence génomique de HCV génotype 3 et d'autres génotypes [Magiorkinis et al., 2009].

- **séquence polyU/UC dans la région 3'UTR** : la région 3'UTR est divisée en trois parties : une première variable suivant les génotypes qui est nommée 3'var, suivie d'une région poly U/UC de longueur variable et d'une région 3'X très conservée de 98 nucléotides composée de tiges-boucles. Dans le but d'amplifier le génome entier, des équipes de recherche ont ciblé la région poly U/UC qui est conservée entre les génotypes. Pour cela, nous avons conçue une amorce complémentaire composée de 20 AA nommée da20 [Zhang et al., 2013].
- **structures secondaires et zones riches en guanosine et cytosine (GC)** : le génome viral possède certaines structures secondaires au niveau de l'IRES, du gène de la capsid, NS5B et 3'X. Par ailleurs, même si la proportion moyenne en GC du HCV est normale, certaines régions sont riches en GC.

Tous ces éléments peuvent être des perturbateurs de l'amplification lors de la transcription inverse et de la PCR. Des enzymes, des additifs et de haute température peuvent être utilisés afin de pallier ceux-ci.

7.2. Matériels et méthodes

7.2.1. Échantillons, extraction ARN viral et transcription inverse

Afin de fournir le matériel de départ, 17 plasmas provenant de 12 patients souffrant d'une infection chronique HCV (génotype 1b) ont été sélectionnés en fonction de deux critères :

- le volume : 1 mL de volume minimal nécessaire pour l'extraction
- la charge virale : afin de limiter l'effet de seuil de détection, les échantillons devaient avoir une charge supérieure à 5 log UI/mL.

L'extraction d'ARN à partir des plasmas collectés a été réalisée avec la technique automatisée EasyMAG (Biomérieux). Afin d'éliminer l'ADN humain présent dans les prélèvements, chacun des échantillons a été traité à la TURBO DNase Ambion (2 U/ μ L) qui est ensuite inactivé suivant le protocole décrit par Life Technologies. Ces extraits ont subi une transcription inverse afin de produire un ADN complémentaire. Pour cela, deux enzymes de transcription inverse (RT) ont été évaluées : la Superscript III (SSIII) (Life Technologies) et la Prime Script Reverse Transcriptase (Ozyme). Les amorces HUTLA2 et da20, spécifiques de la région 3'UTR, ont été utilisées (*cf* Figure 7.2).

Les protocoles suivants ont été utilisés :

- Pour la Superscript III, le mélange réactionnel comprenait 200U de SSIII, 100 mM de DTT, 25mM de MgCl₂, 10 μ g/ μ L de T4gene (additif protéique stabilisateur de l'ADN simple brin) et de 40U de RNaseOUT. La RT a été réalisée à 50°C pendant 50 min suivie d'une étape d'inactivation de 5 min à 85°C.
- Pour la Prime Script Reverse Transcriptase, le mélange comprenait 200U d'enzyme en présence de T4gene (10 μ g/ μ L) et de 40U de RNaseOUT. La réaction a été effectuée à 42°C pendant 50 min, puis pendant 15 min à 70°C pour l'inactivation.

Afin de contrôler l'intégrité du cDNA obtenu, des PCR sur des petites régions couvrant l'ensemble du génome du HCV ont été réalisées en utilisant la polymérase phusion (life technologie) et la GXL PrimeStar (Ozyme) en suivant les protocoles proposés par les fournisseurs. Plusieurs couples d'amorces ont été utilisés. Ceux-ci sont détaillés pour chaque condition au niveau des résultats dans le tableau (*cf* Figure 7.2). Les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1% (TBE 1/10ème) dans lequel a été incorporé du GelRed (Biotium). Après migration (150V pendant 1h), les échantillons positifs ont été utilisés pour être amplifiés par le système *Long Range*.

7.2.2. Amplification longue : PCR *Long Range* (LR-PCR)

Neuf enzymes différentes permettant l'amplification de longs brins d'ADN ont été testées : la Phusion (Life Technologies), la Q5 (New England Biolabs), la Platinum, l'Accuprime (Life Technologies), la Takara LA Taq, la GXL Prime Star (Ozyme), l'Expand Long Range (Roche), la KOD Hot Start (Merck) et la KAPA long range (Kapa biosystems). Chaque mélange réactionnel ainsi que les protocoles d'amplification ont été réalisés en suivant les recommandations des différents fabricants. Toutes ces enzymes ont été sélectionnées pour leur capacité de réplication haute fidélité (avec un faible taux d'erreur) et pour leur fonction *Hot start* permettant leur activation à haute température. Des amorces ont été sélectionnées en fonction de différents paramètres : leur séquence, la proportion en GC et les températures d'hybridation des couples d'amorces et de l'amplicon désirés. Du fait de la présence de structures secondaires et de régions riches en GC, des additifs comme le DMSO (2%), la BSA (bovine serum albumin) et le T4gene (10 μ g/ μ L) facilitant l'amplification de matrices difficiles ont également été testés. L'obtention des produits de PCR a été vérifiée sur gel d'agarose 0.5% (TBE 1/10^{ème}) dans lequel a été incorporé du GelRed (Biotium).

Nom	Séquence 5' -> 3'	Sens	Région	Position*	Tm (°C)
2ch	GGAAGTACTGTCTTCACGCAGAA	Forward	5'UTR	53-73	59,4
UNI40	ACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT	Forward	5'UTR	57-86	71,5
UNI49	ACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGT	Forward	5'UTR	66-95	73,8
5NC1	GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT	Forward	5'UTR	68-91	66,1
5NC3	GCCATGGCGTTAGTATGAGT	Forward	5'UTR	82-101	57,3
5NC2	CTCGCAAGCACCTATCAGGCAGT	Reverse	5'UTR	288-311	66,1
RT946-3	GCAGTCGTTTCGTGACATG	Reverse	Capside	945-962	55,3
Mars F3	ACSGCRGCRGTGYGGGACAT	Forward	NS3	3309-3328	64,5
3df	ACAAGAAACCAGGTGAGGG	Forward	NS3	3493-3511	59,9
RT3502	CCCTCGACCTGGTCTTGT	Reverse	NS3	3493-3511	58,5
Mars R2	GTGCTCTTRCCGCTRCCRGT	Reverse	NS3	4035-4054	62,4
RT4485	GGGATGGCTTTGCCATAG	Reverse	NS3	4466-4483	57,5
NS3G1F1_M13F	GTAAAACGACGGCCAGCTBCTSGGRCRCCGAT	Forward	NS3		>75
4cf	CTATGGCAAAGCCATCCC	Forward	NS3	4466-4483	57,5
For4884	GTCCTSTGTGAGTGCTATGACGC	Forward	NS3	4884-4909	60,7
For4893	TGTGAGTGCTATGACGCRGGCTGTGC	Forward	NS3	4893-4909	72,9
4e-f	CATCGTGGGATCAAATGTGG	Forward	NS3	5146-5165	60,5
Rev5295	GTGCTMGTGACGACCTCCAGGTC	Reverse	NS3	5295-5317	65,2
Rev5299	GTGCTMGTGACGACCTCCA	Reverse	NS3	5299-5317	57,5
RT5884	GCACCTCCCAAGGCCTAT	Reverse	NS4B	5865-5883	59,9
5e-f	CACCTGCCATGTGGAGC	Forward	NS5A	6422-6439	62,1
RT6550	TCACGTAGTGGAAATCCCCACCC	Reverse	NS5A	6625-6648	69,5
RT7343	CCGTGGAGGTGGTATTGG	Reverse	NS5A	7308-7325	58,1
HC3	TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC	Forward	NS5B	8256-8279	60,6
HUTLA2	GGGCCGGGCATGAGACACGCTGTGATAAATGTC	Reverse	NS5B	9276-9308	79,9
NA2	CGCGCATGMGACASGCTGTGA	Reverse	NS5B	9284-9304	64,7
7e-r	GGGGAGCAGGTAGATGCCTA	Reverse	NS5B	9351-9369	60
dA20	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	reverse	3'UTR	9418-9438	36,8

*Position sur la souche de référence 1a-H77-AF009606

FIGURE 7.2.: Bilan des amorces utilisées pour la mise en place de la transcription inverse et de l'amplification du HCV

Pour chaque amorce, la séquence, la position et la température d'hybridation sont indiquées

7.3. Résultats

7.3.1. Première approche : transcription inverse utilisant la SSIII avec l'amorce HUTLA2

7.3.1.1. Contrôle qualité de la transcription inverse (RT)

Afin de contrôler la qualité de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par transcription reverse avec l'amorce HUTLA2, des PCR utilisant l'enzyme Phusion et ciblant les régions 5'UTR, NS3, NS5a, NS5b et 3'UTR ont été réalisées. Les produits PCR ont été déposés sur gel pour être analysés (*cf* Figure 7.3). Sur celui-ci, on observe que les cinq régions ont été largement amplifiées, prouvant ainsi que le DNAc produit est de qualité. Cependant, le gel montre également que la RT a rétro-transcrit l'ARN jusqu'à la partie 5'. L'ARN viral a donc été reverse transcrit dans sa totalité. Les produits issus de la RT ont été utilisés afin de tester différentes enzymes Long range pour amplifier un hémigénome.

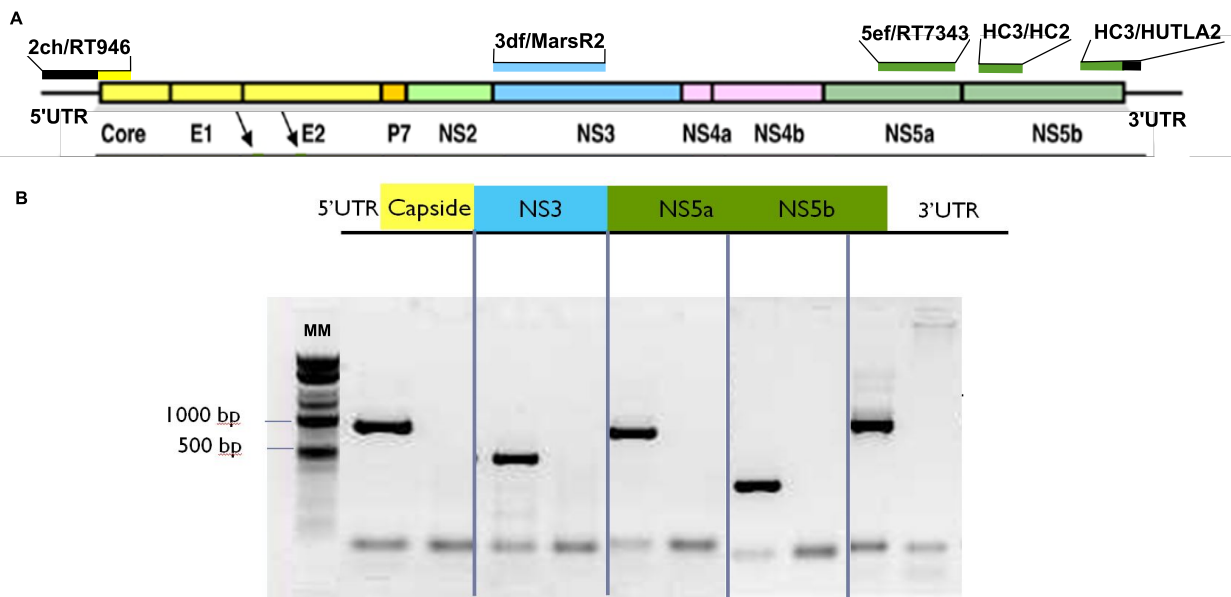


FIGURE 7.3.: Contrôle qualité de la transcription inverse réalisée avec la SSIII et l'amorce HUTLA2 : PCR tout au long du génome

(A) Représentation du génome du HCV sur lequel les amorces utilisées pour réaliser les PCR ont été indiquées. (B) Gel d'agarose (1%) des produits PCR issus de la transcription reverse avec l'amorce HUTLA2 et l'enzyme SSIII

7.3.1.2. Test des différentes enzymes *Long Range*

Afin de trouver la meilleure enzyme permettant de réaliser une PCR dite *Long Range*, les enzymes Q5, KAPA, KOD et l'Expand Long Range ont été testées avec un même couple d'amorce (4ef/HUTLA2) pouvant amplifier la moitié du génome. Les produits PCR ont été déposés sur gel pour être analysés (*cf* Figure 7.4).

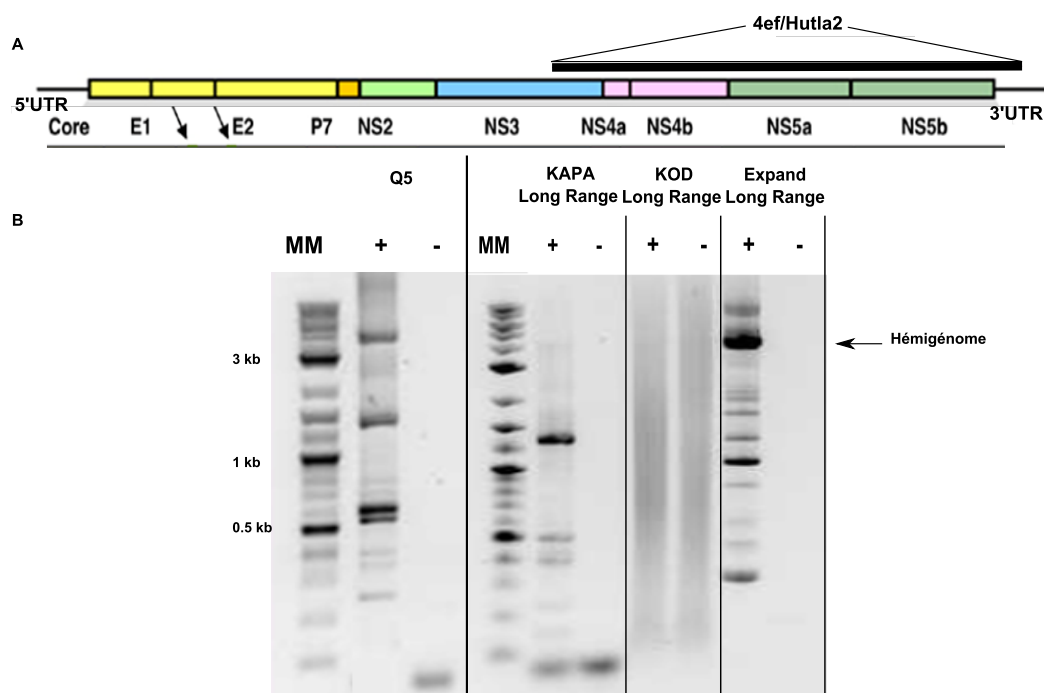


FIGURE 7.4.: **Test des différentes enzymes afin d'amplifier l'hémigénome 4ef/HUTLA2**

(A) Représentation du génome du HCV sur lequel l'amorce utilisée pour réaliser les PCR a été indiquée. (B) Gel d'agarose (1%) du produit PCR_{4ef/HUTLA2} issu de la transcription reverse avec l'amorce HUTLA2 et l'enzyme SSIII

De ces quatre expériences de PCR, deux seulement montrent une amplification d'un hémigénome avec un amplicon aux alentours de 4100 pb. Néanmoins, la bande utilisant l'enzyme Q5 est faible ce qui peut être expliqué par le fait qu'elle n'est pas vraiment une *Long Range* mais plutôt une enzyme pouvant amplifier au maximum un amplicon de 8000 pb. L'autre enzyme ayant amplifiée un hémigénome est l'*Expand Long Range*. Au vu de ces résultats, cette enzyme semblerait être la plus adaptée des enzymes utilisées pour amplifier l'hémigénome. Toujours dans le but d'améliorer l'amplification, des additifs connus pour aider l'amplification des génomes riches en GC ont été testés. Cette amélioration n'a été réalisée qu'avec l'enzyme ayant montré une amplification positive de l'hémigénome, c'est-à-dire l'*Expand Long Range*.

7.3.1.3. Test des additifs

Du fait, de la présence de structures secondaires et de certaines zones riches en GC, des additifs peuvent être ajoutés au mélange réactionnel des PCR. Dans ce cas précis, les additifs sélectionnés sont le DMSO, le T4 gene et la BSA. Deux couples d'amorces différentes ont été choisis afin d'amplifier un hémigénome et une bande plus petite qui servira de contrôle positif. Ces PCR ont été réalisées avec l'enzyme *Expand Long Range* et les amorces 4ef/HUTLA2 permettant d'amplifier un hémigénome et HC3/HUTLA2 en contrôle positif. Les produits PCR ont été déposés sur gel pour être analysés (cf Figure 7.5). Pour les trois additifs, l'amplification du petit amplicon démontre que l'amplification du génome est positive. Néanmoins, celle-ci n'est ni améliorée ni perturbée par les additifs. Par contre, il n'y a aucune amplification de l'hémigénome pour les trois additifs. Étant donné ces résultats, aucun additif ne sera ajouté à la *Expand Long Range*.

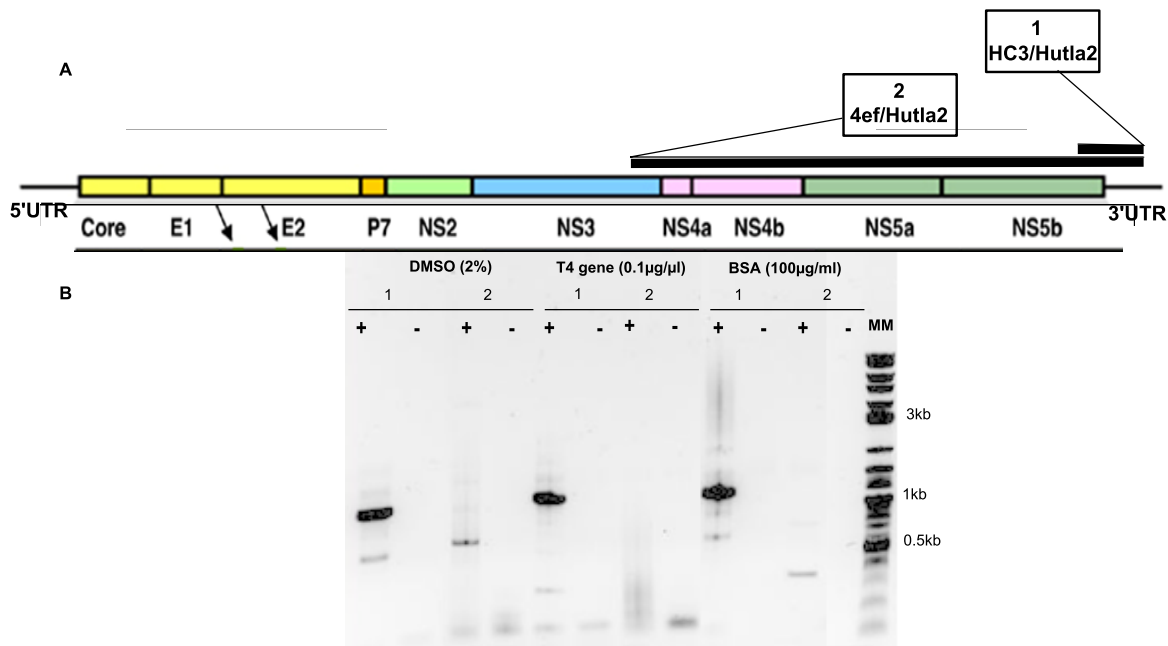


FIGURE 7.5.: Test des différents additifs afin d'amplifier l'hémigénome 4ef/HUTLA2 et la région région 3'UTR

(A) Représentation du génome du HCV sur lequel les amorces utilisées pour réaliser les PCR ont été indiquées. (B) Gel d'agarose (1%) des produits PCR_{4ef/HUTLA2} et _{HC3/HUTLA2} issus de la transcription reverse avec l'amorce HUTLA2 et l'enzyme SSIII

7.3.1.4. Test d'amplification longue

Afin d'amplifier des amplicons de plus en plus longs, de nombreuses PCR amplifiant des hémigénomes ou des génomes entiers ont été réalisées en utilisant l'*Expand Long Range*. Pour cela, diverses amorces ont été utilisées avec des températures d'hybridation et des temps d'élongation différents. L'ensemble des gels ne sera pas présenté dans ce manuscrit. Le bilan des PCR testées sera résumé sur la figure 7.6. Grâce à ces nombreux essais, on pu remarqué que de toutes les PCR réalisées aucune au delà de l'amorce 4ef n'était positive.

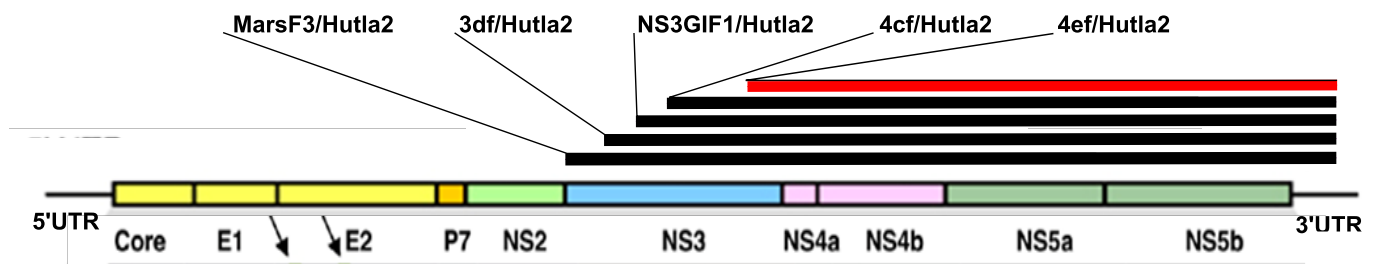


FIGURE 7.6.: Bilan des PCR testées afin d'amplifier un hémigénome

Chaque amplicon et les amorces qui lui sont propres ont été modélisés au niveau du génome entier du HCV. La PCR positive a été indiquée en rouge et les autres négatives en noires.

À partir de ces expériences, deux conclusions se sont imposées :

- La région NS3 post-4ef semble être difficile à synthétiser pour l'enzyme *Expand Long Range*. Afin de déterminer si la présence de structures secondaires était un élément limitant de l'amplification longue, des petites PCR intra-NS3 ont été réalisées et une étude des structures secondaires présentes via l'algorithme Mfold a été effectuée.
- La question de la qualité et de la quantité de l'ADN complémentaire produit a également été soulevée. Afin de tester d'autres conditions, nous avons été choisis de réaliser la *reverse transcription* avec une amorce polyA complémentaire de la région 3'poly U/UC, région pan-génotypique et de comparer l'activité de l'enzyme superscript III par rapport à l'enzyme Prime Script.

7.3.2. Étude de l'impact de la région codant pour NS3 sur l'amplification

7.3.2.1. Test d'amplification de la région codant pour NS3

Afin de déterminer si la région codant pour NS3 est un problème lors de l'amplification longue, deux amplifications intra NS3 ont été réalisées avec les couples 4cf/RT5884 et FOR4493/RT5584. Les produits PCR ont été déposés sur gel pour être analysés en présence d'un contrôle positif. Le gel montre que les amplifications intra NS3 sont positives (cf Figure 7.7). Cela démontre que l'enzyme *Expand Long Range* est capable de fonctionner dans cette région. Par ailleurs, l'analyse via Mfold indique que la présence de nombreuses structures secondaires sont éliminées par l'élévation de la température. De cette expérience, il a été conclu que la région codant pour NS3 n'est pas un problème pour de petits fragments. Néanmoins, l'absence d'amplification longue pourrait être expliquée par le décrochement de l'enzyme ayant déjà amplifiée 4000 paires de bases. Par l'analyse des structures secondaires, il a été démontré qu'une température supérieure à 90°C permettrait d'éliminer une grande majorité de celles-ci. Il convient donc d'utiliser des enzymes d'amplification ayant une température de dénaturation élevée. Cependant la majorité des *Long Range* testées jusqu'à présent possèdent une température de dénaturation de 94°C. Il a donc été décidé d'étudier d'autres enzymes *Long Range*.

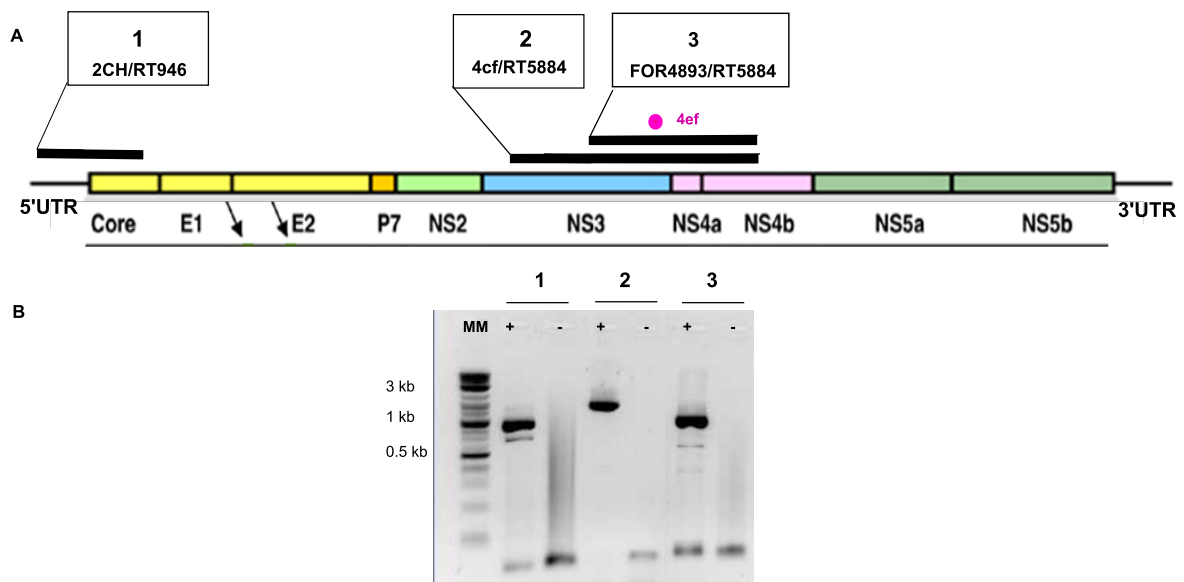


FIGURE 7.7.: Test des différentes enzymes afin d'amplifier la région codant pour NS3

(A) Représentation du génome du HCV sur lequel les amorces utilisées pour réaliser les PCR ont été indiquées. (B) Gel d'agarose (1%) des produits PCR 4cf/RT5884 FOR4485/RT5584 2CH/RT946 issus de la transcription reverse avec l'amorce HUTLA2 et l'enzyme SSIII

7.3.3. Étude de protocoles et d'amorces alternatifs

Afin de tester et de comparer un autre protocole de transcription inverse, deux enzymes ont été testées. Dans le but de contrôler la qualité de l'ADN complémentaire obtenu par transcription inverse avec l'amorce dA20 et de comparer les deux enzymes utilisées (SSIII et Prime Script), des PCR ciblant les régions 5' UTR, NS3 et NS5b ont été réalisées. Les produits PCR ont été déposés sur gel pour être analysés (*cf* Figure 7.8 [B]). Pour les deux enzymes, les trois régions ont été amplifiées prouvant ainsi que l'ADN complémentaire produit est de bonne qualité. On remarque aussi que le génome entier a été retro transcrit du fait de la présence d'un produit d'amplification de la région 5'UTR qui est la région finale de la transcription reverse. Néanmoins, les produits d'amplification sont beaucoup plus importants pour les trois zones ciblées pour l'enzyme Prime Script par rapport à la SSIII. Au vue de ce résultat, nous avons choisi de continuer avec celle-ci.

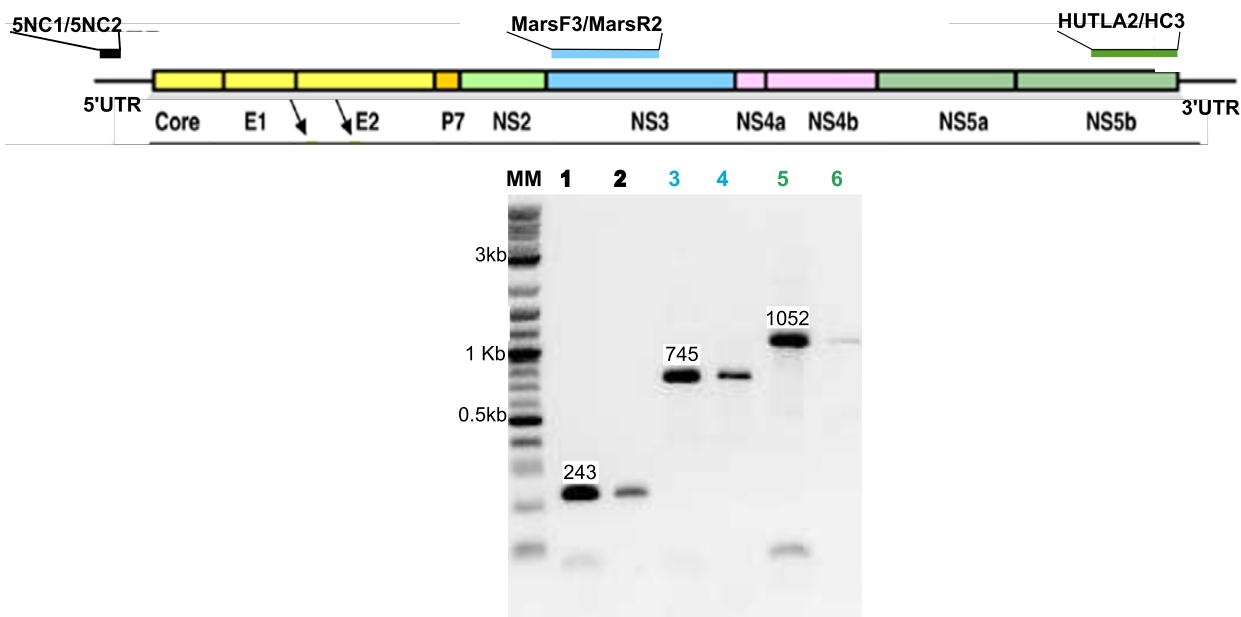


FIGURE 7.8.: Comparaison des amplifications obtenues avec la SSIII (puits 2, 4, 6) et la Prime Script (puits 1, 3, 5)

Les fragments 5NC1/5NC2 (243 pb) (puits 1 et 2), MarsF3/MarsR2 (745 pb) (3-4) et HUTLA2/HC3 (1052 pb) (5-6) ont été amplifiés à partir du produit de RT obtenu pour le patient Fp6218

7.3.4. Tests d'amplification longue

Pour réaliser des amplifications longues, 4 autres enzymes, la *Platinum*, l'*Accuprime*, la *Takara LA Taq* et la *GXL Prime Star* (Ozyme) possédant des températures de dénaturation de 98°C ont été testées. De nombreux tests avec des températures différentes d'élongation et des tampons différents ont été réalisés. De toutes ces expériences, seulement une a donné un résultat positif sur l'amplification d'un génome long, celle avec l'enzyme *GXL Prime Star*. Afin de contrôler la nature de la bande de 9kb obtenue en utilisant la *GXL Prime Star* une PCR ciblant NS5B, a été réalisée, à la fois à partir du produit de PCR Long Range directement et en partant de la bande d'ADN purifiée à partir du gel d'agarose. Le produit de PCR a ensuite été séquencé d'après la technique Sanger. Les résultats obtenus, comparés à ceux du patient source réalisé en routine pour sa prise en charge thérapeutique, montrent une similarité de séquence supérieure à 99% attestant que la bande obtenue correspond bien à la souche HCV présente chez le patient

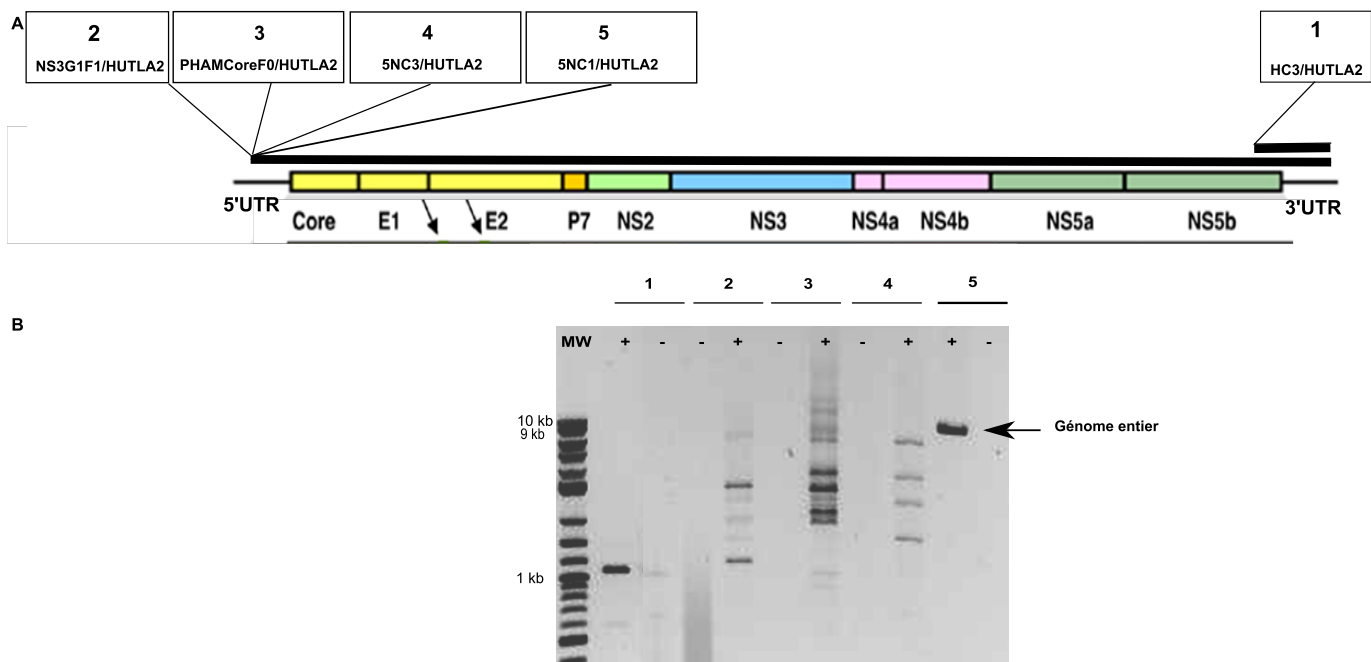


FIGURE 7.9.: Test des différentes amorces afin d'amplifier le génome entier du HCV

(A) Représentation du génome du HCV sur lequel les amorces utilisées pour réaliser les PCR ont été indiquées. (B) Gel d'agarose (1%) des produits PCR NS3G1F/HUTLA2, PHAMcoreFo/HUTLA2, 5NC3/HUTLA2, 5NC1/HUTLA2 et HC3/HUTLA2 issus de la transcription inverse avec l'amorce da20 et l'enzyme Prime script

CONCLUSION

Le travail de biologie moléculaire réalisé sur ce projet a permis de mettre en évidence que la transcription inverse du génome complet du virus de l'hépatite C était possible par deux enzymes testées, à savoir la SSIII et la Prime Script. Néanmoins, il a été démontré que l'enzyme Prime Script avec l'amorce da 20 était plus efficace que la SSIII. Nous avons réussi à amplifier la totalité du génome HCV à partir d'échantillon de sérum de patients et défini un protocole final (*cf* Figure 7.10). Cette amplification longue est possible grâce au couple d'amorce 5NC1/HUTLA2 et de l'enzyme GXL. Par ailleurs, un test de séquençage haut débit a pu être effectué au CHU de Grenoble (*cf* Annexe B). Les résultats obtenus, comparés à ceux du patient source montrent une similarité de 99%, attestant que la bande obtenue correspond effectivement à la souche HCV présente chez le patient. Ces résultats démontrent que le protocole du génome complet mis au point est robuste. Il peut maintenant être utilisé sur des échantillons provenant d'expériences d'infections *in vitro* dans le but de détecter les mutations dues à la réplication virale, mais également des échantillons d'origine hospitalière (dépistage, génotypage,...).

A Transcription inverse de l'ARN du HCV

KIT		PrimeScript Reverse™ Transcriptase	
Composants		Pour une réaction	
pour 8 µL d'ARN		vol (µL)	
Primers GSP à 2 µM		1	
dNTP 10 mM		1	
ARN		8	
Total		10	

Incuber 5 min à 65°C puis placer rapidement les tubes dans la glace au minimum 1 minute

Composants		vol (µL)	
5X PrimeScript Buffer		4	
RNaseOUT (40 U/µl)		1	
T4gene (10µg/µL -> 0,1µg/µL)		0,2	
Rnase free dH2O		3,8	
PrimeScript Reverse™ Transcriptase		1	
Total		10	

PROGRAMME		
Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
42°	50 min	1 cycle
70°	15min	
4°	infini	

B Long range (LR-PCR) du HCV

KIT		PrimeStar GXL DNA Polymerase (Ozyme)	
Composants		Pour une réaction	
Pour 2 µl de cDNA		vol (µL)	
H2O (Nuclease Free)		10,8	
5x PrimeStar GXL Buffer		4	
2,5 mM dNTPs -> 0,2 mM		1,6	
primer 10 µM -> 0,3 µM		0,6	
primer 10 µM -> 0,3 µM		0,6	
PrimeStar GXL (1,25U/µL -> 1,25U/50µL)		0,4	
Total		18	

PROGRAMME		
Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
98°	10s	45 cycles
68°	9min25s	
4°	infini	

PCR.pdf

FIGURE 7.10.: Protocole mis au point afin de réaliser une reverse transcription et une amplification longue du HCV

(A) Protocole et programme de la reverse transcription utilisant l'amorce dA20 pour réaliser une reverse transcription du génome entier du HCV. Les volumes indiqués sont ceux d'une seule réaction de RT. (B) Protocole et programme de la Long range PCR. Les volumes indiqués sont ceux d'une seule réaction PCR

Chapitre 8

Infection de cellules d'insecte par HCV

Tous les outils précédemment développés ont été utilisés afin de répondre à la question principale de mon travail de thèse : la lignée de référence C6/36 (*Aedes albopictus*) et celle développée en laboratoire, les Kt-Mos1 (*Aedes aegypti*), sont-elles permissives au HCV et existe-t-il une réplication du HCV chez celles-ci ? Avant d'infecter ces cellules, il a fallu dans un premier temps mettre en place un protocole fonctionnel d'infection par HCV de lignée cellulaire. Afin de valider le protocole qui sera utilisé en laboratoire P3, un travail préliminaire sur des cellules hépatocytaires nommées HepaRG® a été réalisé comme contrôle positif de l'expérience. Ces cellules ont été décrites comme pouvant établir un cycle viral complet du HCV. Une fois validé, le protocole a été appliqué sur les deux lignées cellulaires C6/36 et Kt-Mos1. La mise en place de l'expérience et les résultats sont développés dans ce chapitre.

8.1. Préambule

8.1.1. Réglementation et nécessités

De manière générale, un agent biologique (virus, bactérie, champignon, protozoaire, ver,...) est considéré comme pathogène si, d'une quelconque manière, il présente une aptitude à provoquer une maladie chez d'autres organismes, les animaux ou l'Homme. Les agents biologiques sont ainsi classés en quatre groupes en fonction de l'importance du risque d'infection qu'ils présentent :

- le groupe 1 comprend les agents biologiques non susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme,
- le groupe 2 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie chez l'homme ; leur propagation dans la collectivité est peu probable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace,
- le groupe 3 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace,
- le groupe 4 comprend les agents biologiques qui provoquent des maladies graves chez l'homme ; le risque de leur propagation dans la collectivité est élevé, il n'existe généralement ni prophylaxie ni traitement efficace.

Tout employeur a l'obligation d'assurer la sécurité de ses salariés. Il doit donc anticiper et évaluer les risques auxquels peut être exposé son personnel, notamment les risques biologiques. Le cadre réglementaire de la prévention des risques liés aux agents biologiques est semblable à celui de tout autre risque. Il a été défini lors de la parution de l'arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en oeuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, (...) où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes [Arrêté du 16 juillet, 2007].

Le virus de l'hépatite C est un virus de classe 3. Celui-ci ne peut donc être manipulé que dans un laboratoire particulier de type P3 dont très peu de laboratoires sont équipés. Le CHU de Grenoble possède ce type d'installation hautement spécialisé. Pour accéder à ce laboratoire P3, il a fallu dans

un premier temps présenter le projet à la responsable scientifique, le Dr Christine Morel-Baccard. Une phase de formation aux bonnes pratiques ainsi qu'une formation théorique ont ensuite été effectuées pour obtenir l'accréditation nécessaire. Ces formations ont été réalisées au CHU sous la direction de Laurence Grossi et du Docteur Max Maurin. Le P3 du CHU de Grenoble est un nouveau P3 dit P3 sec. C'est un laboratoire où les déchets liquides ne sont pas autorisés du fait de l'incapacité de retraitement de ceux-ci. Afin de les limiter, il a été choisi de ne pas mettre d'eau dans les incubateurs et de réduire au maximum les volumes dédiés à la culture cellulaire. Par ailleurs, étant dans un laboratoire dédié à la biologie médicale, il a été nécessaire dans un premier temps de mettre en place les protocoles et d'adapter les matériels disponibles aux conditions P3.

8.1.2. Les cellules dédiées à l'infection HCV

Les cellules utilisées pour l'infection par HCV ont été dans un premier temps les cellules humaines HepaRG® afin de valider le protocole d'infection, puis la lignée C6/36 et enfin les cellules Kt-Mos1 que nous avons établis au cours de ce travail.

8.1.2.1. Les cellules humaines : HepaRG®

Les cellules utilisées comme contrôle positif de l'infection ont été les cellules hépatocytaires d'origine humaine HepaRG® (Biopredic). Ces cellules ont pu être utilisées suite à un accord avec l'entreprise Biopredic, dans le but de confirmer l'infection par HCV de ces cellules dans un autre laboratoire que le laboratoire d'origine (INSERM, Marie-Anne Petit). Les cellules HepaRG® ont été isolées à partir d'une tumeur d'Edmonson de grade 1 résultant d'une hépatite C chronique. Ces cellules présentent la particularité d'être bipotentes, c'est à dire de pouvoir se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires après 28 jours de culture sans repiquage (*cf* Figure 8.1) [Parent et al., 2004]. Elles constituent le premier système permettant l'étude d'un cycle complet de réplication du HBV [Gripon et al., 2002]. Elles ont été utilisées comme modèle pour étudier l'infection virale par HCV ainsi que leur capacité à développer une réponse immunitaire innée résultante contrairement aux cellules d'hépatome (Huh-7, HepG2) [Maire et al., 2008b]. Ces cellules ont été montrées métaboliquement fonctionnelles (mécanismes de detoxification, expression de cyt P450, métabolisme du fer,...).

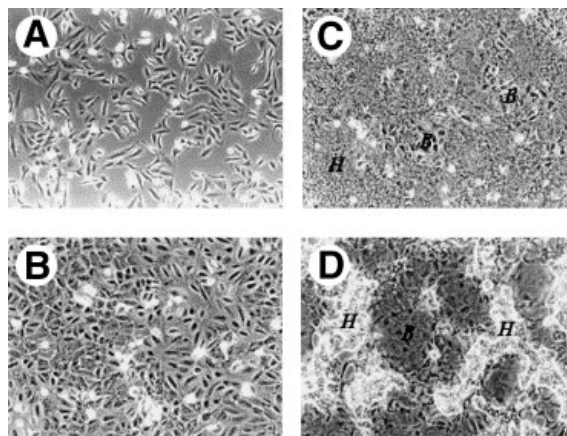


FIGURE 8.1.: **Evolution morphologique des cellules HepaRG® lors d'une étude cinétique**
Les cellules ont été observées en microscopie à contraste de phase à différents stades de culture : (A) Début de la phase de prolifération (jour 2), (B) Phase de prolifération avancée (jour 4-5), (C) Phase intermédiaire ou stationnaire (jour 7-14), (D) Phase de différenciation (jour 28-35). Les abréviations utilisées sont : H hépatocytes et B cellules biliaires (grossissement x 100) [Parent et al., 2004]

Il a été démontré que les cellules HepaRG® sont infectables par le HCV [Ndongo-Thiam et al., 2011]

. L'infection virale a été réalisée avec des particules HCV de génotype 3a (LAT), purifiées à partir de sérum de patients infectés. Les cellules ont été infectées à un état précis de leur développement. Il a été démontré que l'ARN viral (+) et des particules virales nouvellement produites pouvaient être détectées entre 21 et 63 jours après l'infection (*cf* Figure 8.2). Ces cellules ont été utilisées comme contrôle positif de l'infection HCV dans nos essais d'infection avec les cellules d'insectes.

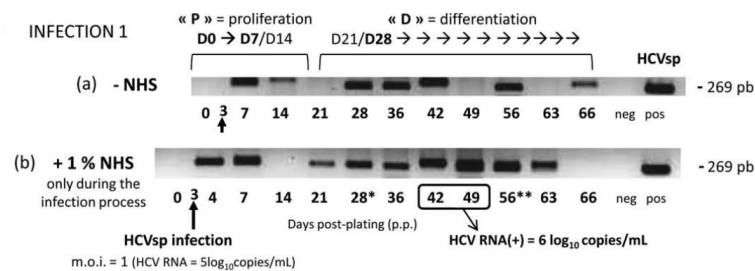


FIGURE 8.2.: **Production de particules virales infectieuses du HCV par la lignée hépatocytaire différencié HepaRG® au stade prolifératif.**

Le milieu a été récolté à différents temps. La détection et la quantification du HCV ont été réalisées en l'absence (a) ou en présence de 1% SHN (b). Le contrôle positif (POS) utilisé est l'inoculum HCVsp. L'infection a été réalisée au stade prolifératif (J3 après ensemencement) et la production virale est suivie par détection de l'ARN viral (+) au stade différencié soit entre 21 et 63 jours après infection [Ndongo-Thiam et al., 2011].

8.1.2.2. Les lignées d'insectes : la lignée C6/36 et la lignée Kt-Mos1

Les cellules C6/36 proviennent du moustique *Aedes albopictus*. Elles ont été isolées à partir de larve et ont été décrites comme pouvant répliquer de nombreux arbovirus comme celui de la dengue. Cette lignée cellulaire est très utilisée en laboratoire du fait de sa robustesse mais aussi pour l'intérêt de son espèce d'origine. *Aedes albopictus* a été décrit pour la première fois par Skuse (*cf* Figure 8.3). Il lui a donné le nom de moustique tigré d'Asie (*Aedes albopictus*) à cause de ses pattes rayées et de son corps tacheté de blanc. D'origine asiatique, il s'est répandu dans l'Océan indien, puis en Europe (France, Italie, Espagne) et en Amérique du fait de la forte résistance des œufs à la dessiccation. Ceux-ci peuvent ainsi être transportés *via* les voies commerciales. La ponte a lieu à la surface de l'eau peu chargée en matières organiques ou sur un substrat sombre et rugueux. *Aedes albopictus* est un moustique diurne ayant un pic d'activité en fin de journée. Il est zoophile et anthropophile. Il est responsable de la vectorisation du virus de la dengue et du virus du Chikungunya. Les cellules Kt-Mos1 ont été développées spécifiquement pour ce travail de thèse. Elles ont été décrites dans le chapitre 6

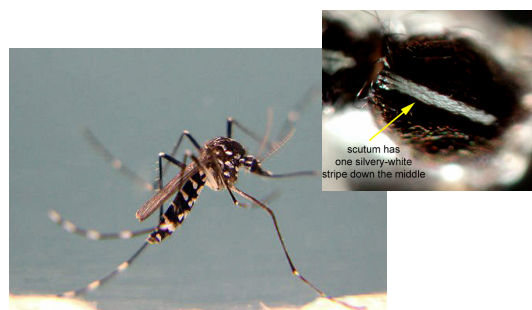


FIGURE 8.3.: Moustique *Aedes albopictus*

8.2. Matériel et méthodes

Pour valider le protocole qui permettra de répondre à nos questions, les cellules HepaRG® ont été utilisées comme contrôle positif. L'utilisation de ces cellules a été réalisée suivant les recommandations du kit 901. Étant donné les résultats précédents, une cinétique longue a été réalisée afin de suivre l'infection virale dans le temps. La cinétique a été réalisée pendant 28 jours avec différents temps de récolte des cultures cellulaires. Le protocole est résumé sur la figure 8.4. Il a été choisi de détecter le virus à différents niveaux :

- **Génomique** : en détectant l'ARN viral dans les cellules par la technique d'amplification longue du HCV mis au point dans le chapitre 7 à J=0 (pré-infection) puis à J+4, J+21 et J+28.
- **Antigénique** : par immunodétection antigénique de l'enveloppe du HCV par l'anticorps D32.10 au bout de 28 jours de culture.

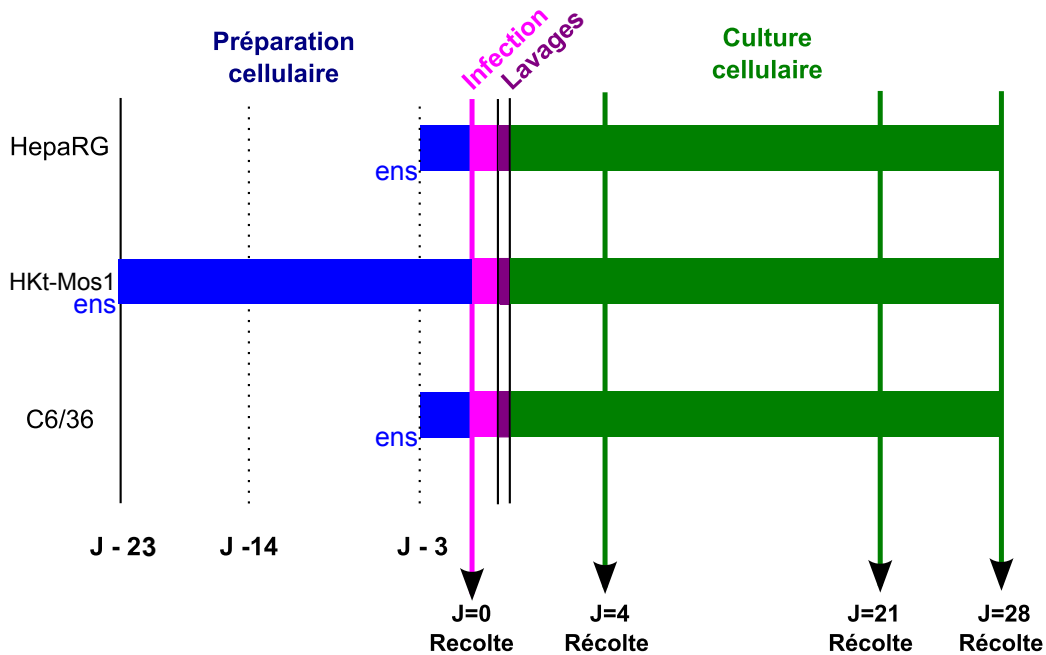


FIGURE 8.4.: Chronologie de la mise en culture et de l'infection cellulaire par HCV réalisées sur les lignées HepaRG®, C6/36 et les kt-Mos1

8.2.1. Ensemencement et protocole d'infection

Des particules HCV de génotype 3a (isolat LAT) ont été utilisées comme inoculum pour l'infection cellulaire. Ces particules ont déjà été utilisées pour tester la fonctionnalité du scFv D32.10 [Fallecker et al., 2013] et pour l'infection *princeps* des cellules HepaRG® décrit dans l'article [Ndongo et al., 2009, Ndongo-Thiam et al., 2011]. 50 000 cellules ont été ensemencées dans des chambres Lab-Tek et des plaques 24 puits avec 500 μL à 105 cellules/mL. Les cellules d'insecte ont été placées à 28°C, les HepaRG® à 37°C. L'ensemble des cellules a ensuite été déplacé dans le P3 (CHU de Grenoble). L'ensemencement a été réalisé 23 jours avant l'infection pour les kt-Mos1 afin d'être au stade vésiculaire (apparition d'expansion vésiculaire) et trois jours avant l'infection pour les cellules HepaRG® et C6/36 afin d'être au stade prolifératif. À J0, les cellules sont infectées avec 500 μL de milieu L-15 pour les cellules d'insecte ou du working HepaRG medium 710 pour les cellules HepaRG®

contenant des particules HCV infectieuses. L'infection a été réalisée au ratio de 1 virus pour 1 cellule (M.O.I. = 1) pendant 18 heures à 28°C (cellules d'insecte) ou à 37°C (cellules HepaRG). Une condition comprenant des cellules HepaRG ou des cellules d'insectes ont en même temps été menées afin d'être utilisées comme contrôle négatif de l'expérience. Dans ce cas, les cellules ont été incubées avec 500 μ L de milieu L-15 pour les cellules d'insecte ou du working HepaRG medium 710 pour les cellules HepaRG® contenant du PBS à la place des particules HCV infectieuses. Toutes les cellules après infections ont été lavées cinq fois avec leur milieu respectif et entretenues suivant les recommandations du kit 901.

8.2.2. Détection de l'infection dans les cellules à J+4, J+21 et J+28

8.2.3. Amplification longue (LR-PCR) pour détecter l'ARN viral (+)

Pour l'amplification 8emphlong Range, les cellulaires récoltées à J0, J+4, J+21 et J+28 ont été centrifugées à 800 rpm pendant 10 minutes. Les culots cellulaires ont été stockés à -80°C pour réaliser toutes les extractions en même temps. Les milieux de cultures ont été congelés à -80°C. L'ARN cellulaire a été extrait à l'aide du kit Rnase easy (Qiagen). Celui-ci a été spécialement choisi du fait de l'absence d'ARN carrier qui pourrait poser un problème pour les expériences d'amplification longue. Les cultures et les extractions d'ARN ont été réalisées dans le P3 du CHU de Grenoble. Les traitements à la DNase, la transcription inverse et les contrôles ont été réalisés le jour même. Pour le contrôle de la transcription inverse, les amorces 5NC1/5NC2 ont été choisies, et l'amplification longue a été réalisée avec les amorces 5NC1/HUTLA2 et 2ch/RT946 en contrôle positif.

8.2.3.1. Immunodétection des protéines d'enveloppe E1 E2 par l'anticorps monoclonal D32.10

À J+28, les lames sont fixées avec 250 μ L de paraformaldéhyde 2% dilué dans du PBS 1x pendant 25 minutes et stockées à 4°C dans du PBS 1x. Les cellules sont perméabilisées/saturées avec du 0.1% triton X100, 3% GPI pendant 5 minutes, mises en contact avec l'anticorps D32.10 (10 μ g/mL) pendant une heure et révélées à l'aide d'un anticorps anti-souris (1/2500-mol.probes) couplé à l'ALEXA (488 nm). Les lames sont observées en microscopie photonique à fluorescence. Les noyaux ont été marqués au hoecht (1/200).

8.3. Résultats

Suite à l'infection, les cellules HepaRG® ainsi que les cellules d'insectes conditionnées dans les plaques 24 puits ont bien supporté l'infection, les étapes de lavages et les 28 jours de mise en culture. Les cellulesensemencées dans les Lab-Tek ont par contre beaucoup souffert pendant l'étape d'infection. Le manque d'eau dans l'incubateur et l'évaporation du milieu qui en résulte ont fragilisé les cellules et une majorité de celles-ci se sont décollées durant l'entretien cellulaire.

8.3.1. Immunodétection

Cependant, un test a pu être réalisé sur les cellules hépatocytaires (*cf* Figure 8.5). Au vu du marquage cellulaire par le DAPI des cellules infectées et non infectées, le protocole d'immunodétection est fonctionnel. Aucune luminescence provenant des cellules non infectées a été visualisée. Cependant, peu de cellules infectées ont montré un signal de luminescence. Il n'est donc pas possible de conclure sur l'infection au vu du faible signal de luminescence et de la densité cellulaire.

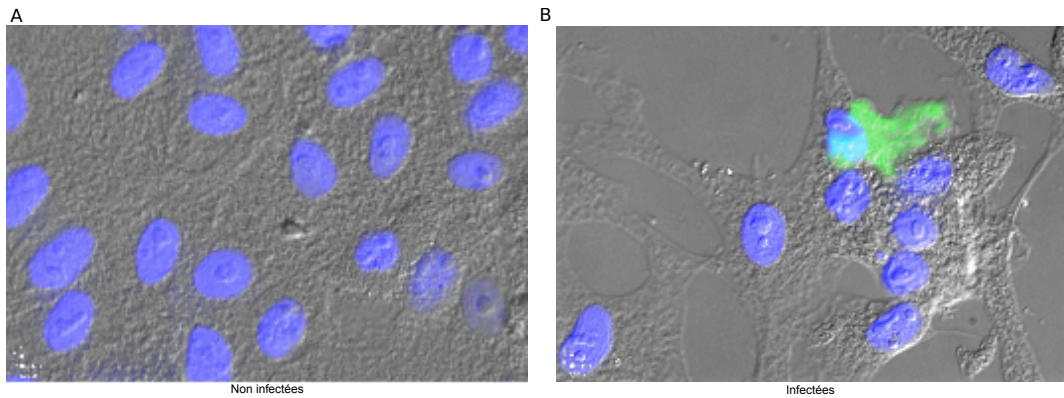


FIGURE 8.5.: **Immunodetection du HCV sur des cellules HepaRG® non infectées (a) et infectées (b)**

Les cellules HepaRG® ont été infectées 28 jours auparavant. L'anti-HCV D32.10 E1E2 a été utilisé comme anticorps primaire puis celui-ci a été révélé avec un anti-souris couplé à l'ALEXA.

8.3.2. Détection génomique du HCV

Dans cette partie, nous présentons les résultats de l'infection des HepaRG® et des cellules d'insectes C6/36 et Kt-Mos1.

8.3.2.1. Transcription inverse et amplification longue

Comme décrit dans le chapitre 7, la transcription inverse a été testée par PCR afin de contrôler la qualité de l'ADN complémentaire produit. Une PCR ciblant la région 5'UTR a été réalisée avec les amorces 5NC1/5NC2. Ce couple d'amorces a été choisi pour son caractère pan-génotypique. Les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1% (TBE 1/10ème) dans lequel a été incorporé du GelRed (150V pendant 1h) (*cf* Figure 8.6)

- Sur le gel A (HepaRG®) : l'amplification d'une bande ayant la bonne taille est visible à J+21 et J+28. Cette bande a été extraite puis séquencée, révélant que celle-ci correspond bien à l'ARN du HCV. Ce résultat confirme que les cellules HepaRG® sont permissives au HCV et qu'il est détectable 21 jours après l'infection.
- Sur le gel B (C6/36 et des Kt-mos1) : l'amplification de l'ADN complémentaire en ce qui concerne les cellules C6/36 montre la présence d'une bande à la taille attendue à J+21 et J+28 contrairement au Kt-Mos1 ou celle-ci est visible à J+28. Après extraction, ces trois bandes ont été séquencées révélant que celles-ci correspondaient à la région 5'UTR du HCV. Ce résultat démontre que ces deux types cellulaires sont permissives au HCV.

Le résultat de l'ensemble des séquençages réalisés sur les trois types cellulaires a été comparé à l'inoculum HCV utilisé pour l'infection (*cf* Figure D).

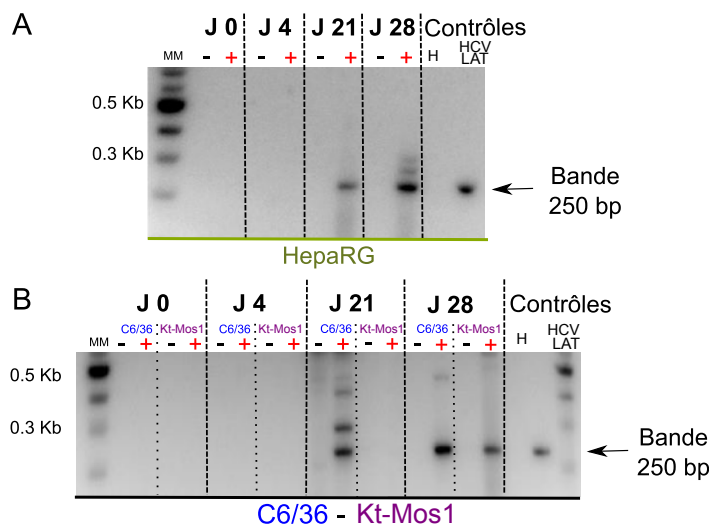


FIGURE 8.6.: RT-PCR de l'ARN viral intracellulaire

(A) Gel d'agarose (1%) des produits 5NC1/5NC2 issus de la transcription inverse de l'ARN viral des cellules humaines HepaRG® infectées (+) ou non (-) (B) Gel d'agarose (1%) des produits 5NC1/5NC2 issus de la transcription inverse de l'ARN viral des cellules C6/36 et Kt-Mos1

Les ADN complémentaires ayant été amplifiés dans la région 5'UTR confirme la processivité de la transcription inverse et la présence d'ARN viral dans les cellules d'insecte à 21 et/ou 28 jours après infection. Les produits ayant été contrôlés positivement ont été amplifiés avec le même protocole que celui du chapitre 7. Les produits PCR ont été déposés sur gel (*cf* Figure 8.7). La présence des bandes attendues au niveau des contrôles positifs indique que les PCR ont été opérationnelles. Néanmoins, aucune longue amplification n'est observable pour les cellules humaines hépatocytaires et pour les cellules d'insectes. D'autres couples d'amorces ont alors été testés mais aucune amplification longue n'a pour le moment pu être réalisée.

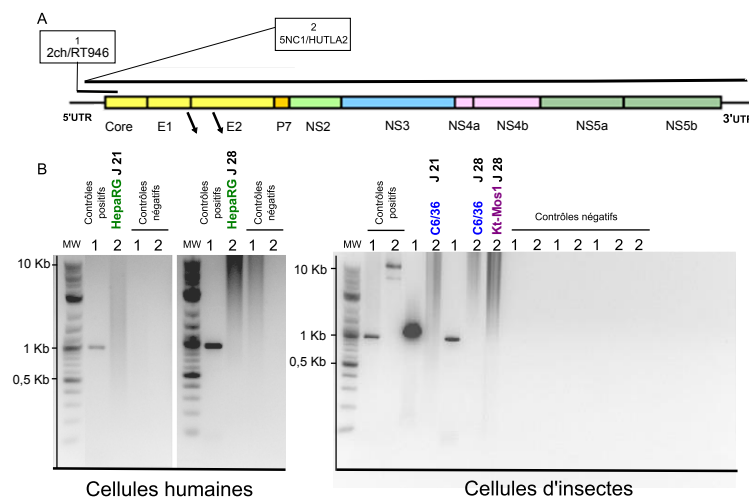


FIGURE 8.7.: Amplification du génome entier du HCV issu des produits d'infection de cellules humaines et de cellules du genre *Aedes*

(A) Représentation du génome du HCV sur lequel les amorces utilisées pour réaliser les PCR ont été indiquées. (B) Gel d'agarose (0.6%) des produits PCR (1) 2ch/RT946 et (2) 5NC1/HUTLA2 des cellules humaines hépatocytaires HepaRG®, C6/36 et des Kt-mos1 infectées par HCV.

CONCLUSION

Au travers de ces expériences, nous pouvons conclure que le protocole d'infection par HCV des cellules hépatocytaires humaines (hepaRG) et d'insecte (C6/36 - Kt-Mos1) est maintenant opérationnel en laboratoire confiné de type P3 à l'IBP (CHU de Grenoble). Par ce protocole, nous avons démontré que les cellules C6/36 et les Kt-Mos1 étaient permissives au HCV et que l'ARN viral pouvait être détecté par RT PCR au bout de 21 jours et/ou de 28 jours suivant le type cellulaire. L'absence d'ARN viral à J+4 et la détections à long terme suggèrent que le HCV pourrait se répliquer au niveau de ces deux types cellulaires.

Quatrième partie .

Discussion/Conclusion

Le virus de l'hépatite C (HCV) est un des rares virus à avoir été nommé dans un premier temps en fonction de ce qu'il n'est pas, c'est-à-dire une hépatite non A non B. Répandu sur l'ensemble de la planète, source d'épidémie silencieuse, mais aussi non cultivable *in vitro* et de traitement difficile, il a été classé virus de type 3. Le contrôle des modes de transmission (produits sanguins) et le dépistage des hépatites virales au niveau du réservoir naturel (l'homme) fut le seul moyen d'endiguer l'épidémie. Néanmoins, encore de nos jours, 20 à 40% des contaminations restent inexplicables. La découverte d'homologues du HCV chez d'autres mammifères comme le chien [Kapoor et al., 2011] et le rongeur [Kapoor et al., 2013], la notion d'endémicité et son origine ancienne suggèrent que le réservoir n'est pas uniquement humain mais pourrait s'élargir à l'échelle des mammifères. Ainsi, l'origine et les voies de transmission du HCV ont été remises en cause. Une des nouvelles voies de transmission étudiée fut celle de la transmission vectorielle par le moustique. Celle-ci fut étudiée par différentes approches :

- Epidémiologique [Pybus et al., 2007] : la colocalisation des souches endémiques du HCV avec les zones de distribution d'*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* et *Ixodes sp.* supporte l'hypothèse d'une transmission du HCV par les arthropodes.
- Entomologique et cellulaire. Le docteur Raphaëlle Germe a démontré que le virus du HCV pouvait persister au niveau de la lignée cellulaire AP61 (*Aedes pseudoscutularis*) 21 jours après l'infection malgré de nombreux lavages et repiquages. La persistance de cet ARN au niveau cellulaire suggère que le virus du HCV pourrait se répliquer chez *Aedes pseudoscutularis*. Par ailleurs, le docteur Yassine Rechoum a démontré que le génome du HCV pouvait être détecté par RT-PCR chez *Ae. vexans* 21 jours post-infection, contrairement à *Culex pipens*. Le séquençage de la région NS5b a révélé la présence, au niveau de la séquence en acide aminés, des mutations suivantes : Val262-Ala262, Pro265-Ser265, et Asn316-Asp316 prouvant ainsi la répllication virale chez *Aedes vexans*.

Étant donnés les résultats précédents, mon travail fut d'utiliser les conclusions épidémiologiques avancées par Pybus et celles de Yassine Rechoum pour étudier la permissivité du HCV chez trois espèces de moustique : *Aedes vexans*, *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*. Afin de réaliser cela, une partie de mon travail de thèse a été divisé en trois temps : (i) développement du matériel biologique (ii) développement d'outils immunologiques et biomoléculaires afin de suivre l'infection virale et (iii) validation d'un protocole d'infection par HCV dans le but d'infecter des lignées cellulaires d'insecte.

- Nous avons fait le choix de travailler à l'échelle cellulaire. Pour cela, il a fallu dans un premier temps développer une lignée cellulaire pour *Aedes vexans*. Afin de réaliser ce travail, nous nous sommes inspirés du travail de Singh et al qui a pu développer une lignée d'*Aedes aegypti* et sur les travaux du docteur Florence Fouque. Grâce à cela, il a été possible d'obtenir une lignée cellulaire d'*Aedes aegypti* ayant des caractéristiques phénotypiques uniques. En effet, le pléomorphisme cellulaire suggère que la lignée d'*Aedes aegypti* serait pluripotente. De plus, l'organisation vésiculaire laisse penser que les cellules seraient fortement cohésives. Ce pléomorphisme et le caractère polarisé de cette lignée cellulaire sont des éléments essentiels pour l'entrée virale du HCV. Notre travail sur cette lignée cellulaire est corrélé par les travaux de Singh en 1967 au niveau larvaire [Singh, 1967]. Cependant, il semble qu'il n'avait pas pu garder ce pléomorphisme cellulaire après ses différents repiquages. Tout cela montre qu'une nouvelle lignée cellulaire d'*Aedes aegypti* a pu être obtenue pendant ce travail de thèse que le protocole développé est opérationnel et robuste. Malgré que nous n'avons pas pu obtenir une lignée cellulaire *Aedes vexans*, nous avons pu adapter le protocole d'*Aedes aegypti* et apporter des améliorations notables concernant l'étape d'éclosion.
- Afin de visualiser le HCV au niveau génomique, les protocoles d'extraction, de transcription inverse et d'amplification ont été développés. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'IBP (CHU de Grenoble). Étant donnés les difficultés de mise en culture du virus, les expériences ont été réalisées sur des sérums humains. Celles-ci nous ont permis de conclure que quelque soit l'enzyme utilisée pour rétro-transcrire l'ARN viral (Prime Script ou SSIII), l'ADN complémentaire produit correspondait au génome viral dans son entier. Néanmoins, l'efficacité de ces deux enzymes étant

différentes, la Prime Script a été choisie. En ce qui concerne l'amplification du génome viral dans sa totalité, le protocole final a été mis au point après de nombreux essais d'enzymes, de protocoles, d'additifs et d'amorces couvrant tout le génome. Le problème soulevé de la région NS3 nous a permis de comprendre que les structures secondaires pouvaient être un élément perturbateur au niveau de cette région malgré le travail à haute température. Cette conclusion nous a forcé à rechercher d'autres enzymes pouvant à la fois amplifier de longs génomes et supporter des fortes températures de dénaturation. Ce problème pu être en partie résolu par l'utilisation d'autres amorces et d'une autre enzyme nommée GXL. Un protocole génome entier est donc opérationnel à partir d'échantillons sériques humains. Néanmoins, vues les amplifications longues réalisées sur les extraits cellulaires provenant de cellules humaines ou d'insectes, il semblerait que le protocole ne soit pas encore complètement adapté à ce type d'échantillons. Malgré un témoin positif bien présent, aucune amplification longue des produits d'extraction n'a été obtenue. Cela peut être expliqué par la faible teneur en ARN viral dans le produit d'extraction. En effet, nous avons travaillé sur des sérums ayant des forts taux viraux, ce qui peut expliquer pourquoi l'amplification d'échantillons sériques semble être plus robuste. Il y a donc possiblement un seuil limite d'amplification longue du HCV. Celui-ci reste à déterminer. Par ailleurs, le produit d'extraction issu des cellules d'insectes ou humaines pourrait empêcher ou diminuer la capacité des enzymes à rétro-transcrire ou à amplifier le matériel génomique. Afin de purifier, voire même de concentrer notre ARN viral issu du produit d'infection, d'autres produits que ceux déjà utilisés (DNase ou RNase out) devront être testés.

- Une fois les outils nécessaires à l'analyse du génome viral et la lignée cellulaire d'*Aedes aegypti* développés, nous nous sommes focalisés sur le protocole d'infection. Afin de valider celui-ci sur les cellules d'insectes, il nous a fallu dans un premier temps le valider sur des cellules humaines (HepaRG®). De cette première infection, nous sommes arrivés à la conclusion que les cellules étaient permissives au HCV, l'ARN viral était détectable J+21 et J+28. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents réalisés sur cette même lignée dans lesquels le HCV avait pu être détecté à partir de 21 jours post-infection [Ndongo-Thiam et al., 2011]. L'ensemble de ce travail a ensuite été adapté aux lignées cellulaires de moustique C6/36 mais aussi à la lignée développée en laboratoire (les kt-mos1). À partir de cette infection et en utilisant les outils de biologie moléculaire développés auparavant, il est possible de conclure que les cellules provenant du moustique *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* étaient permissive au HCV. En effet, l'ARN viral est détectable à J+21 et J+28 en ce qui concerne la lignée cellulaire C6/36 et à partir de J+28 pour la lignée cellulaire kt-mos1. Ces résultats sont en accord avec ce qu'avait trouvé Yassine Rechoum au niveau du moustique entier et semblent aussi être cohérents avec ce qui a été trouvé au niveau de la lignée hépatocytaire HepaRG®. De ces travaux nous pouvons conclure que les cellules HepaRG®, C6/36 et les kt-mos1 sont permissives au HCV. De plus, la persistance virale à J+21 et/ou à J+28 suggère que la réplication virale du HCV pourrait avoir lieu au niveau de ces lignées cellulaires. Afin de valider ces résultats, une étude utilisant le séquençage haut débit doit être menée. Les échantillons sont actuellement en cours d'envoi pour le traitement. L'entreprise GATC a été choisie pour réaliser cette expérience.

Parallèlement à ce travail principal et dans le but d'améliorer les outils de détection du HCV, nous avons travaillé sur la création d'un scFv D32.10 à partir de l'anticorps monoclonal anti-HCV E1E2 D32.10. Nous avons pu ainsi créer un scFv pouvant reconnaître les particules virales HCV de génotype 1a/éa et 3a. Malgré son apparente insolubilité il a été possible de produire celui-ci via la technique de *flash refolding*, ce qui nous a permis de valider la fonctionnalité de la construction. De plus, cette construction semble avoir une bonne affinité envers les particules virales LAT et FAN. En effet, la mise en compétition de l'anticorps entier et du scFv montre une inhibition réciproque de ceux-ci. Cela peut être expliqué par le nombre de valence qui est de deux pour l'anticorps et d'une seule pour le scFv. D'autres moyens d'expression ont été testés afin de produire le scFv en condition soluble, en particulier le *cell-free* et le baculovirus. Malgré l'apparente production du scFv D32.10 en *cell-free*, la

protéine scFv n'a pas pu être purifiée du fait de sa production sous forme d'agrégats solubles. Aucune activité n'a pu être observée en dot blot. La production en baculovirus s'est révélée très intéressante. En effet, la condition dans laquelle le scFv D32.10 a été sécrété dans le milieu montre une bonne production et permet la purification contrairement au scFv D32.10 produit dans le cytoplasme. De ces deux expériences, nous pouvons conclure que les voies de sécrétion sont essentielles à la production de la protéine scFv D32.10 active ; capable de reconnaître les particules virales HCV. Ce travail de thèse s'est essentiellement focalisé sur le virus de l'hépatite C. Il a permis d'apporter la preuve que les cellules provenant d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* étaient permissives au HCV. Par ailleurs, ces résultats suggèrent une répllication virale de cet agent pathogène chez l'insecte du fait de la persistance de l'ARN viral à J+21 et/ou J+28. Cette information est essentielle et va dans le sens des hypothèses émises par Pybus. Les résultats corroborent ceux de Yassine Rechoum sur *Aedes vexans*. Dans son travail, celui-ci avait démontré la présence du HCV au niveau du corps mais aussi au niveau de la tête de l'insecte. Ainsi, il serait intéressant de réaliser une nouvelle infection sur moustique avec les deux espèces étudiées lors de ma thèse afin de rechercher le virus hors du sac gastrique, afin d'étudier la capacité de ceux-ci d'être un réservoir et/ou un hôte naturel du HCV. La capacité vectorielle pourra ainsi être explorée.

L'ensemble de ces résultats ainsi que la découverte d'un nouvel homologue chez le chien et le rongeur, la notion d'endémicité posent la question de l'origine du HCV. Est-il d'origine humaine ? ou s'est-il adapté à l'homme ? L'identification du réservoir et des hôtes sont importantes. Le traitement des infections chroniques étant difficile, le contrôle du réservoir infectieux est essentiel pour éviter toute épidémie. Étant donnée l'issue de l'hépatite chronique due au HCV et l'absence de prophylaxie, l'éradication de celui-ci est essentielle et primordiale pour les personnes malades. Étant non lytique, le virus circule dans le corps durant de longues périodes entraînant de nombreuses complications cliniques (fibrose, cancer). Les protocoles thérapeutiques mis en place sont dépendants des personnes, il est difficile de trouver un protocole général. Il est donc tout aussi important de connaître l'état de la personne infectée que de connaître le génotype et les sous-populations qui l'infecte. Le protocole d'amplification longue du HCV réalisé en collaboration avec le Dr Sylvie Larrat et Elodie Santoni (IBP CHU de Grenoble) pourrait avoir plusieurs applications. L'une des applications est celle développée durant ma thèse, à savoir le suivi des mutations dues à la répllication virale. Une seconde application du protocole est celle développée par l'équipe du Dr Sylvie Larrat, à savoir la possibilité de génotyper, sous-typer et identifier les mutations de résistance dues à la pression thérapeutique des antiviraux d'action virale directe (AAD) comme les antiprotéase. Le but est alors d'optimiser le choix du traitement. En effet, l'apparition des mutations peut être la cause de résistances thérapeutiques et entraîner la sélection d'une souche ne répondant pas aux anti-viraux [Thompson and McHutchison, 2009]. L'absence de thérapie adaptée entraîne l'apparition de lésions hépatites graves comme la fibrose et/ou le cancer du foie (HCC). Le HCV est ainsi responsable de 30% des transplantations hépatiques et réduit de 8 à 12 ans l'espérance de vie des patients infectés [Ryder, 2007]. Des agents inhibant l'entrée virale comme des anticorps monoclonaux ou plus récemment des protéines recombinantes de type scFv pourrait constituer une nouvelle approche. c'est pourquoi nous avons développé un scFv D32.10 qui est pan génotypique. Il pourrait être à la base d'une nouvelle approche pour prévenir les ré-infections des greffons de transplantés hépatiques.

Notre travail a permis d'apporter deux réponses essentielles : (i) Les moustique *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* pourraient être un réservoir naturelle du HCV et (ii) le scFv D32.10 pourrait constituer une nouvelle approche immunoprophylatique anti-HCV efficace.

Appendices

Annexe A

Ultrastructural characterization of a new cell line derived from larvae of Ae. aegypti (Bora-Bora)

Ultrastructural characterization of a new cell line derived from larvae of *Ae. aegypti* (Bora-Bora)

Catherine Fallecker^{1,2,3}, Pascal Fender^{1,2,3}, and Emmanuel Drouet^{1,2,3*}

¹Univ. Grenoble Alpes, Unit for Virus Host-Cell Interactions, F-38000 Grenoble, France

²CNRS, Unit for Virus Host-Cell Interactions, F-38000 Grenoble, France

³Unit for Virus Host-Cell Interactions, Univ. Grenoble Alpes-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 France.

Aedes aegypti mosquitoes are important vectors of viral diseases, such as Yellow and Dengue Fever. As an example, Dengue viruses cause the most common arthropod-borne viral disease in human with 50-100 million infections per year . Traditional strategies currently employed for the control of the disease vector, *Ae. aegypti*, such as insecticide applications are becoming more and more ineffective due to the rapid resistance of this vector (Strode et al., 2008). This situation reinforces the need to understand the biology of the vector/pathogen interaction. In contrast to mammalian systems, neoplastic tumors typically do not occur in insects, nor are viruses available that can be used to establish immortalized insect cell lines. It was not until the early 1960s that Grace (1962) established the first continuous cell line from tissues of the moth, *Antheraea eucalypti* (Grace, 1966). Cell lineages constitute homogeneous, sensitive and reproducible systems, allowing the detection of very subtle changes in the response to different kinds of pathogens and stimuli. For these reasons, cells from *Drosophila melanogaster* (especially S2 cells), *Anopheles gambiae* (5.1* and Sua5B), *Lutzomyia longipalpis* (LL5 cells), *Aedes albopictus* (especially C6/36 cells), among other insects, have long been used to investigate different aspects of insect biology and immunity, being essential tools for the construction of the knowledge we have today regarding immune activation pathways in insects (Levashina et al., 2001; Lowenberger, 2001; Sanchez-Vargas et al., 2004; Barletta, Silva, and Sorgine, 2012). Mosquito cell lines also have been found to be effective in early detection and isolation due to their high sensitivity to arboviruses (Singh, 1972; Mussgay et al., 1975; Igarashi, 1978; Vazeille-Falcoz et al., 1999; Vazeille et al., 2003). From the first description of the *Ae. aegypti* cell

lineage of embryonic origin (Aag-2)(Peleg, 1968), very few studies have been published. Recently some authors described a new cell line from the neonate larvae of *Ae. aegypti*, called NIV-AA-706 (Sudeep et al., 2009). Here we present a thorough ultrastructural description of a new cell line from *Ae aegypti* (Bora bora), by using recent approaches of 3D immunofluorescence. Primary cultures were prepared using protocols derived several decades ago (Singh, 1967). In brief, 50 *Ae. aegypti* (Bora Bora) mosquito eggs collected from the insectary were surface sterilized using 2.6 % sodium hypochlorite and washed two times in 1% PBS (Figure 1A). The neonate larvae were finely chopped with sterile scissors in a 2 mL eppendorf tubes containing 1 mL L-15 Leibovitz growth medium (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum, 1% penicillin-Streptomycin, 1% l-glutamine. The cultures were incubated as static cultures in a 28°C incubator and observed using an inverted microscope for tissue attachment and proliferation.

Observation of the global cellular growth over time.

A new cell line from the neonate larval tissues of *Ae. aegypti* (Bora-Bora strain) was established and characterized using different parameters. This new mosquito cell line has undergone > 100 passages *in vitro* and has been named Kt-Mos1. It is striking to notice that two weeks after the cultures were set up, large hollow vesicles developed at the cut ends of the tissue fragments and continued to increase in size and number (Figure1B). These vesicles appeared to consist of monolayers of epithelium-like cells. At this stage, few cells were found attached to surface of 48-wells plates (Figure 1C upper panel). Three months later, floating tissue fragments with huge hollow vesicles blew up and have been seeded into new wells. Large proportion of the cell masses have attached to the plastic. Microscope observations shown that cells were organized in dome-like shape after one month that became new hollow vesicles after two months in adherent conditions (Figure 1D). Adherent cells subculturing (6-well,) was carried out giving 1:2 ratio at an interval of two weeks with one medium change in between. Hollow vesicles were isolated and medium was changed once per week. Morphological studies were performed at the 43th passage level demonstrated predominance of adherent cells with a morphology similar to that of the cells described in Figure 1C. Mainly three morphological types of cells were observed (hollow vesicles, dome and adherent cells)(see below). Finally we performed a species-diagnostic PCR by using primers

(18SFHIN : 5'GTAAGCTTCCTTTGTACACACCGCCCGT3' ; aeg.r1 : 5'
TAACGGACACCGTTCTAGGCCCT 3') designed on the internal transcribed spacer (ITS)
regions of the ribosomal DNA (Higa et al., 2010) (Figure 1C lower panel).

Observation of Kt-Mos1 cells by light microscopy.

The Kt-mos1 *Aedes aegypti* cells were grown on thin glass (0,17 mm), 2 chambers LabTek (Nunc). The cells were fixed after different periods of cultivation with 2% PFA for 20 minutes at 37°C. After permeabilization by PBS 0,1% Triton X100 for 2 minutes, the nuclei were stained by Hoechst 33258 (Sigma). Observation was performed on motorized inverted Olympus IE81 microscope using the DIC (differential interference contrast) and the DAPI filter. First, we carried out a 2D observation: Kt-Mos1 cells cultivated along 55 passages were observed as isolated cell or monolayer. At this stage, cell appeared mononucleated with either an elongated shape or a large square flat cytoplasm (Figure 2A, right panel). Mitosis events can sometime be found in and showed clearly at the late metaphase stage three pairs of chromosomes segregating from the mitotic spindle (Figure 2A, left panel). Then, a second approach consisting in a 3D observation was undertaken: Over the time cells in monolayer (Figure 2B) had a tendency to differentiate and supracellular structure became visible. First, a “dome like” structure lifted from the adherent cells monolayer. In Figure 3A, the monolayer which is about 50 µm in size are shown at two different Z positions. In the Figure 3A (right panel) a “lid” of cells covers the blurry adherent cells thus showing the apparition of a 3D structure. These cellular structures grown with time and became more and more structured in the Z dimension. In Figure 3B, a “supracellular” structure is observed on a 47 µm thick Z dimension by step of 1µm. The Z=0 observation shows that nuclei can be seen only at the periphery of the structure suggesting a hollow assemblage. Again the lid is clearly visible closing the structure. Using the Volocity software a 3D reconstruction using the Z-serie pictures allowed to give an overview of the cell assemblage. For better view and understanding the last top views were withdrawn from reconstruction showing a volcano shape and above all confirming that this structure is hollowed. At the very late stage of the supracellular structure differentiation, bubbles of different size in the hundred of micrometer range detached from the support. In Figure 3C (left panel), these cellular assemblages looking like “golf ball” in the DIC channel are clearly visible. This morphology reflected that the focus was done in the medium section with image

contamination coming from cells above and below the focus plane. When looking at the DNA content (Hoechst staining) of these “golf ball like” structures, it is obvious that the shell is composed of a monolayer of cell with an empty cavity (Figure 3C left panel). Assuming a perfect sphere, the volume of the shown structure is about $4 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$.

This paper described for the first time the ultrastructural characterization of *Aedes aegypti* cell development from the hatching of the eggs to the stage of long-term in vitro cultivation of the cells. It is striking that the DAPI analysis also indicated diploid number of chromosomes ($n=6$) as previously described (Giannelli et al., 1999), demonstrating that no transformation of cells has occurred. The most prominent results is the confirmation by new microscopical techniques the presence of hollow vesicles described by Singh 45 years ago, in the early steps after chopping the larvae as well as in the later stages of cell culture. Still many questions have yet to be answered, namely the cyclic pattern of these 3D “supracellular” structures, which could open up a entire new field of research in insect cell development.

References

- BARLETTA, A. B., M. C. SILVA, AND M. H. SORGINE. 2012. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasit Vectors* 5: 148.
- GIANNELLI, F., J. C. HALL, J. C. DUNLAP, AND T. FRIEDMANN. 1999. *Advances in Genetics. Boston: Academic Press* 41: 2.
- GRACE, T. D. 1966. Establishment of a line of mosquito (*Aedes aegypti* L.) cells grown in vitro. *Nature* 211: 366-367.
- HIGA, Y., T. TOMA, Y. TSUDA, AND I. MIYAGI. 2010. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Jpn J Infect Dis* 63: 312-316.
- IGARASHI, A. 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 40: 531-544.
- LEVASHINA, E. A., L. F. MOITA, S. BLANDIN, G. VRIEND, M. LAGUEUX, AND F. C. KAFATOS. 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104: 709-718.
- LOWENBERGER, C. 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 219-229.
- MUSSGAY, M., P. J. ENZMANN, M. C. HORZINEK, AND E. WEILAND. 1975. Growth cycle of arboviruses in vertebrate and arthropod cells. *Prog Med Virol* 19: 257-323.
- PELEG, J. 1968. Growth of arboviruses in primary tissue culture of *Aedes aegypti* embryos. *Am J Trop Med Hyg* 17: 219-223.
- SANCHEZ-VARGAS, I., E. A. TRAVANTY, K. M. KEENE, A. W. FRANZ, B. J. BEATY, C. D. BLAIR, AND K. E. OLSON. 2004. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Res* 102: 65-74.
- SINGH, K. R. 1972. Growth of arboviruses in arthropod tissue culture. *Adv Virus Res* 17: 187-206.
- SINGH, K. R. P. 1967. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). *Curr. Sci. India*: 506-508.
- STRODE, C., C. S. WONDJI, J. P. DAVID, N. J. HAWKES, N. LUMJUAN, D. R. NELSON, D. R. DRANE, S. H. KARUNARATNE, J. HEMINGWAY, W. C. T. BLACK, AND H. RANSON. 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 113-123.
- SUDEEP, A. B., D. PARASHAR, R. S. JADI, A. BASU, C. MOKASHI, V. A. ARANKALLE, AND A. C. MISHRA. 2009. Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45: 491-495.
- VAZEILLE-FALCOZ, M., L. MOUSSON, F. RODHAIN, E. CHUNGUE, AND A. B. FAILLOUX. 1999. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg* 60: 292-299.
- VAZEILLE, M., L. ROSEN, L. MOUSSON, AND A. B. FAILLOUX. 2003. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 68: 203-208.

Acknowledgements: We are very grateful to Christopher Swale for English corrections and advices. We thanks Françoise Lacroix and JP Kleman for access to the imagery platform of the Grenoble Partnership for Structural Biology.

Legends

Figure 1

Global process of the Kt-Mos1 cell generation from eggs hatching to the final supracellular structures. Macroscopic picture showing the eggs of *Ae aegypti* collected from insectary (A). Large hollow vesicles developing at the cut ends of the larvae fragments (B). Microscopic examination of the adherent cells and molecular identification of cell and larvae extracts by PCR targeting rDNA ITS (C) : The upper panel of the panel shows cells in monolayer. The lower panel indicates species-diagnosis PCR of cellular samples: hollow vesicles (lane 1), adherent cells (lane 2) and “Dome-like” structures (lane 3). HEK 293 cells are the negative control, ground larvae extracts of *Ae aegypti* bora bora strain are the positive control. The approximate amplified size is 550 bp. Microscopic examination of the hollow vesicles as supracellular structures (D 1 & 2)

Figure 2.

Fluorescence observation of adherent KT-Mos 1 cells. (A) Isolated cells grown on a glass coverslip are observed using the DIC and Hoechst channels. The left panel shows a late metaphase stage of a dividing cell. (B) Similar observation of KT-Mos1 cells in monolayer.

Figure 3

3D observation of KT-Mos1 supracellular structures. (A) New forming cellular structures are shown at their bottom (left) and top views (right) using DIC and Hoechst channels. (B) Z-serie of a well-differentiated cellular structure acquired in the Hoechst channel. The two extreme positions (Z=0 and Z=47 mm) are shown in the right while a full 3D reconstitution performed by Volocity software is shown in the left. (C) Advanced “golf ball” supracellular structures are observed in the DIC channel (left) and a cross-section (right) shows that these spherical structure shells are composed by a monolayer of cells.

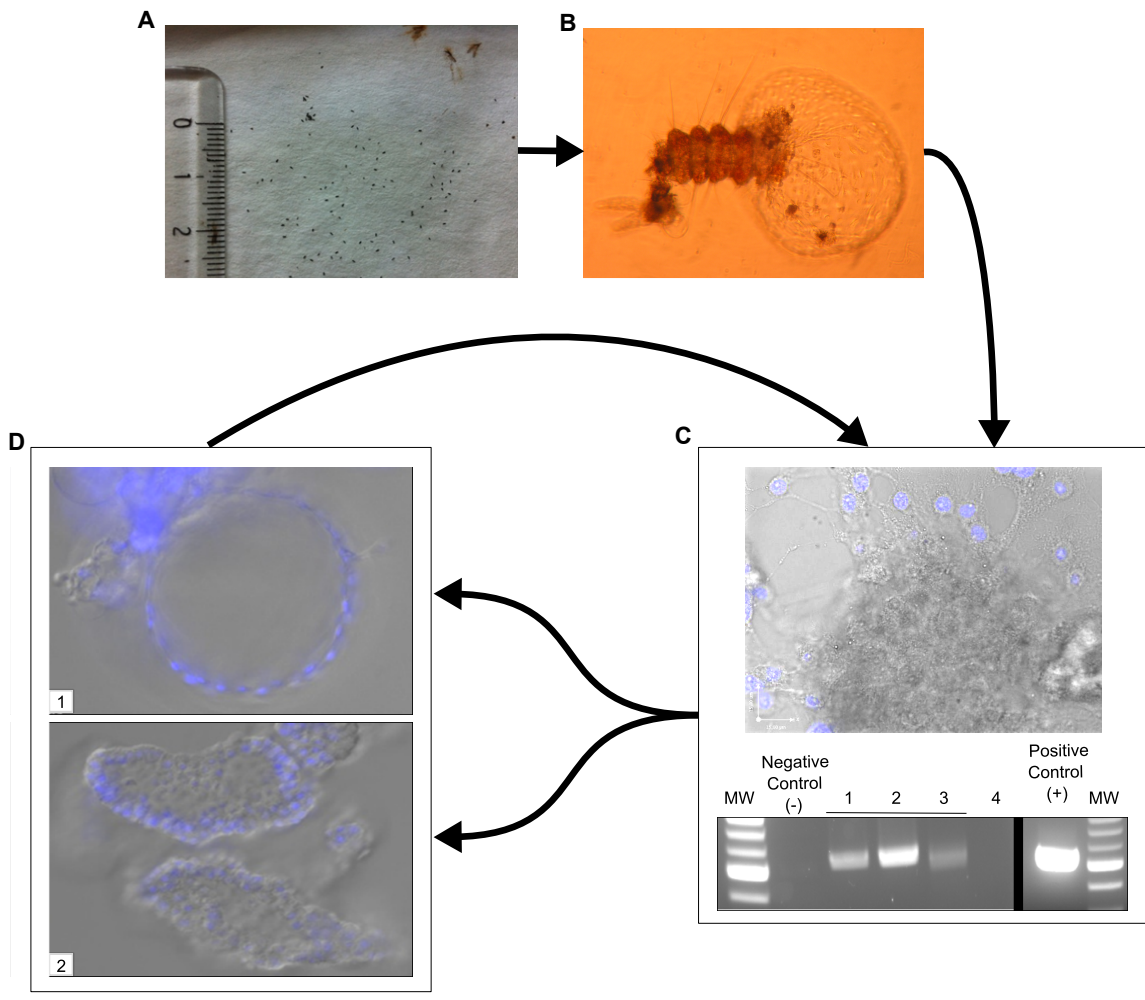


Figure 1

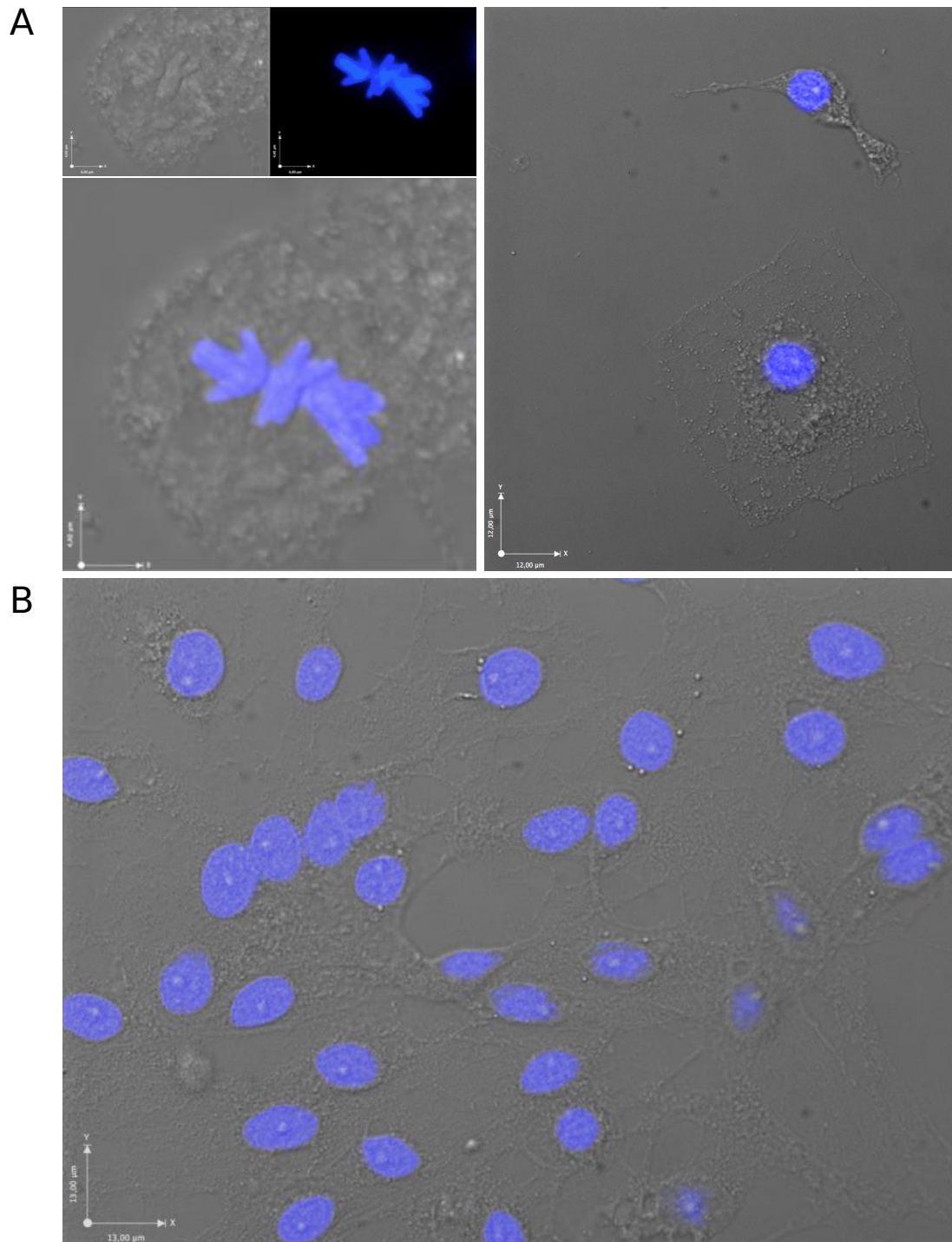


Figure 2

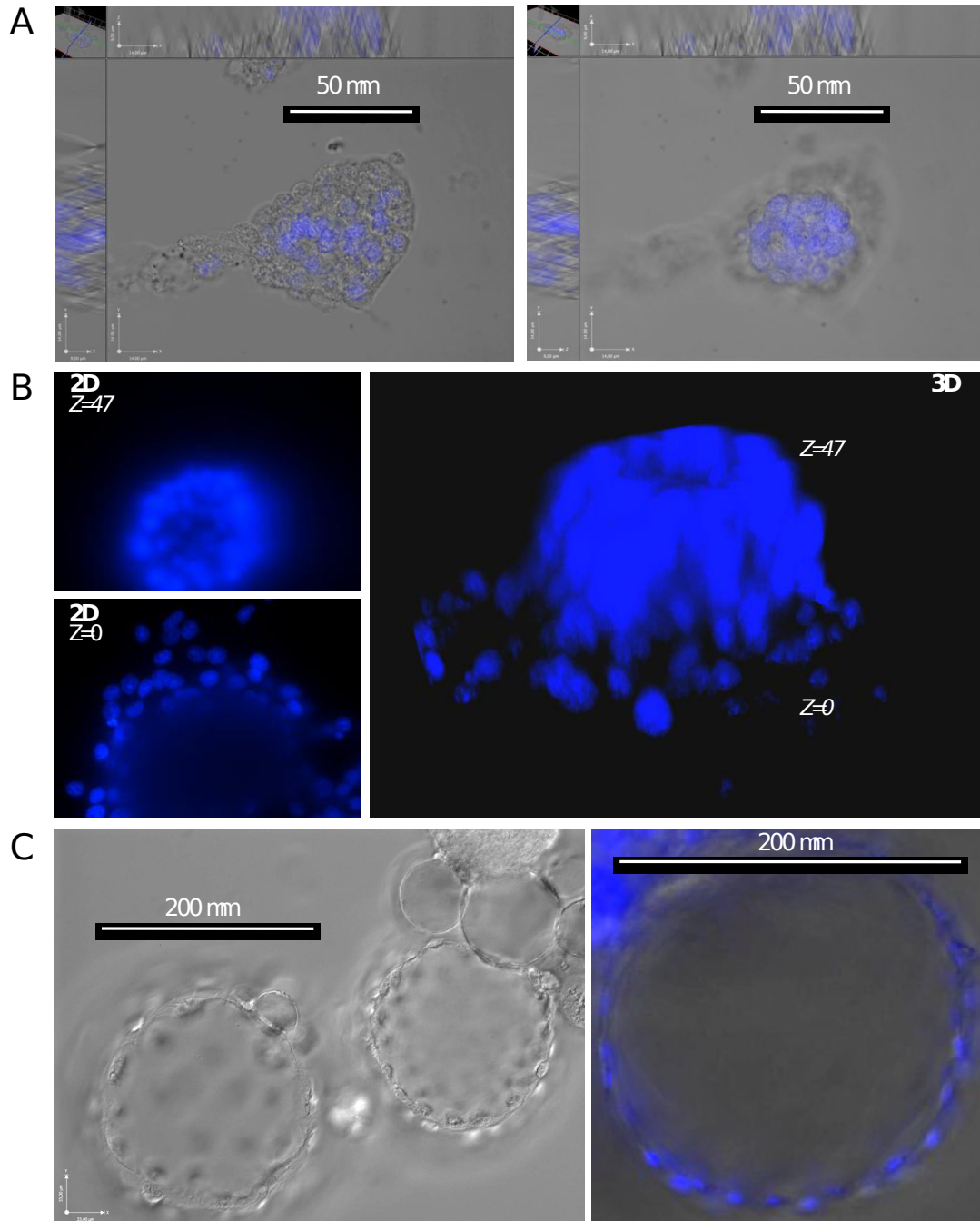


Figure 3

Annexe B

*Séquençage haut débit réalisé au CHU de Grenoble
(Dr Sylvie Iarrat et Elodie Santoni)*

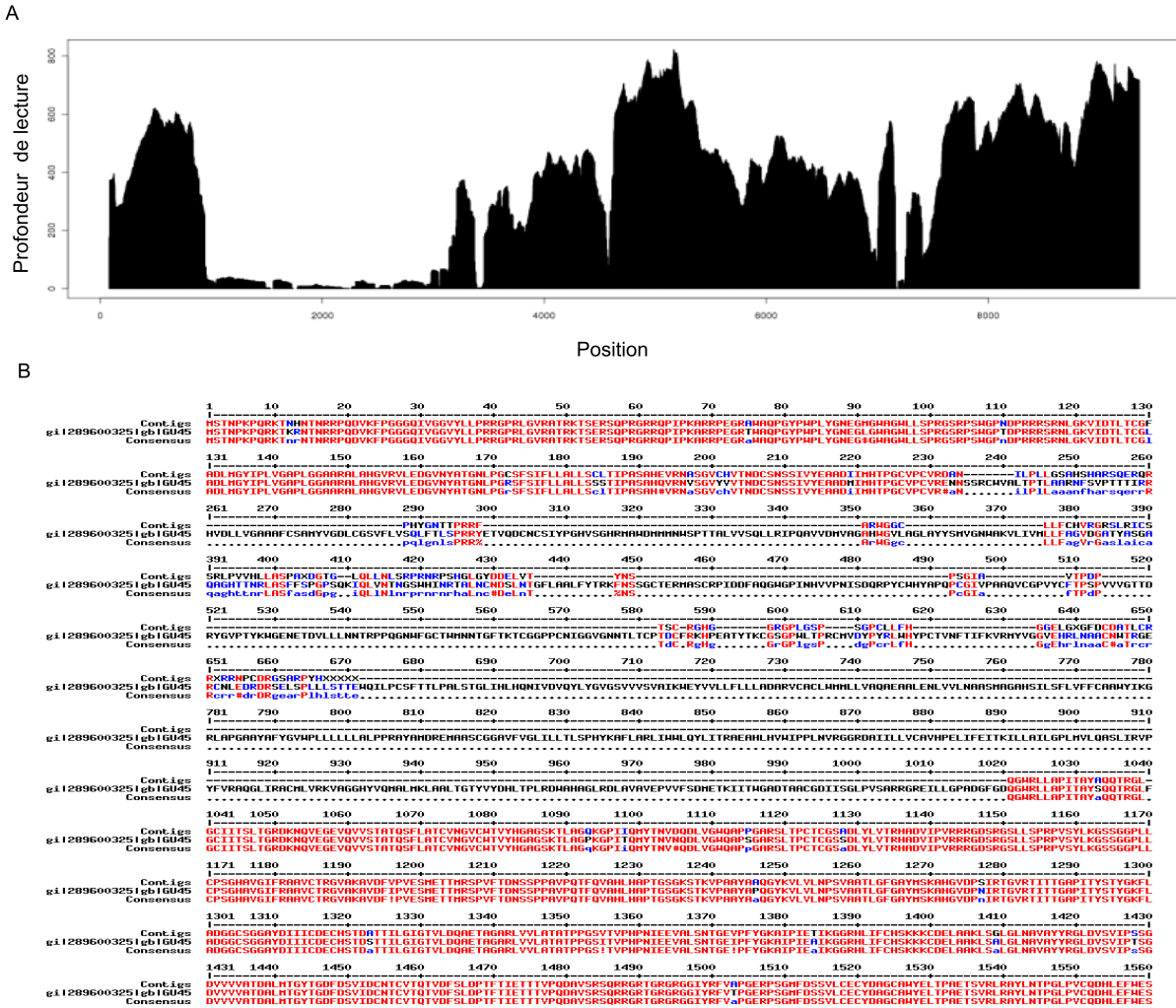


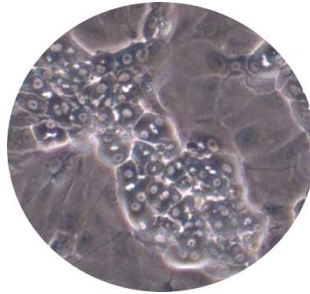
FIGURE B.1.: Bilan du séquençage haut débit réalisé sur les produits d'amplification long de HCV
 (A) Répartition des contigs sur l'ensemble du génome pour l'échantillon 6. Certaines zones et notamment celle située entre 1000 et 3000pb présentent une très faible couverture de lecture. Les zones les mieux couvertes atteignent une profondeur de lecture de près de 700x. (B) Exemple d'alignement des contigs obtenus à l'issue du séquençage 454 d'un échantillon sur la séquence de référence la plus proche à l'aide du logiciel en ligne Multalin®. La deuxième ligne correspond à la séquence de référence issue du site VBRC (GU451219.1), la suivante au contig reconstitué à l'issue du séquençage 454. Les acides aminés marqués en rouge correspondent parfaitement entre les contigs et la séquence de référence. Ceux représentés en bleu diffèrent entre les deux séquences. Les régions en noir sont des zones pour lesquelles les contigs n'ont pas pu être alignés sur la séquence de référence.

Annexe C

HepaRG culture kit for 50 plates

HepaRG[®] CULTURE KIT FOR 50 PLATES

DESCRIPTION AND USE GUIDE FOR THE THAWING AND CULTURE OF CRYOPRESERVED, PROLIFERATING HEPARG[®] CELLS FOR THE PRODUCTION OF 50 PLATES



This description and use guide for the thawing and culture of cryopreserved proliferating HepaRG[®] includes five sections:

Section 1: product description

Section 2: production plans

Section 3: recommended materials, media and cells

Section 4: protocol for the thawing, seeding, maintenance, differentiation and freezing of HepaRG[®] cells

Section 5: cell morphology

LIMITED USE LICENSE

NOTE: READ THIS LIMITED USE LICENSE BEFORE UTILIZING THE HEPARG[®] CELLS

HepaRG[®] cells are patented and by using them in any way, you obligate yourself to comply with this LIMITED USE LICENSE, the terms of which include that you **will** treat them as a disposable product only for *in vitro* studies and destroy cells used in a study or experiment upon its conclusion. This license for KIT901 allows for you to use the HepaRG[®] accompanying these instructions for a maximum time period of six months following receipt of the cells. At the point that you or your facility uses the cells accompanying these instructions to produce more than fifty (50) multiwell plates containing HepaRG[®] cells, this license will lapse. It will also lapse six months following your receipt of the accompanying cells, even if you have not produced fifty multiwell plates at that time. You **will not** propagate, clone, amplify or reproduce HepaRG[®] cells in excess of either the time or volume limits of this license; transfer them to anyone outside your facility; use them as the direct source of commercial product unless you receive prior written approval from Biopredic; or use them for treating or diagnosing disease. In addition, you will be considered as confidential the information of that manual, ie you will not transfer it outside your working team. If you are unwilling to abide by these terms, stop immediately and return the cells for credit; violators of this LIMITED USE LICENSE will be prosecuted to the fullest extent of the law. HepaRG[®] is a trademark owned by Biopredic International.

SECTION 1: PRODUCT DESCRIPTION

HepaRG[®] cells have the unique properties of maintaining significant levels of hepatocyte functions, of being CYP450 inducible and supporting the complete replicative cycle of HBV.

The KIT901 is composed of two frozen vials of proliferating HepaRG[®] cells, ADD710 and ADD720 for working media preparation. The undifferentiated HepaRG[®] cells can be used within three passages after thawing and seeding; and the amount of ADD710 and ADD720 are enough for the generation of 50 plates in the format of 24 wells, 96 wells, and 6 wells.

The procedure of HepaRG[®] culture consists of growth and differentiation stages. After thawing and seeding into plates, proliferating HepaRG[®] cells grow for 14 days to achieve 100% confluence in growth medium which consists of basal medium MIL700 and ADD710. Then, the differentiation of HepaRG[®] cells takes place at day 14 by the replacement of growth medium with differentiation medium which consists of basal medium MIL700 and ADD720. The highly differentiated HepaRG[®] cells have an adult phenotype with normal and stable karyotype, and the enzyme activities of drug metabolizing genes are quite stable during 3-4 week culture condition. After differentiation step, the maintaining of differentiated HepaRG[®] cells requires a larger amount of ADD720 not included in the kit.

SAFETY OF THE MATERIAL

Hepatitis B, hepatitis C and HIV1 viruses undetected by PCR on the cell suspension.

Notice: although controls are performed, human material has to be considered as potentially dangerous. Observe universal precautions in order to protect yourself and your colleagues. Handle the cells in a Level 2-biology safety room.

SECTION 2: PRODUCTION PLANS, ONE OVER THE TWO SHOULD BE CHOSEN FROM THE START BY THE USER

Production plan 1	Passage number	Operation	Number of cell supports
Vial of working bank	P17	Thaw and seed the HepaRG [®] cells (2 vials)	2 x 25cm ² flasks
Cells in monolayer	P18	Subculture the HepaRG [®] cells and seed the cells in 25 cm ² flasks for proliferation	20 x 25cm ² flasks for the HepaRG [®] cell proliferation
Cells in monolayer	P19	Subculture the HepaRG [®] cells and seed the cells in multiwell plates (MWP)	> 50 MWPs for the HepaRG [®] cell differentiation

Production plan 2	Passage number	Operation	Number of cell supports/vials
Vial of working bank at P17	P17	Thaw and seed the HepaRG [®] cells (2 vials)	2 x 25cm ² flasks
Cells in monolayer	P18	Detachment of the cells Production of a working bank at P18 (6 vials)	6 vials
Vials of working bank at passage 18*	P18	Thaw 1 vial and seed the HepaRG [®] cells	1 x 25cm ² flask
Cells in monolayer*	P19	Subculture the HepaRG [®] cells and seed the cells in 25 cm ² flasks for proliferation, and in multiwell plates (MWP) for differentiation	2 x 25cm ² flask 3 MWPs for the HepaRG [®] cell differentiation
Cells in monolayer*	P20	Subculture the HepaRG [®] cells and seed the cells in multiwell plates (MWP) for differentiation	6 MWPs for the HepaRG [®] cell differentiation

* From 1 vial, production of 9 MWPs. With 6 vials, production of > 50 MWPs

SECTION 3: MATERIALS, MEDIA AND CELLS

1 Materials

- Water bath at +37°C
- Laminar flow hood
- Pipet-aid, pipettes and micropipettes
- Multichannel pipettes
- Cryo 1°C freezing container “Mister Frosty” (NALGENE® Labware) or an equivalent cooling box
- Incubator at +37°C, 5% CO₂ and saturating humidity
- Phase-contrast microscope
- Material for cell count (cell counting chamber, coverslips, 0.05% Trypan blue solution)

2 Consumables

Article	Provider	Reference
96 well culture plate (Nunc MicroWell™ plate)	Nunc	167008*
24 well culture plate (BD Falcon™)	Becton Dickinson	353047*
6 well culture plate (BD Falcon™)	Becton Dickinson	353046*
25 cm ² flask (BD Falcon™)	Becton Dickinson	353108*
Freezing vials 2 mL	Nunc	055004*
Polystyrene round-bottom tubes (40mL)		
Petri dishes (92 x 17 mm)		

*References in Europe

3 Media

Article	Provider	Reference	Storage
Basal hepatic cell medium	BIOPREDIC International	MIL700	+4°C
Additives 710 for HepaRG® growth medium	BIOPREDIC International	ADD710**	-20°C
Additives 720 for HepaRG® differentiation medium	BIOPREDIC International	ADD720**	-20°C
Trypan blue (0,4 %)	Sigma-Aldrich®	T8154*	Room temperature
D-PBS 1X	Invitrogen™	14190*	+ 4°C
Trypsin/EDTA 1X (Trypsin, 0.05%)	Invitrogen™	25300*	-20°C
Dimethyl sulfoxide	BIOPREDIC International	DMS168	Room temperature

*References in Europe

**Volume of ADDs needed for the generation of 50 MWP (9 x ADD710; 9 x ADD720)

4 Cells (*Immediately place the cryovial(s) in liquid nitrogen upon receipt*)

HepaRG® cells	Number of viable cells / vial (x10 ⁶)	Reference	Conditions of	
			Shipping	Storage
Cryopreserved undifferentiated HepaRG® cells	≥ 1	HPR109	Dry ice	Liquid nitrogen

North America:
5801 West 129th Street #101
Overland Park, KS 66209-3605
913-851-1588
david.steen@biopredic.com

Corporate Headquarters:
8-18 rue de Professeur Jean Pecker
35000 Rennes France
33 (0)2 99 14 36 14
www.biopredic.com

**SECTION 4: PROTOCOL FOR THE THAWING, SEEDING,
MAINTENANCE, DIFFERENTIATION AND FREEZING
OF HEPARG[®] CELLS**

***NOTE: OBSERVE UNIVERSAL PRECAUTIONS WHEN HANDLING HepaRG[®] CELLS AND TREAT ALL
BIOLOGIC MATERIAL AS POTENTIALLY INFECTIOUS
THE FOLLOWING STEPS MUST BE PERFORMED UNDER A LAMINAR FLOW HOOD.***

1. Media preparation

1.1 HepaRG[®] WORKING GROWTH MEDIUM 710

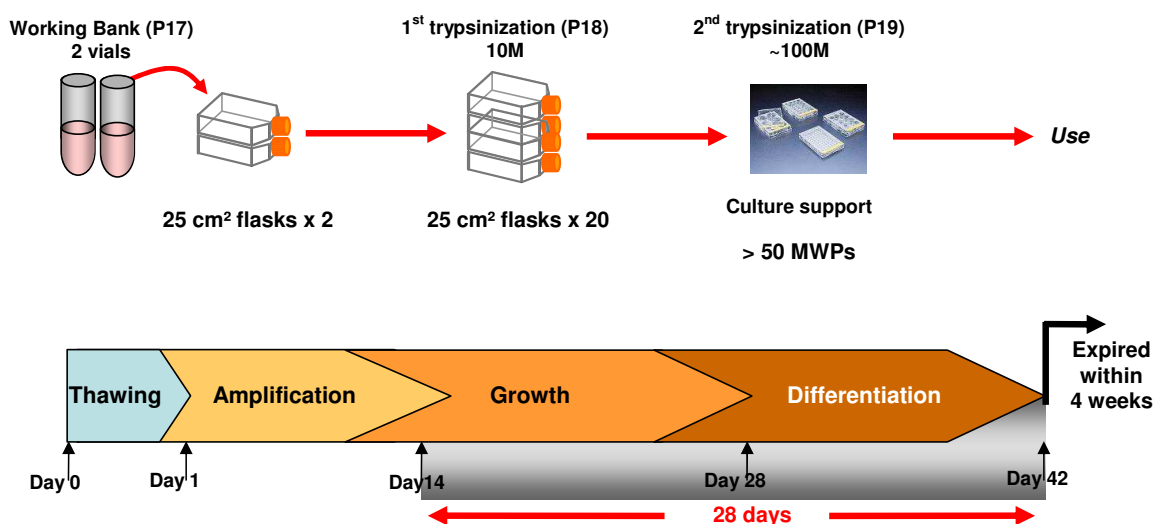
- Thaw the HepaRG[®] Growth Medium Supplement (ADD710) by placing the bottle in a +37°C water bath until completely thawed.
- Prepare working HepaRG[®] Growth Medium 710 by adding the entire contents of the bottle of ADD710 to 500 mL of Base Medium.
- The working HepaRG[®] Growth Medium 710 is now ready for use. It should be stored at +4°C for a maximum of one month.

1.2 HepaRG[®] WORKING DIFFERENTIATION MEDIUM 720

- Thaw the HepaRG[®] Differentiation Medium Supplement (ADD720) by placing the bottle in a +37°C water bath until completely thawed.
- Prepare working HepaRG[®] Differentiation Medium 720 by adding the entire contents of the bottle of ADD720 to 500 mL of Base Medium.
- The working HepaRG[®] Differentiation Medium 720 is now ready for use. It should be stored at +4°C for a maximum of one month.

2. Thawing, Seeding, Maintenance and Differentiation of HepaRG[®] cells

FOLLOWING SCHEMATIC IS FOR SUGGESTED PRODUCTION PLAN 1 see page 3.



2.1 Thawing and seeding

1. In order to thaw cells, use the working HepaRG[®] Growth Medium 710.
2. Pre-warm the working HepaRG[®] Growth Medium 710 in a 37°C water bath.
3. Prepare a sterile 40 mL polystyrene round bottom tube with 4.5 mL of warmed working HepaRG[®] Growth Medium 710 per 0.5 mL HepaRG[®] cryovial. The dilution must be 1/10.
4. Prepare a 70% ethyl alcohol absorbent paper.
5. Remove cryovial(s) from liquid nitrogen. Under a laminar flow hood, briefly twist the cap a quarter turn to relieve the internal pressure, and then close again.
6. Quickly transfer the cryovial(s) to a 37°C water bath. While holding the tip of the vial, gently agitate for 1-2 minutes, being careful not to allow water to penetrate the cap. **Do not submerge it completely.**
7. Watch the cryovial(s) closely. When just a small crystal of ice remains, remove it from the water bath.
8. Wipe the outside of the vial(s) with 70 % ethyl alcohol absorbant paper and place it under a laminar flow hood.
9. Aseptically transfer the cell suspension into the medium warmed in the polystyrene round bottom tube.
10. Rinse the cryovial(s) once with the working HepaRG[®] Growth Medium 710.

11. Count the cells using Trypan Blue and a Nageotte Chamber to assess cell number and viability (see 2.2).
12. Transfer the cells into 25 cm² flasks (cell suspension from 1 vial in 1 flask)..
13. Gently shake the 25 cm² flasks in a back-and-forth and side-to-side manner, and control visually the homogeneity of cell suspension.
Carefully place the 25 cm² flasks into an incubator at 37°C, 5% CO₂ and saturating humidity.
14. Six hours after seeding, observe cell morphology under phase-contrast microscope, if possible, take photomicrographs, and renew the medium (see 2.3).
For maintenance of the cells see 2.3.

2.2 Cell viability measurement and cell counting

1. Gently homogenize the cell suspension.
2. In a 5 mL polystyrene round bottom tube, dilute 100 µL of the cell suspension in 100 µL of trypan blue solution at 0.05%.
3. Gently homogenize the obtained cell suspension.
4. Proceed to observation and counting using a Nageotte chamber: observe under microscope. Living cells exclude the dye, dead cells take up the dye and appear blue. Count the living and dead cells and calculate cell viability and cell concentration.

2.3 Maintenance of cells

1. Maintain the 25 cm² flasks in the working HepaRG[®] Growth Medium 710 for 2 weeks.
2. Renew the medium (5 mL per flask) (see 2.7) every 2 or 3 days after microscopic observations.
3. After the 2 weeks of proliferation, proceed to subculture of the cells (see 2.4).

2.4 Subculture and seeding

1. To trypsinise cells, use the working HepaRG[®] Growth Medium 710.
2. Pre-warm D-PBS 1X, trypsin/EDTA solution and HepaRG[®] working growth medium in a 37°C water bath.
3. Aspirate medium from the 25 cm² flask(s) at passage P, and rinse the monolayer twice with 5 mL sterile D-PBS 1X.
4. Remove the D-PBS 1X and detach the cells by adding 1 mL trypsin/EDTA solution. After 3 to 5 minutes at 37°C, tap the flask gently to detach the cells.
5. Neutralize trypsin by adding 5 mL of the working HepaRG[®] Growth Medium 710 directly into the flask.
6. Pipette gently up and down, once or twice, in order to break up the bigger clusters.
7. Transfer the cell suspension into a sterile 40 mL polystyrene round bottom tube or a sterile bottle.

8. Rinse the 25 cm² flask(s) with 1 mL of the working HepaRG[®] Growth Medium 710, and add to cell suspension.
9. Count the cells using Trypan Blue solution 0.05% to assess cell number and viability (see 2.2, with a 1/10 dilution in trypan blue solution).
10. Seed the cells in the working HepaRG[®] Growth Medium 710, in appropriate supports according to the following table:

Cell culture support	Number of cells per well or support (10 ⁶)	Volume per well or support (ml)
96 well plate*	0.009	0.1
24 well plate*	0.055	0.5
6 well plate*	0.2	2
25 cm ² flask**	0.5	5

* Used for HepaRG[®] cell line differentiation

** Used for HepaRG[®] cell line maintaining

11. Except for the 96 well plates, gently agitate the supports in a back-and-forth and side-to-side manner, and control visually the homogeneity of cell suspension.
Carefully place the culture supports into an incubator at 37°C, 5% CO₂ and saturating humidity.
Note: At this stage, in a record, the cells are now in passage P+1.
12. To maintain the cell line, continue to step 2.5.
13. However, to induce differentiation, follow instructions under step 2.6.

2.5 HepaRG cells maintenance

1. Maintain the 25 cm² flasks in the working HepaRG[®] Growth Medium 710 for 2 weeks. Renew the medium (5 mL per flask) (see 2.7) every 2 or 3 days after microscopic observations.
Note: At this stage, the cells must have reached confluency.
2. After the 2 weeks of proliferation, repeat step 2.4.

2.6 HepaRG cells differentiation

1. Maintain the plates in the working HepaRG[®] Growth Medium 710 for 2 weeks. Renew the medium (see 2.7) every 2 or 3 days after cell morphology observations.
Note: At this stage, the cells must have reached confluency.
2. Remove the working HepaRG[®] Growth Medium 710 and replace with the working HepaRG[®] Differentiation Medium 720 for 2 more weeks (**for the first 2-3 days, dilute HepaRG[®] working differentiation medium half with HepaRG[®] working growth medium**). Renew the medium every 2 or 3 days (see 2.7) after cell morphology observations.
Note: At this stage, the cells reach a differentiated hepatocyte-like morphology and express liver-specific functions.
Cells can then be maintained in the working HepaRG[®] Differentiation Medium 720 for 3-4 weeks further. The maintaining of differentiated cells requires a larger amount of the working HepaRG[®]

Differentiation Medium 720 not included in the kit: 12 mL / 24 or 06 MWP / medium change, or 9.6 mL / 96 MWP / medium change.

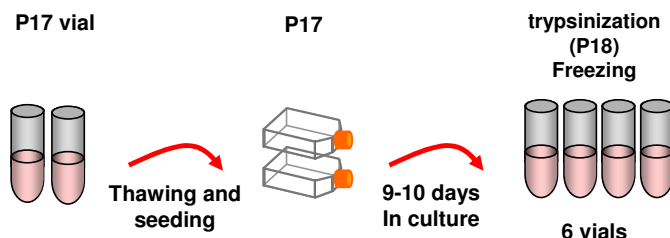
2.7 Renewal of the medium

USE A CULTURE MEDIUM PRE-WARMED AT ROOM TEMPERATURE

1. Renewal of the medium in 96 well plate(s)
 - Transfer some culture medium into a 92 x 17 mm Petri dish.
 - Remove the lid from the plate.
 - Aspirate the existing medium from the plate.
 - Add **gently** 100 µL of medium into each well with a multichannel pipette. Take care not to pipette down the medium directly on the cells.
 - Control visually the medium level in the wells.
 - Put the lid back on the plate.
2. Renewal of the medium in 24 well plates
 - Transfer some culture medium into a 92 x 17 mm Petri dish.
 - Remove the lid from the plate.
 - Aspirate the existing medium from the plate.
 - Add **gently** 500 µL of medium into each well with a multichannel pipette. Take care not to pipette down the medium directly on the cells.
 - Control visually the medium level in the wells.
 - Put the lid back on the plate.
3. Renewal of the medium in 6 well plates
 - Remove the lid from the plate.
 - Aspirate the existing medium from the plate.
 - Add gently 2 mL of medium into each well with a pipette. Take care not to pipette down the medium directly on the cells.
 - Put the lid back on the plate.
4. Renewal of the medium in a 25 cm² flask
 - Remove the cap from the flask(s).
 - Aspirate the existing medium from the flasks.
 - Transfer 5 mL of medium into a 25 cm² flask. Take care not to pipette down the medium directly on the cells.
 - Replace the cap on the flask.

3. Working bank production

FOLLOWING SCHEMATIC IS FOR WORKING BANK PRODUCTION: “PRODUCTION PLAN 2”, see page 3.

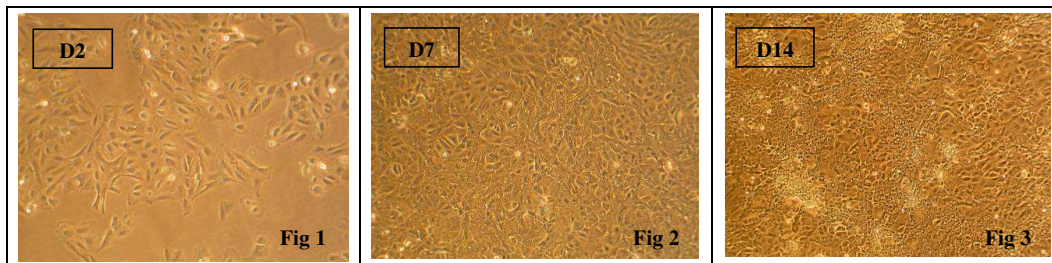


1. Thaw and seed the cells (see 2.1).
2. After 9-10 days in culture, trypsinize the cells (see 2.4).
3. Count the cells using Trypan Blue solution 0.05% to assess cell number and viability (see 2.2, with a 1/10 dilution in trypan blue solution).
4. Freeze the cells
 - Determine total number of cells to be frozen.
 - Determine number of vials to be frozen (1.5 million cells / 500 µL vial).
 - Determine the required final volume.
 - Place at 4°C Cryo 1°C freezing container(s) “Mister Frosty” with 100% isopropyl alcohol.
 - Place the freezing vials on ice.
 - Prepare double strength DMSO freezing medium (HepaRG[®] working growth medium + 20% DMSO, half the required final volume).
 - Place at 4°C HepaRG[®] working growth medium and double strength DMSO freezing medium.
 - Centrifuge cell suspension **at 500g during 3 min at +4°C**.
 - Resuspend cell pellet in HepaRG[®] working growth medium in half the required final volume.
 - Keep cell suspension on ice.
 - Add slowly and drop-wise while mixing an equal volume than growth medium containing the cells, of double strength DMSO freezing medium.
 - Dispense 500 µL of final mixture per sterile freezing vial.
 - Transfer the vials into Cryo 1°C freezing container(s) “Mister Frosty”.
 - Place overnight the Cryo 1°C freezing container(s) “Mister Frosty” at -80°C.
 - Transfer into liquid nitrogen.

SECTION 4: CELL MORPHOLOGY

1 PROLIFERATION PERIOD

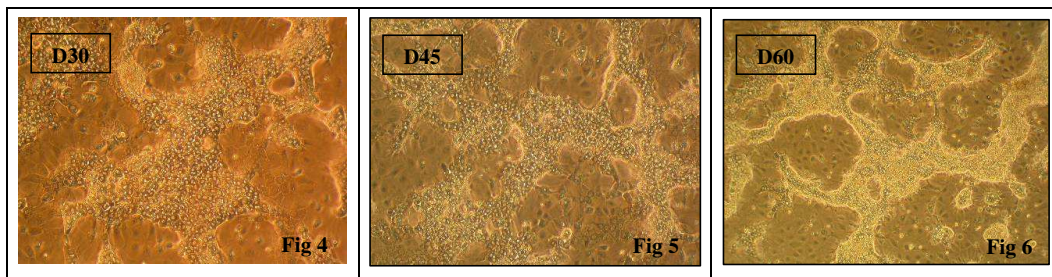
- After 2 or 3 days of culture, HepaRG[®] cells appear in small undifferentiated colonies (Fig.1).
- During the proliferation period, HepaRG[®] cells appear as a homogeneous cell population with an epithelial phenotype showing no regular structural organization (Fig.2).
- Then, when reaching confluency, cells undergo progressive morphological changes and granular hepatocyte-like cells appear (Fig. 3).

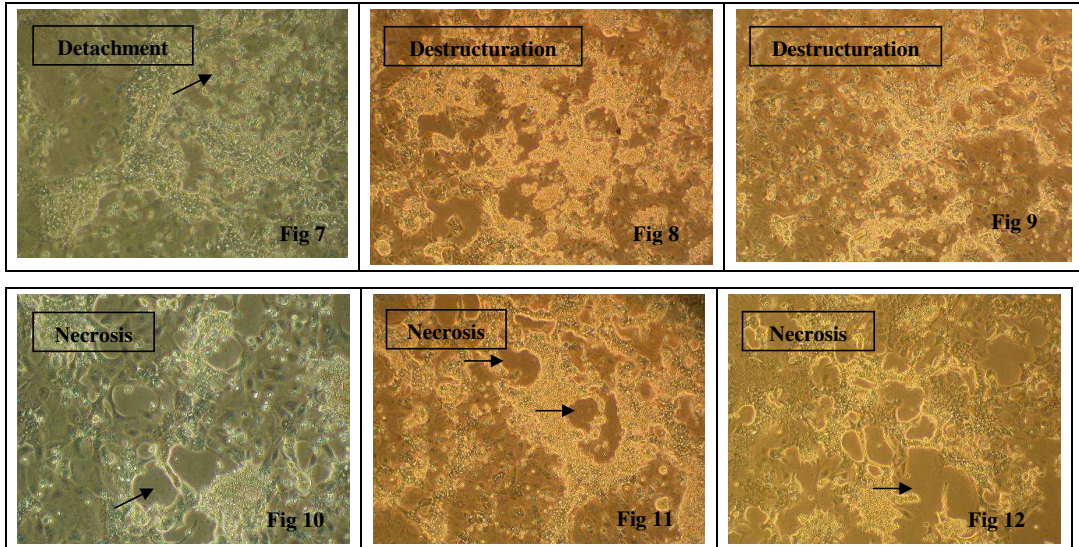


2 DIFFERENTIATION PERIOD

- Two weeks after plating, addition HepaRG[®] working differentiation medium induces hepatocyte-like cells to organize in well delineated trabeculae with many bright canaliculi-like structures.
- Differentiated HepaRG[®] cells can then be maintained in HepaRG[®] working differentiation medium for 4 additional weeks (Fig. 4-6)

Figures 7-12 show cell suffering: detachment (fig 7), destructuration (fig 8, 9), necrosis (fig 10, 11, 12).





REFERENCES

<p>2002 Gripon P., & al, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>, 99(24):15655-60, 2002</p> <p>2003 Sureau C. & al, <i>J Virol.</i>, 77(9): 5519-23, 2003</p> <p>2004 Parent R. & al, <i>Gastroenterology</i>, 126(4):1147-56, 2004</p> <p>2005 Barraud L. & al, <i>J Hepatol.</i>, 42(5):736-43, 2005 Gripon P. & al, <i>J Virol.</i>, 79(3):1613-22, 2005 Jaoudé G.A. & al, <i>J Virol.</i>, 79(16):10460-6, 2005</p> <p>2006 Aninat C. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 34(1):75-83, 2006 Antoun J. & al, <i>FEBS Lett.</i>, 580(14):3361-7, 2006 Blanchet M. & al, <i>J Virol.</i>, 80(24):11935-45, 2006 Engelke M. & al, <i>Hepatology</i>, 43(4):750-60, 2006 Le Vee M. & al, <i>Eur. J Pharm. Sci.</i>, 28(1-2):109-17, 2006 Rabe B. & al, <i>J Virol.</i>, 80(11):5465-73, 2006 Troade M.B. & al, <i>Genomics</i>, 87(1):93-103, 2006</p> <p>2007 Abou-Jaoudé G. & al, <i>J Virol.</i>, 81(23):13057-66, 2007 Cerec V. & al, <i>Hepatology</i>, 45(4):957-67, 2007 Glebe D. & al, <i>World J Gastroenterol.</i>, 13(1):22-38, 2007 Guillouzo A. & al, <i>Chem. Biol. Interact.</i>, 168(1):66-73, 2007 Kirkland D. & al, <i>Mutat. Res.</i>, 628(1):31-55, 2007 Nagasawa M. & al, <i>Biochem. Pharmacol.</i>, 74(12):1738-46, 2007 Parent R. & al, <i>Cancer Res.</i>, 67(9):4337-45, 2007 Schulze A. & al, <i>Hepatology</i>, 46(6):1759-68, 2007</p> <p>2008 Aninat C. & al, <i>Crit. Care Med.</i>, 36(3):848-54, 2008 Antoun J. & al, <i>J Lipid Res.</i>, 49(10):2135-41, 2008 Guillouzo A., <i>Ann. Pharm. Fr.</i>, 66(5-6):288-95, 2008 Guillouzo A. & al, <i>Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.</i>, 4(10):1279-94, 2008 Jossé R. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 36(6):1111-8, 2008 Kanebratt K.P. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 36(1):137-45, 2008 Kanebratt K.P. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 36(7):1444-52, 2008 Le Vee M. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 36(2):217-22, 2008 Lucifora J. & al, <i>J Gen. Virol.</i>, 89(Pt 8): 1819-28, 2008 Maire M. & al, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>, 368(3):556-62, 2008 Parent R. & al, <i>Genome Biol.</i>, 9(1):R19, 2008 Petit E. & al, <i>Toxicol. In Vitro</i>, 22(3):632-42, 2008</p> <p>2009 Bazin E. & al, <i>Environ. Mol. Mutagen.</i>, 51(3):251-259, 2009 Hantz O. & al, <i>J Gen. Virol.</i>, 90(Pt 1):127-35, 2009 Kaneko A. & al, <i>Xenobiotica</i>, 39(11):803-10, 2009 Lambert C.B. & al, <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i>, 234(3):345-60, 2009 Lambert C.B. & al, <i>Toxicol. in vitro</i>, 23(3):466-75, 2009 Le Duff Y. & al, <i>J Virol.</i>, 83(23):12443-51, 2009 Legendre C. & al, <i>Eur. J Cancer</i>, 45(16):2882-92, 2009</p>	<p>2009 Lepère-Douard C. & al, <i>J Virol.</i>, 83(23):11819-29, 2009 McGinnity D.F. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 37(6):1259-68, 2009 Narayan R. & al, <i>J Proteome Res.</i>, 8(1):118-22, 2009 Ndongo N. & al, <i>J Med. Virol.</i> 1(10):1726-33, 2009 Turpeinen M. & al, <i>Toxicol In Vitro</i>, 23(4):748-53, 2009 Villet S. & al, <i>Gastroenterology</i>, 136(1):168-76, 2009 Vincent I.E. & al, <i>Antivir. Ther.</i>, 14(1):131-5, 2009</p> <p>2010 Andersson T.B., <i>Methods Mol. Biol.</i>, 640:375-87, 2010 Antherieu S. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 38(3):516-25, 2010 Bednarkiewicz A. & al, <i>J Biomed. Opt.</i>, 15(2):028002, 2010 Dumont J. & al, <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i>, 245(2):256-63, 2010 Dumont J. & al, <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i>, 249(1):91-100, 2010 Everett R.D., <i>J Virol.</i>, 84(7):3695-8, 2010 Gaboriau F. & al, <i>Biometals</i>, 23(2):231-45, 2010 Grime K. & al, <i>Curr. Drug Metab.</i>, 11(10):870-85, 2010 Guguen-Guillouzo C. & al, <i>Toxicology</i>, 270(1):3-9, 2010 Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A., <i>Methods Mol. Biol.</i>, 640:1-40, 2010 Hart S.N. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 38(6):988-94, 2010 Jennen D.G. & al, <i>Toxicol. Sci.</i>, 115(1):66-79, 2010 Jiang L. & al, <i>Transplant Proc</i>, 42(9):3773-8, 2010 Kanebo A. & al, <i>Xenobiotica</i>, 40(12):791-9, 2010 Latzague L. & al, <i>J Enzyme Inhib. Med. Chem.</i>, 26(2):204-15, 2010 Laurent V. & al, <i>Biotechnol. J.</i>, 5(3):314-20, 2010 Le Hegarat L. & al, <i>Mutagenesis</i>, 25(6):555-60, 2010 Le Vee M. & al, <i>Toxicol. in Vitro</i>, 24(6):1775-81, 2010 Lucifora J. & al, <i>Hepatology</i>, 51(1):63-72, 2010 Macovei A. & al, <i>J Virol.</i>, 84(1):243-53, 2010 Marion M.J., <i>Methods Mol. Biol.</i>, 640:261-72, 2010 McGill M.R. & al, <i>Hepatology</i>, 53(3):974-82, 2011 Mercey E. & al, <i>Biomaterials</i>, 31(12):3156-65, 2010 Ni Y. & al, <i>J Virol.</i>, 84(8):3879-88, 2010 Rodriguez-Lucena D. & al, <i>Bioorg. Med. Chem.</i>, 18(2):689-95, 2010 Rouge P. & al, <i>J Enzyme Inhib. Med. Chem.</i>, 25(2):216-27, 2010 Shulze A. & al, <i>J Virol.</i>, 84(4):1989-2000, 2010 Sureau C., <i>Methods Mol. Biol.</i>, 640:463-73, 2010 Tajri K. & al, <i>Antiviral Res.</i>, 87(1):40-9, 2010 Tuoi Do T.H. & al, <i>Alcohol Clin. Exp. Res.</i>, [Epub ahead of print] Wang L. & al, <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 38(12):2226-31, 2010 Xie Y. & al, <i>Pathol. Biol.</i>, 58(4):301-7, 2010</p> <p>2011 Antherieu S & al, <i>Hepatology</i>, 2011 [Epub ahead of print] Ceelen L. & al, <i>Biochem. Pharmacol.</i>, 2011 [Epub ahead of print] Darnell M & al., <i>Drug Metab. Dispos.</i>, 2011 [Epub ahead of print] Lübberstedt M. & al, <i>J Pharmacol. Toxicol. Methods</i>, 63(1):59-68, 2011 Lucifora J. & al, <i>J. Hepatol.</i>, 2011 [Epub ahead of print]</p>
--	---

Annexe D

Bilan des séquençages

A



B

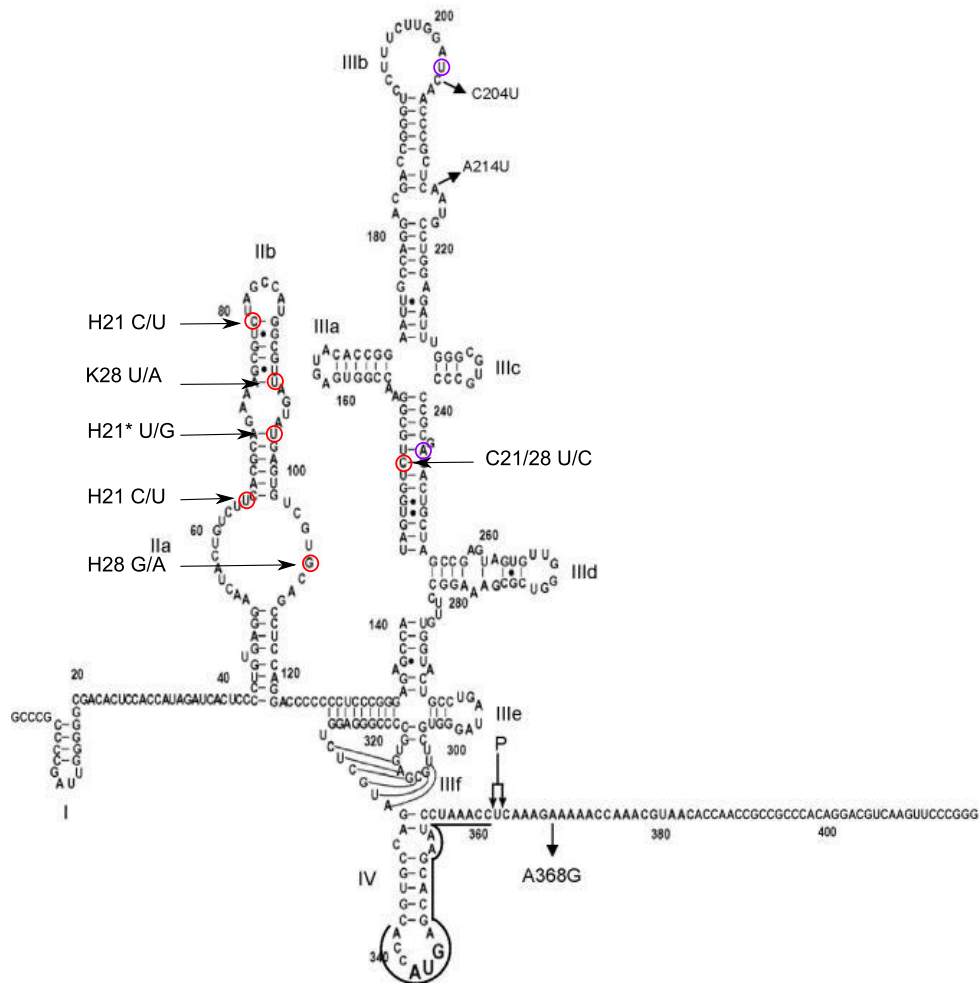


FIGURE D.1.:

(A) Alignement des séquences de la région IRES des échantillons LAT (inoculum génotype 3a), des échantillons issus de l'infection par HCV. H a été utilisé pour HepaRG, C pour C6/36 (*Aedes albopictus*) et K pour les *kt-mos1* (*Aedes aegypti*). les jours post infection ont été mentionnés après les lettres C, K H pour chaque échantillons. (B) Afin de visualiser les mutations, celles-ci ont été placées sur le structure secondaire de IRES et sont symbolisées par un rond rouge. Les ronds violet indiquent les mutations déjà observées chez *Aedes vexans* et l'étoile (*) indique une mutation récurrente chez l'homme []. Le format d'écriture des mutations sont le nom de l'espèce symbolisé par (k/C/H) + la date de récolte (21 ou 28) et la base de l'inoculum / la mutation observée)

Bibliographie

- M. Ait-Goughoulte, T. Kanda, K. Meyer, J. S. Ryerse, R. B. Ray, and R. Ray. Hepatitis c virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *Journal of virology*, 82(5) :2241–2249, Mar. 2008. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.02093-07. PMID : 18077704.
- S. Akira and H. Hemmi. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology letters*, 85(2) :85–95, Jan. 2003. ISSN 0165-2478. PMID : 12527213.
- S. Akira and K. Takeda. Functions of toll-like receptors : lessons from KO mice. *Comptes rendus biologies*, 327(6) :581–589, June 2004. ISSN 1631-0691. PMID : 15330257.
- N. Ali and A. Siddiqui. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis c virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *Journal of virology*, 69(10) :6367–6375, Oct. 1995. ISSN 0022-538X. PMID : 7666538.
- N. Ali, G. J. Pruijn, D. J. Kenan, J. D. Keene, and A. Siddiqui. Human la antigen is required for the hepatitis c virus internal ribosome entry site-mediated translation. *The Journal of biological chemistry*, 275(36) :27531–27540, Sept. 2000. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M001487200. PMID : 10856291.
- T. Allander, K. Drakenberg, A. Beyene, D. Rosa, S. Abrignani, M. Houghton, A. Widell, L. Grillner, and M. A. Persson. Recombinant human monoclonal antibodies against different conformational epitopes of the e2 envelope glycoprotein of hepatitis c virus that inhibit its interaction with CD81. *The Journal of general virology*, 81(Pt 10) :2451–2459, Oct. 2000. ISSN 0022-1317. PMID : 10993933.
- H. J. Alter, P. V. Holland, and R. H. Purcell. The emerging pattern of post-transfusion hepatitis. *The American journal of the medical sciences*, 270(2) :329–334, Oct. 1975. ISSN 0002-9629. PMID : 1235474.
- H. J. Alter, R. H. Purcell, P. V. Holland, and H. Popper. Transmissible agent in non-a, non-b hepatitis. *Lancet*, 1(8062) :459–463, Mar. 1978. ISSN 0140-6736. PMID : 76017.
- Y. Amako, K. Tsukiyama-Kohara, A. Katsume, Y. Hirata, S. Sekiguchi, Y. Tobita, Y. Hayashi, T. Hishima, N. Funata, H. Yonekawa, and M. Kohara. Pathogenesis of hepatitis c virus infection in tupaia belangeri. *Journal of virology*, 84(1) :303–311, Jan. 2010. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.01448-09. PMID : 19846521.
- P. André, F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Bréchet, G. Paranhos-Baccalà, and V. Lotteau. Characterization of low- and very-low-density hepatitis c virus RNA-containing particles. *Journal of virology*, 76(14) :6919–6928, July 2002. ISSN 0022-538X. PMID : 12072493.
- N. Appel, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. Mutational analysis of hepatitis c virus nonstructural protein 5A : potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *Journal of virology*, 79(5) :3187–3194, Mar. 2005. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.79.5.3187-3194.2005. PMID : 15709040.
- N. Appel, T. Schaller, F. Penin, and R. Bartenschlager. From structure to function : new insights into hepatitis c virus RNA replication. *The Journal of biological chemistry*, 281(15) :9833–9836, Apr. 2006. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.R500026200. PMID : 16407182.

- . Arrêté du 16 juillet. Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en oeuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes, 2007. URL <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000465273dateTexte=categorieLi>
- R. Ashford. When is a reservoir not a reservoir? *Emerging Infectious Diseases*, 9(11) :1495–1496, Nov. 2001. ISSN 1080-6040, 1080-6059. doi : 10.3201/eid0911.030088.
- T. Asselah, L. Rubbia-Brandt, P. Marcellin, and F. Negro. Steatosis in chronic hepatitis c : why does it really matter? *Gut*, 55(1) :123–130, Jan. 2006. ISSN 0017-5749. doi : 10.1136/gut.2005.069757. PMID : 16344578.
- C. Bain, A. Fatmi, F. Zoulim, J. P. Zarski, C. Trépo, and G. Inchauspé. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis c infection. *Gastroenterology*, 120(2) :512–524, Feb. 2001. ISSN 0016-5085. PMID : 11159892.
- D. Bankwitz, E. Steinmann, J. Bitzegeio, S. Ciesek, M. Friesland, E. Herrmann, M. B. Zeisel, T. F. Baumert, Z.-y. Keck, S. K. H. Fong, E.-I. Pécheur, and T. Pietschmann. Hepatitis c virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *Journal of virology*, 84(11) :5751–5763, June 2010. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.02200-09. PMID : 20357091.
- G. Barba, F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M. J. Chapman, T. Miyamura, and C. Bréchet. Hepatitis c virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4) :1200–1205, Feb. 1997. ISSN 0027-8424. PMID : 9037030.
- R. Bartenschlager, L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. Kinetic and structural analyses of hepatitis c virus polyprotein processing. *Journal of virology*, 68(8) :5045–5055, Aug. 1994. ISSN 0022-538X. PMID : 8035505.
- R. Bartenschlager, M. Frese, and T. Pietschmann. Novel insights into hepatitis c virus replication and persistence. *Advances in virus research*, 63 :71–180, 2004. ISSN 0065-3527. doi : 10.1016/S0065-3527(04)63002-8. PMID : 15530561.
- H. Barth, C. Schafer, M. I. Adah, F. Zhang, R. J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T. H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H. E. Blum, and T. F. Baumert. Cellular binding of hepatitis c virus envelope glycoprotein e2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry*, 278(42) :41003–41012, Oct. 2003. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M302267200. PMID : 12867431.
- H. Barth, E. K. Schnober, F. Zhang, R. J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F.-L. Cosset, A. H. Patel, H. E. Blum, and T. F. Baumert. Viral and cellular determinants of the hepatitis c virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of virology*, 80(21) :10579–10590, Nov. 2006. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.00941-06. PMID : 16928753.
- H. Barth, E. Robinet, T. J. Liang, and T. F. Baumert. Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions. *Journal of hepatology*, 49(1) :134–142, July 2008. ISSN 0168-8278. doi : 10.1016/j.jhep.2008.03.012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2529177/>. PMID : 18457898 PMCID : PMC2529177.

- B. Bartosch, J. Bukh, J.-C. Meunier, C. Granier, R. E. Engle, W. C. Blackwelder, S. U. Emerson, F.-L. Cosset, and R. H. Purcell. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis c virus : evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24) :14199–14204, Nov. 2003a. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.2335981100. PMID : 14617769.
- B. Bartosch, J. Dubuisson, and F.-L. Cosset. Infectious hepatitis c virus pseudo-particles containing functional e1-e2 envelope protein complexes. *The Journal of experimental medicine*, 197(5) :633–642, Mar. 2003b. ISSN 0022-1007. PMID : 12615904.
- R. Bataller, Y.-H. Paik, J. N. Lindquist, J. J. Lemasters, and D. A. Brenner. Hepatitis c virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 126(2) :529–540, Feb. 2004. ISSN 0016-5085. PMID : 14762790.
- T. F. Baumert, S. Ito, D. T. Wong, and T. J. Liang. Hepatitis c virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *Journal of virology*, 72(5) :3827–3836, May 1998. ISSN 0022-538X. PMID : 9557666.
- T. F. Baumert, J. Vergalla, J. Satoi, M. Thomson, M. Lechmann, D. Herion, H. B. Greenberg, S. Ito, and T. J. Liang. Hepatitis c virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology*, 117(6) :1397–1407, Dec. 1999. ISSN 0016-5085. PMID : 10579981.
- G. Berke. The CTL's kiss of death. *Cell*, 81(1) :9–12, Apr. 1995. ISSN 0092-8674. PMID : 7536631.
- D. Bicout. Conditions climatiques et maladies vectorielles. *Environnement, Risques & Santé.*, 4 : 77–78, 2005.
- E. Blanchard, D. Brand, S. Trassard, A. Goudeau, and P. Roingard. Hepatitis c virus-like particle morphogenesis. *Journal of Virology*, 76(8) :4073–4079, Apr. 2002. ISSN 0022-538X, 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.76.8.4073-4079.2002. URL <http://jvi.asm.org/content/76/8/4073>. PMID : 11907246.
- K. J. Blight, A. A. Kolykhalov, and C. M. Rice. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5498) :1972–1974, Dec. 2000. ISSN 0036-8075. PMID : 11110665.
- J. G. Bode, S. Ludwig, C. Ehrhardt, U. Albrecht, A. Erhardt, F. Schaper, P. C. Heinrich, and D. Häusinger. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(3) :488–490, Mar. 2003. ISSN 1530-6860. doi : 10.1096/fj.02-0664fje. PMID : 12551851.
- P. Borowski, S. Schalinski, and H. Schmitz. Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis c virus as a target for antiviral therapy. *Antiviral research*, 55(3) :397–412, Sept. 2002. ISSN 0166-3542. PMID : 12206878.
- D. Borror, C. Triplehorn, and N. Johnson. An introduction to the study of insects. *Saunders College Publishing*, page 875, 1989.
- D. G. Bowen and C. M. Walker. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis c virus infection. *Nature*, 436(7053) :946–952, Aug. 2005. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/nature04079. PMID : 16107834.
- A. G. Bowie and L. Unterholzner. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signaling. *Nature reviews. Immunology*, 8(12) :911–922, Dec. 2008. ISSN 1474-1741. doi : 10.1038/nri2436. PMID : 18989317.

- D. W. Bradley. Studies of non-a, non-b hepatitis and characterization of the hepatitis c virus in chimpanzees. *Current topics in microbiology and immunology*, 242 :1–23, 2000. ISSN 0070-217X. PMID : 10592653.
- V. Brass, E. Bieck, R. Montserret, B. Wölk, J. A. Hellings, H. E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis c virus nonstructural protein 5A. *The Journal of biological chemistry*, 277(10) :8130–8139, Mar. 2002. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M111289200. PMID : 11744739.
- M. Brazzoli, A. Bianchi, S. Filippini, A. Weiner, Q. Zhu, M. Pizza, and S. Crotta. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis c virus infection of human hepatocytes. *Journal of virology*, 82(17) :8316–8329, Sept. 2008. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.00665-08. PMID : 18579606.
- S. Bressanelli, L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco, and F. A. Rey. 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(23) :13034–13039, Nov. 1999. ISSN 0027-8424. PMID : 10557268.
- H. Briegel, A. Waltert, and A. R. Kuhn. Reproductive physiology of aedes (aedimorphus) vexans (diptera : Culicidae) in relation to flight potential. *Journal of medical entomology*, 38(4) :557–565, July 2001. ISSN 0022-2585. PMID : 11476336.
- T. J. Broering, K. A. Garrity, N. K. Boatright, S. E. Sloan, F. Sandor, J. Thomas, William D, G. Szabo, R. W. Finberg, D. M. Ambrosino, and G. J. Babcock. Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the e2 envelope glycoprotein of hepatitis c virus. *Journal of virology*, 83(23) :12473–12482, Dec. 2009. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.01138-09. PMID : 19759151.
- J. Bukh, R. H. Purcell, and R. H. Miller. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis c virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11) : 4942–4946, June 1992. ISSN 0027-8424. PMID : 1317578.
- E. D. Carlson, R. Gan, C. E. Hodgman, and M. C. Jewett. Cell-free protein synthesis : Applications come of age. *Biotechnology Advances*, 30(5) :1185–1194, Sept. 2012. ISSN 07349750. doi : 10.1016/j.biotechadv.2011.09.016. URL <http://europepmc.org/abstract/MED/22008973>.
- S. Carrère-Kremer, C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis c virus. *Journal of virology*, 76(8) :3720–3730, Apr. 2002. ISSN 0022-538X. PMID : 11907211.
- S. Carrère-Kremer, C. Montpellier, L. Lorenzo, B. Brulin, L. Cocquerel, S. Belouzard, F. Penin, and J. Dubuisson. Regulation of hepatitis c virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *The Journal of biological chemistry*, 279(40) : 41384–41392, Oct. 2004. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M406315200. PMID : 15247249.
- A. C. Celsus, C. C. Krause, J. A. v. d. Linden, and J. Rode. *A. Corn. Celsi De medicina libri octo*. Lipsiae : Sumptibus Caspari Fritsch, 1766. URL <http://archive.org/details/acorncelsidemedi00cels>.
- A. Chippaux. Généralités sur arbovirus et arboviroses. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 33 (8) :377–384, Aug. 2003. ISSN 0399-077X. doi : 10.1016/S0399-077X(03)00204-X. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X0300204X>.

- Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-a, non-b viral hepatitis genome. *Science (New York, N. Y.)*, 244(4902) :359–362, Apr. 1989. ISSN 0036-8075. PMID : 2523562.
- A. N. Clements. *The Biology of Mosquitoes*. Chapman & Hall, 1992. ISBN 9780412734205.
- K. E. Coller, K. L. Berger, N. S. Heaton, J. D. Cooper, R. Yoon, and G. Randall. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis c virus endocytosis. *PLoS pathogens*, 5(12) :e1000702, Dec. 2009. ISSN 1553-7374. doi : 10.1371/journal.ppat.1000702. PMID : 20041214.
- K. E. Corey, A. S. Ross, A. Wurcel, J. Schulze Zur Wiesch, A. Y. Kim, G. M. Lauer, and R. T. Chung. Outcomes and treatment of acute hepatitis c virus infection in a united states population. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 4(10) :1278–1282, Oct. 2006. ISSN 1542-3565. doi : 10.1016/j.cgh.2006.06.026. PMID : 16931171.
- B. Cribier, C. Schmitt, A. Bingen, A. Kirn, and F. Keller. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis c virus. *The Journal of general virology*, 76 (Pt 10) :2485–2491, Oct. 1995. ISSN 0022-1317. PMID : 7595352.
- S. Crotta, A. Stilla, A. Wack, A. D’Andrea, S. Nuti, U. D’Oro, M. Mosca, F. Filliponi, R. M. Brunetto, F. Bonino, S. Abrignani, and N. M. Valiante. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis c virus envelope protein. *The Journal of experimental medicine*, 195(1) :35–41, Jan. 2002. ISSN 0022-1007. PMID : 11781363.
- L. Deng, M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, K. Sada, and H. Hotta. NS3 protein of hepatitis c virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *The Journal of general virology*, 87(Pt 6) : 1703–1713, June 2006. ISSN 0022-1317. doi : 10.1099/vir.0.81735-0. PMID : 16690937.
- J. Diao, H. Pantua, H. Ngu, L. Komuves, L. Diehl, G. Schaefer, and S. B. Kapadia. Hepatitis c virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *Journal of virology*, 86(20) :10935–10949, Oct. 2012. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.00750-12. PMID : 22855500.
- H. Dockrell, M. Zuckerman, I. M. Roitt, and P. L. Chiodini. *Mims’ Medical Microbiology*. Elsevier Health Sciences, Aug. 2012. ISBN 0723436010.
- M. Dorner, J. A. Horwitz, J. B. Robbins, W. T. Barry, Q. Feng, K. Mu, C. T. Jones, J. W. Schoggins, M. T. Catanese, D. R. Burton, M. Law, C. M. Rice, and A. Ploss. A genetically humanized mouse model for hepatitis c virus infection. *Nature*, 474(7350) :208–211, 2011. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/nature10168. URL <http://www.nature.com/nature/journal/v474/n7350/full/nature10168.html>.
- J. Dubuisson, H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, and C. M. Rice. Formation and intracellular localization of hepatitis c virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and sindbis viruses. *Journal of virology*, 68(10) :6147–6160, Oct. 1994. ISSN 0022-538X. PMID : 8083956.
- S. T. Duggan and G. L. Plosker. Japanese encephalitis vaccine (inactivated, adsorbed) [IXIARO®] :. *Drugs*, 69(1) :115–122, 2009. ISSN 0012-6667. doi : 10.2165/00003495-200969010-00008.
- F. L. Dumoulin, A. von dem Bussche, J. Li, L. Khamzina, J. R. Wands, T. Sauerbruch, and U. Spengler. Hepatitis c virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*, 305(2) :260–266, Jan. 2003. ISSN 0042-6822. PMID : 12573571.

- D. Egger, B. Wölk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. Expression of hepatitis c virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology*, 76(12) :5974–5984, June 2002. ISSN 0022-538X. PMID : 12021330.
- S. Einav, M. Elazar, T. Danieli, and J. S. Glenn. A nucleotide binding motif in hepatitis c virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *Journal of virology*, 78(20) :11288–11295, Oct. 2004. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.78.20.11288-11295.2004. PMID : 15452248.
- M. Elazar, K. H. Cheong, P. Liu, H. B. Greenberg, C. M. Rice, and J. S. Glenn. Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis c virus RNA replication. *Journal of virology*, 77(10) :6055–6061, May 2003. ISSN 0022-538X. PMID : 12719597.
- M. J. Evans, C. M. Rice, and S. P. Goff. Phosphorylation of hepatitis c virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35) :13038–13043, Aug. 2004. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0405152101. PMID : 15326295.
- C. Fallecker, N. Tarbouriech, M. Habib, M.-A. Petit, and E. Drouet. Structural and functional characterization of the single-chain fv fragment from a unique HCV E1E2-specific monoclonal antibody. *FEBS letters*, 587(20) :3335–3340, Oct. 2013. ISSN 1873-3468. doi : 10.1016/j.febslet.2013.07.057. PMID : 24021643.
- P. Farci, H. J. Alter, D. Wong, R. H. Miller, J. W. Shih, B. Jett, and R. H. Purcell. A long-term study of hepatitis c virus replication in non-a, non-b hepatitis. *The New England journal of medicine*, 325(2) :98–104, July 1991. ISSN 0028-4793. doi : 10.1056/NEJM199107113250205. PMID : 1646962.
- P. Farci, H. J. Alter, A. Shimoda, S. Govindarajan, L. C. Cheung, J. C. Melpolder, R. A. Sacher, J. W. Shih, and R. H. Purcell. Hepatitis c virus-associated fulminant hepatic failure. *The New England journal of medicine*, 335(9) :631–634, Aug. 1996. ISSN 0028-4793. doi : 10.1056/NEJM199608293350904. PMID : 8687517.
- S. M. Feinstone, A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, and P. V. Holland. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type a or b. *The New England journal of medicine*, 292(15) :767–770, Apr. 1975. ISSN 0028-4793. doi : 10.1056/NEJM197504102921502. PMID : 163436.
- M. Flint and J. A. McKeating. The role of the hepatitis c virus glycoproteins in infection. *Reviews in medical virology*, 10(2) :101–117, Apr. 2000. ISSN 1052-9276. PMID : 10713597.
- M. Flint, C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy, and J. A. McKeating. Characterization of hepatitis c virus e2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *Journal of virology*, 73(8) :6235–6244, Aug. 1999. ISSN 0022-538X. PMID : 10400713.
- D. Fontenille, M. Traore-Lamizana, M. Diallo, J. Thonnon, J. P. Digoutte, and H. G. Zeller. New vectors of rift valley fever in west africa. *Emerging Infectious Diseases*, 4(2) :289, June 1998. URL /pmc/articles/PMC2640145/?report=abstract. PMID : 9621201.
- X. Forns, R. Thimme, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell, F. V. Chisari, and J. Bukh. Hepatitis c virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24) :13318–13323, Nov. 2000. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.230453597. PMID : 11078521.

- E. Foy, K. Li, C. Wang, J. Sumpter, Rhea, M. Ikeda, S. M. Lemon, and J. Gale, Michael. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis c virus serine protease. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5622) :1145–1148, May 2003. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1082604. PMID : 12702807.
- C. Frank, M. K. Mohamed, G. T. Strickland, D. Lavanchy, R. R. Arthur, L. S. Magder, T. El Khoby, Y. Abdel-Wahab, E. S. Aly Ohn, W. Anwar, and I. Sallam. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis c virus in egypt. *Lancet*, 355(9207) :887–891, Mar. 2000. ISSN 0140-6736. PMID : 10752705.
- C. S. Fraser, J. W. B. Hershey, and J. A. Doudna. The pathway of hepatitis c virus mRNA recruitment to the human ribosome. *Nature structural & molecular biology*, 16(4) :397–404, Apr. 2009. ISSN 1545-9985. doi : 10.1038/nsmb.1572. PMID : 19287397.
- C. Gaudy and A. Goudeau. La diversité du virus de l'hépatite c : méthodes d'étude, implication dans la pathogénèse et la résistance au traitement. *Virologie*, 9(5) :343–355, Sept. 2005. ISSN 1267-8694.
- P. Georgel, C. Schuster, M. B. Zeisel, F. Stoll-Keller, T. Berg, S. Bahram, and T. F. Baumert. Virus-host interactions in hepatitis c virus infection : implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends in molecular medicine*, 16(6) :277–286, June 2010. ISSN 1471-499X. doi : 10.1016/j.molmed.2010.04.003. PMID : 20537953.
- R. Germe, J. M. Crance, D. Garin, J. Guimet, M. A. Thelu, A. Jouan, J. P. Zarski, and E. Drouet. Mosquito cells bind and replicate hepatitis c virus. *Journal of medical virology*, 64(1) :6–12, May 2001. ISSN 0146-6615. PMID : 11285562.
- A. Githeko, S. Lindsay, U. Confalonieri, and J. Patz. Changement climatique et maladies à transmission vectorielle : une analyse régionale. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, Recueil d'articles*, page 62–72, 2001.
- A. Goffard, N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F.-L. Cosset, C. Montpellier, and J. Dubuisson. Role of n-linked glycans in the functions of hepatitis c virus envelope glycoproteins. *Journal of virology*, 79(13) :8400–8409, July 2005. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.79.13.8400-8409.2005. PMID : 15956584.
- A. Grakoui, D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. Characterization of the hepatitis c virus-encoded serine proteinase : determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *Journal of virology*, 67(5) :2832–2843, May 1993. ISSN 0022-538X. PMID : 8386278.
- P. Gripon, S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, and C. Guguen-Guillouzo. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis b virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24) :15655–15660, Nov. 2002. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.232137699. PMID : 12432097.
- L. Guillaumot. *Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie*. 2009. URL <http://www.ipnc.nc/spip.php?article160>.
- K. G. Hadlock, R. E. Lanford, S. Perkins, J. Rowe, Q. Yang, S. Levy, P. Pileri, S. Abrignani, and S. K. Fong. Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis c virus e2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *Journal of virology*, 74(22) :10407–10416, Nov. 2000. ISSN 0022-538X. PMID : 11044085.
- S. Haid, M. P. Windisch, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis c virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *Journal of virology*, 84(2) :964–975, Jan. 2010. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.01504-09. PMID : 19889758.

- H. J. Harris, C. Davis, J. G. L. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M. J. Farquhar, C. J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, H. Drummer, P. Balfe, and J. A. McKeating. Claudin association with CD81 defines hepatitis c virus entry. *The Journal of biological chemistry*, 285(27) :21092–21102, July 2010. ISSN 1083-351X. doi : 10.1074/jbc.M110.104836. PMID : 20375010.
- F. Helle and L. Cocquerel. L'entrée du virus de l'hépatite c dans ses cellules cibles. *Virologie*, 12(2) : 105–116, 2008. ISSN 1267-8694.
- F. Helle, A. Goffard, V. Morel, G. Duverlie, J. McKeating, Z.-Y. Keck, S. Fong, F. Penin, J. Dubuisson, and C. Voisset. The neutralizing activity of anti-hepatitis c virus antibodies is modulated by specific glycans on the e2 envelope protein. *Journal of virology*, 81(15) :8101–8111, Aug. 2007. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.00127-07. PMID : 17522218.
- C. Henquell, C. Cartau, A. Abergel, H. Laurichesse, C. Regagnon, C. De Champs, J.-L. Bailly, and H. Peigue-Lafeuille. High prevalence of hepatitis c virus type 5 in central france evidenced by a prospective study from 1996 to 2002. *Journal of clinical microbiology*, 42(7) :3030–3035, July 2004. ISSN 0095-1137. doi : 10.1128/JCM.42.7.3030-3035.2004. PMID : 15243055.
- C. Henquell, A. Abergel, J.-L. Bailly, and H. Peigue-Lafeuille. Le virus de l'hépatite c de génotype 5 : un virus rare, une histoire épidémiologique méconnue. *Virologie*, 15(5) :286–295, 2011. doi : DOI : 10.1684/vir.2011.0416. URL <http://www.biusante.parisdescartes.fr/histmed/image?anmpx12x0571>.
- T. Hügle, F. Fehrmann, E. Bieck, M. Kohara, H. G. Kräusslich, C. M. Rice, H. E. Blum, and D. Moradpour. The hepatitis c virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*, 284(1) :70–81, May 2001. ISSN 0042-6822. doi : 10.1006/viro.2001.0873. PMID : 11352669.
- Y. Higa, T. Toma, Y. Tsuda, and I. Miyagi. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus stegomyia mosquitoes from the genus aedes (diptera : Culicidae) found in the ryukyu archipelago, japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 63(5) :312–316, Sept. 2010. ISSN 1884-2836. PMID : 20858995.
- K. Hiroishi, T. Ito, and M. Imawari. Immune responses in hepatitis c virus infection and mechanisms of hepatitis c virus persistence. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23(10) :1473–1482, 2008. ISSN 1440-1746. doi : 10.1111/j.1440-1746.2008.05475.x. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1440-1746.2008.05475.x/abstract>.
- F. B. Hollinger, G. L. Gitnick, R. D. Aach, W. Szmuness, J. W. Mosley, C. E. Stevens, R. L. Peters, J. M. Weiner, J. B. Werch, and J. J. Lander. Non-a, non-b hepatitis transmission in chimpanzees : a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology*, 10(1) :60–68, 1978. ISSN 0300-5526. PMID : 632054.
- M. Honda, E. A. Brown, and S. M. Lemon. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis c virus RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(10) :955–968, Oct. 1996a. ISSN 1355-8382. PMID : 8849773.
- M. Honda, L. H. Ping, R. C. Rijnbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, and S. M. Lemon. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis c virus RNA. *Virology*, 222(1) :31–42, Aug. 1996b. ISSN 0042-6822. doi : 10.1006/viro.1996.0395. PMID : 8806485.
- M. Hsu, J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice, and J. A. McKeating. Hepatitis c virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12) :7271–7276, June 2003. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0832180100. PMID : 12761383.

- R. E. Iacob, I. Perdivara, M. Przybylski, and K. B. Tomer. Mass spectrometric characterization of glycosylation of hepatitis c virus e2 envelope glycoprotein reveals extended microheterogeneity of n-glycans. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(3) :428–444, Mar. 2008. ISSN 1044-0305. doi : 10.1016/j.jasms.2007.11.022. PMID : 18187336.
- E. Ilan, J. Arazi, O. Nussbaum, A. Zauberman, R. Eren, I. Lubin, L. Neville, O. Ben-Moshe, A. Kischitzky, A. Litchi, I. Margalit, J. Gopher, S. Mounir, W. Cai, N. Daudi, A. Eid, O. Jurim, A. Czerniak, E. Galun, and S. Dagan. The hepatitis c virus (HCV)-Trimera mouse : a model for evaluation of agents against HCV. *The Journal of infectious diseases*, 185(2) :153–161, Jan. 2002. ISSN 0022-1899. doi : 10.1086/338266. PMID : 11807688.
- J. L. Imler and J. A. Hoffmann. Toll and toll-like proteins : an ancient family of receptors signaling infection. *Reviews in immunogenetics*, 2(3) :294–304, 2000. ISSN 1398-1714. PMID : 11256741.
- T. Ito, J. Mukaigawa, J. Zuo, Y. Hirabayashi, K. Mitamura, and K. Yasui. Cultivation of hepatitis c virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis c results in release of high titre infectious virus. *The Journal of general virology*, 77 (Pt 5) :1043–1054, May 1996. ISSN 0022-1317. PMID : 8609470.
- R. Ivanyi-Nagy, I. Kanevsky, C. Gabus, J.-P. Lavergne, D. Ficheux, F. Penin, P. Fossé, and J.-L. Darlix. Analysis of hepatitis c virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic acids research*, 34(9) :2618–2633, 2006. ISSN 1362-4962. doi : 10.1093/nar/gkl240. PMID : 16707664.
- N. Ivashkina, B. Wölk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. The hepatitis c virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *Journal of virology*, 76(24) :13088–13093, Dec. 2002. ISSN 0022-538X. PMID : 12438637.
- H. Ji, C. S. Fraser, Y. Yu, J. Leary, and J. A. Doudna. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis c virus internal ribosome entry site RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49) :16990–16995, Dec. 2004. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0407402101. PMID : 15563596.
- D. X. Johansson, C. Voisset, A. W. Tarr, M. Aung, J. K. Ball, J. Dubuisson, and M. A. A. Persson. Human combinatorial libraries yield rare antibodies that broadly neutralize hepatitis c virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41) :16269–16274, Oct. 2007. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0705522104. PMID : 17911260.
- T. Kanda, A. Basu, R. Steele, T. Wakita, J. S. Ryerse, R. Ray, and R. B. Ray. Generation of infectious hepatitis c virus in immortalized human hepatocytes. *Journal of virology*, 80(9) :4633–4639, May 2006. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.80.9.4633-4639.2006. PMID : 16611923.
- T. Kaneko, Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura, and K. Shimotohno. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis c viral genome. *Biochemical and biophysical research communications*, 205(1) :320–326, Nov. 1994. ISSN 0006-291X. doi : 10.1006/bbrc.1994.2667. PMID : 7999043.
- J. H. Kao, P. J. Chen, M. Y. Lai, T. H. Wang, and D. S. Chen. Positive and negative strand of hepatitis c virus RNA sequences in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis c : no correlation with viral genotypes 1b, 2a, and 2b. *Journal of medical virology*, 52(3) :270–274, July 1997. ISSN 0146-6615. PMID : 9210035.
- A. Kapoor, P. Simmonds, G. Gerold, N. Qaisar, K. Jain, J. A. Henriquez, C. Firth, D. L. Hirschberg, C. M. Rice, S. Shields, and W. I. Lipkin. Characterization of a canine homolog of hepatitis c virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, May 2011. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi :

- 10.1073/pnas.1101794108. URL <http://www.pnas.org/content/early/2011/05/24/1101794108>. PMID : 21610165.
- A. Kapoor, P. Simmonds, T. K. H. Scheel, B. Hjelle, J. M. Cullen, P. D. Burbelo, L. V. Chauhan, R. Duraisamy, M. S. Leon, K. Jain, K. J. Vandegrift, C. H. Calisher, C. M. Rice, and W. I. Lipkin. Identification of rodent homologs of hepatitis c virus and pegiviruses. *mBio*, 4(2) :e00216–13, May 2013. ISSN , 2150-7511. doi : 10.1128/mBio.00216-13. URL <http://mbio.asm.org/content/4/2/e00216-13>. PMID : 23572554.
- M. Karmochkine, F. Carrat, O. Dos Santos, P. Cacoub, G. Raguin, and t. G. S. Group. A case–control study of risk factors for hepatitis c infection in patients with unexplained routes of infection*. *Journal of Viral Hepatitis*, 13(11) :775–782, 2006. ISSN 1365-2893. doi : 10.1111/j.1365-2893.2006.00742.x. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2893.2006.00742.x/abstract>.
- H. Kato, O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita, and S. Akira. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-i and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine*, 205(7) :1601–1610, July 2008. ISSN 1540-9538. doi : 10.1084/jem.20080091. PMID : 18591409.
- Z.-Y. Keck, V. M. H. Sung, S. Perkins, J. Rowe, S. Paul, T. J. Liang, M. M. C. Lai, and S. K. H. Fong. Human monoclonal antibody to hepatitis c virus e1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. *Journal of virology*, 78(13) :7257–7263, July 2004. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.78.13.7257-7263.2004. PMID : 15194801.
- J. S. Kieft, K. Zhou, R. Jubin, and J. A. Doudna. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis c IRES RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(2) :194–206, Feb. 2001. ISSN 1355-8382. PMID : 11233977.
- F. Klein, H. Mouquet, P. Dosenovic, J. F. Scheid, L. Scharf, and M. C. Nussenzweig. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6151) :1199–1204, Sept. 2013. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1241144. PMID : 24031012.
- V. G. Kolupaeva, T. V. Pestova, and C. U. Hellen. An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis c virus. *Journal of virology*, 74(14) :6242–6250, July 2000. ISSN 0022-538X. PMID : 10864633.
- G. Koutsoudakis, A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. Characterization of the early steps of hepatitis c virus infection by using luciferase reporter viruses. *Journal of virology*, 80(11) :5308–5320, June 2006. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.02460-05. PMID : 16699011.
- S. E. Krieger, M. B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H. J. Harris, E. K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, F. Grunert, V. L. Dao Thi, M. Dreux, F.-L. Cosset, J. A. McKeating, C. Schuster, and T. F. Baumert. Inhibition of hepatitis c virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of e2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(4) :1144–1157, Apr. 2010. ISSN 1527-3350. doi : 10.1002/hep.23445. PMID : 20069648.
- G. Kuo, Q. L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J. L. Dienstag, M. J. Alter, and C. E. Stevens. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-a, non-b hepatitis. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4902) :362–364, Apr. 1989. ISSN 0036-8075. PMID : 2496467.
- M. Law, T. Maruyama, J. Lewis, E. Giang, A. W. Tarr, Z. Stamataki, P. Gastaminza, F. V. Chisari, I. M. Jones, R. I. Fox, J. K. Ball, J. A. McKeating, N. M. Kneteman, and D. R. Burton. Broadly

- neutralizing antibodies protect against hepatitis c virus quasispecies challenge. *Nature medicine*, 14 (1) :25–27, Jan. 2008. ISSN 1546-170X. doi : 10.1038/nm1698. PMID : 18064037.
- C. A. Lesburg, M. B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A. F. Mannarino, and P. C. Weber. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis c virus reveals a fully encircled active site. *Nature structural biology*, 6(10) :937–943, Oct. 1999. ISSN 1072-8368. doi : 10.1038/13305. PMID : 10504728.
- B. D. Lindenbach and C. M. Rice. Unravelling hepatitis c virus replication from genome to function. *Nature*, 436(7053) :933–938, Aug. 2005. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/nature04077. PMID : 16107832.
- B. D. Lindenbach and C. M. Rice. The ins and outs of hepatitis c virus entry and assembly. *Nature reviews. Microbiology*, 11(10) :688–700, Oct. 2013. ISSN 1740-1534. doi : 10.1038/nrmicro3098. PMID : 24018384.
- N. Locker, L. E. Easton, and P. J. Lukavsky. HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *The EMBO journal*, 26(3) :795–805, Feb. 2007. ISSN 0261-4189. doi : 10.1038/sj.emboj.7601549. PMID : 17255934.
- V. Lohmann, F. Körner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. Replication of subgenomic hepatitis c virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5424) : 110–113, July 1999. ISSN 0036-8075. PMID : 10390360.
- I. Lubin, Y. Faktorowich, T. Lapidot, Y. Gan, Z. Eshhar, E. Gazit, M. Levite, and Y. Reisner. Engraftment and development of human t and b cells in mice after bone marrow transplantation. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5004) :427–431, Apr. 1991. ISSN 0036-8075. PMID : 1826797.
- I. Lubin, H. Segall, H. Marcus, M. David, L. Kulova, M. Steinitz, P. Erlich, J. Gan, and Y. Reisner. Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice. *Blood*, 83(8) : 2368–2381, Apr. 1994. ISSN 0006-4971. PMID : 8161804.
- A. Ludwig, D. Bicout, K. Chalvet-Monfray, and P. Sabatier. Modélisation de l’agressivité de culex modestus, vecteur potentiel de west nile en camargue, en fonction de données météorologiques, environnement, . *Environnement, Risques & Santé*, 4 :109–113, 2005.
- M. Lundin, M. Monné, A. Widell, G. Von Heijne, and M. A. A. Persson. Topology of the membrane-associated hepatitis c virus protein NS4B. *Journal of virology*, 77(9) :5428–5438, May 2003. ISSN 0022-538X. PMID : 12692244.
- J. Lupberger, M. B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C. J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M. N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F.-L. Cosset, S. M. Rothenberg, T. Pietschmann, A. H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoël, W. Raffelsberger, O. Poch, J. A. McKeating, L. Brino, and T. F. Baumert. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis c virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature medicine*, 17(5) :589–595, May 2011. ISSN 1546-170X. doi : 10.1038/nm.2341. PMID : 21516087.
- A. Macdonald and M. Harris. Hepatitis c virus NS5A : tales of a promiscuous protein. *The Journal of general virology*, 85(Pt 9) :2485–2502, Sept. 2004. ISSN 0022-1317. doi : 10.1099/vir.0.80204-0. PMID : 15302943.
- G. Magiorkinis, E. Magiorkinis, D. Paraskevis, S. Y. W. Ho, B. Shapiro, O. G. Pybus, J.-P. Allain, and A. Hatzakis. The global spread of hepatitis c virus 1a and 1b : A phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med*, 6(12) :e1000198, 2009. doi : 10.1371/journal.pmed.1000198. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1000198>.

- A. Maire. [selectivity of female mosquitoes (culicidae) for their sites of oviposition : state of the question]. *Revue canadienne de biologie expérimentale*, 42(2) :235–241, July 1983. ISSN 0714-6140. PMID : 6685898.
- M. Maire, R. Parent, A.-L. Morand, C. Alotte, C. Trépo, D. Durantel, and M.-A. Petit. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 368(3) :556–562, Apr. 2008a. ISSN 1090-2104. doi : 10.1016/j.bbrc.2008.01.123. PMID : 18258184.
- M. Maire, R. Parent, A.-L. Morand, C. Alotte, C. Trépo, D. Durantel, and M.-A. Petit. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 368(3) :556–562, Apr. 2008b. ISSN 1090-2104. doi : 10.1016/j.bbrc.2008.01.123. PMID : 18258184.
- N. Mancini, R. A. Diotti, M. Perotti, G. Sautto, N. Clementi, G. Nitti, A. H. Patel, J. K. Ball, M. Clementi, and R. Burioni. Hepatitis c virus (HCV) infection may elicit neutralizing antibodies targeting epitopes conserved in all viral genotypes. *PloS one*, 4(12) :e8254, 2009. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0008254. PMID : 20011511.
- M. P. Manns and T. von Hahn. Novel therapies for hepatitis c - one pill fits all? *Nature reviews. Drug discovery*, 12(8) :595–610, Aug. 2013. ISSN 1474-1784. doi : 10.1038/nrd4050. PMID : 23807378.
- M. Martinot-Peignoux, F. Roudot-Thoraval, I. Mendel, J. Coste, J. Izopet, G. Duverlie, C. Payan, J. M. Pawlotsky, C. Defer, M. Bogard, V. Gerolami, P. Halfon, Y. Buisson, B. Fouqueray, P. Loiseau, J. Lamoril, J. J. Lefrere, and P. Marcellin. Hepatitis c virus genotypes in france : relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. the GEMHEP. *Journal of viral hepatitis*, 6(6) :435–443, Nov. 1999. ISSN 1352-0504. PMID : 10607261.
- J. McLauchlan. Properties of the hepatitis c virus core protein : a structural protein that modulates cellular processes. *Journal of viral hepatitis*, 7(1) :2–14, Jan. 2000. ISSN 1352-0504. PMID : 10718937.
- A. McMichael and D. Campbell-lendrum. *Climate change and human health RISKS AND RESPONSES*. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. URL <http://www.who.int/globalchange/publications/climchange.pdf>.
- A. J. McMichael, R. E. Woodruff, and S. Hales. Climate change and human health : present and future risks. *Lancet*, 367(9513) :859–869, Mar. 2006. ISSN 1474-547X. doi : 10.1016/S0140-6736(06)68079-3. PMID : 16530580.
- F. McOmish, P. L. Yap, B. C. Dow, E. A. Follett, C. Seed, A. J. Keller, T. J. Cobain, T. Krusius, E. Kolho, and R. Naukkarinen. Geographical distribution of hepatitis c virus genotypes in blood donors : an international collaborative survey. *Journal of clinical microbiology*, 32(4) :884–892, Apr. 1994. ISSN 0095-1137. PMID : 7913097.
- S. H. Mehta, A. Cox, D. R. Hoover, X.-H. Wang, Q. Mao, S. Ray, S. A. Strathdee, D. Vlahov, and D. L. Thomas. Protection against persistence of hepatitis c. *Lancet*, 359(9316) :1478–1483, Apr. 2002. ISSN 0140-6736. doi : 10.1016/S0140-6736(02)08435-0. PMID : 11988247.
- J. Mellor, E. C. Holmes, L. M. Jarvis, P. L. Yap, and P. Simmonds. Investigation of the pattern of hepatitis c virus sequence diversity in different geographical regions : implications for virus classification. the international HCV collaborative study group. *The Journal of general virology*, 76 (Pt 10) :2493–2507, Oct. 1995. ISSN 0022-1317. PMID : 7595353.

- P. Meuleman, L. Libbrecht, R. De Vos, B. de Hemptinne, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, T. Roskams, and G. Leroux-Roels. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(4) :847–856, Apr. 2005. ISSN 0270-9139. doi : 10.1002/hep.20657. PMID : 15791625.
- J. M. Micallef, J. M. Kaldor, and G. J. Dore. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis c infection : a systematic review of longitudinal studies. *Journal of viral hepatitis*, 13(1) :34–41, Jan. 2006. ISSN 1352-0504. doi : 10.1111/j.1365-2893.2005.00651.x. PMID : 16364080.
- M. K. Mohamed, I. Bakr, M. El-Hoseiny, N. Arafa, A. Hassan, S. Ismail, M. Anwar, M. Attala, C. Rekacewicz, K. Zalata, M. Abdel-Hamid, G. Esmat, and A. Fontanet. HCV-related morbidity in a rural community of egypt. *Journal of medical virology*, 78(9) :1185–1189, Sept. 2006. ISSN 0146-6615. doi : 10.1002/jmv.20679. PMID : 16847958.
- B. Mondet, A. Diaïté, G. Fal, and V. Chevalier. Relations entre la pluviométrie et le risque de transmission virale par les moustiques : cas du virus de la rift valley fever (RVF) dans le ferlo (sénégal). *Environnement, Risques & Santé*, 4 :125–129, 2005.
- R. Montserret, N. Saint, C. Vanbelle, A. G. Salvay, J.-P. Simorre, C. Ebel, N. Sapay, J.-G. Renisio, A. Böckmann, E. Steinmann, T. Pietschmann, J. Dubuisson, C. Chipot, and F. Penin. NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis c virus. *The Journal of biological chemistry*, 285(41) :31446–31461, Oct. 2010. ISSN 1083-351X. doi : 10.1074/jbc.M110.122895. PMID : 20667830.
- D. Moradpour, F. Penin, and C. M. Rice. Replication of hepatitis c virus. *Nature reviews. Microbiology*, 5(6) :453–463, June 2007. ISSN 1740-1534. doi : 10.1038/nrmicro1645. PMID : 17487147.
- S. Morand and A. Waret-Szkuta. Les déterminants des maladies infectieuses humaines en europe : influences de la biodiversité et de la variabilité climatique. (12-13) :156, Mar. 2012.
- K. Moriya, H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, and K. Koike. The core protein of hepatitis c virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature medicine*, 4(9) :1065–1067, Sept. 1998. ISSN 1078-8956. doi : 10.1038/2053. PMID : 9734402.
- E. Muchmore, H. Popper, D. A. Peterson, M. F. Miller, and H. M. Lieberman. Non-a, non-b hepatitis-related hepatocellular carcinoma in a chimpanzee. *Journal of medical primatology*, 17(5) :235–246, 1988. ISSN 0047-2565. PMID : 3148034.
- S. R. Nallagatla, J. Hwang, R. Toroney, X. Zheng, C. E. Cameron, and P. C. Bevilacqua. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science (New York, N. Y.)*, 318(5855) :1455–1458, Nov. 2007. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1147347. PMID : 18048689.
- N. Ndongo, Y. Rechoum, S. De Sequeira, F. Zoulim, C. Trépo, E. Drouet, and M.-A. Petit. Inhibition of the binding of HCV serum particles to human hepatocytes by E1E2-specific d32.10 monoclonal antibody. *Journal of medical virology*, 81(10) :1726–1733, Oct. 2009. ISSN 1096-9071. doi : 10.1002/jmv.21562. PMID : 19697405.
- N. Ndongo, P. Berthillon, P. Pradat, C. Vieux, I. Bordes, F. Berby, M. Maynard, F. Zoulim, C. Trépo, and M.-A. Petit. Association of anti-E1E2 antibodies with spontaneous recovery or sustained viral response to therapy in patients infected with hepatitis c virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(5) : 1531–1542, Nov. 2010. ISSN 1527-3350. doi : 10.1002/hep.23862. PMID : 20890942.

- N. Ndongo, S. Selliah, P. Berthillon, V.-A. Raymond, C. Trépo, M. Bilodeau, and M.-A. Petit. Expression of E1E2 on hepatitis c RNA-containing particles released from primary cultured human hepatocytes derived from infected cirrhotic livers. *Intervirology*, 54(1) :1–9, 2011. ISSN 1423-0100. doi : 10.1159/000318886. PMID : 20689310.
- N. Ndongo-Thiam, P. Berthillon, E. Errazuriz, I. Bordes, S. De Sequeira, C. Trépo, and M.-A. Petit. Long-term propagation of serum hepatitis c virus (HCV) with production of enveloped HCV particles in human HepaRG hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(2) :406–417, Aug. 2011. ISSN 1527-3350. doi : 10.1002/hep.24386. PMID : 21520209.
- V. Nene, J. R. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. J. Tu, B. Loftus, Z. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. Ren, E. M. Zdobnov, N. F. Lobo, K. S. Campbell, S. E. Brown, M. F. Bonaldo, J. Zhu, S. P. Sinkins, D. G. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P. W. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R. V. Bruggner, J. Costas, M. R. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. Debruyne, D. Decaprio, K. Eiglmeier, E. Eisenstadt, H. El-Dorry, W. M. Gelbart, S. L. Gomes, M. Hammond, L. I. Hannick, J. R. Hogan, M. H. Holmes, D. Jaffe, J. S. Johnston, R. C. Kennedy, H. Koo, S. Kravitz, E. V. Kriventseva, D. Kulp, K. Labutti, E. Lee, S. Li, D. D. Lovin, C. Mao, E. Mauceli, C. F. M. Menck, J. R. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A. L. Nascimento, H. F. Naveira, C. Nusbaum, S. O’leary, J. Orvis, M. Perlea, H. Quesneville, K. R. Reidenbach, Y.-H. Rogers, C. W. Roth, J. R. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E. O. Stinson, J. M. C. Tubio, J. P. Vanzee, S. Verjovski-Almeida, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. Zeng, Q. Zhao, Y. Zhao, C. A. Hill, A. S. Raikhel, M. B. Soares, D. L. Knudson, N. H. Lee, J. Galagan, S. L. Salzberg, I. T. Paulsen, G. Dimopoulos, F. H. Collins, B. Birren, C. M. Fraser-Liggett, and D. W. Severson. Genome sequence of aedes aegypti, a major arbovirus vector. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5832) :1718–1723, June 2007. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1138878. PMID : 17510324.
- Y. Nomura-Takigawa, M. Nagano-Fujii, L. Deng, S. Kitazawa, S. Ishido, K. Sada, and H. Hotta. Non-structural protein 4A of hepatitis c virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *The Journal of general virology*, 87(Pt 7) : 1935–1945, July 2006. ISSN 0022-1317. doi : 10.1099/vir.0.81701-0. PMID : 16760395.
- G. Oganessian, S. K. Saha, B. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng. Critical role of TRAF3 in the toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 439(7073) :208–211, Jan. 2006. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/nature04374. PMID : 16306936.
- L. V. Olenina, T. I. Kuzmina, B. N. Sobolev, T. E. Kuraeva, E. F. Kolesanova, and A. I. Archakov. Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis c virus envelope glycoprotein e2*. *Journal of viral hepatitis*, 12(6) :584–593, Nov. 2005. ISSN 1352-0504. doi : 10.1111/j.1365-2893.2005.00647.x. PMID : 16255759.
- D. B. Olsen, M.-E. Davies, L. Handt, K. Koeplinger, N. R. Zhang, S. W. Ludmerer, D. Graham, N. Liverton, M. MacCoss, D. Hazuda, and S. S. Carroll. Sustained viral response in a hepatitis c virus-infected chimpanzee via a combination of direct-acting antiviral agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(2) :937–939, Feb. 2011. ISSN 1098-6596. doi : 10.1128/AAC.00990-10. PMID : 21115793.
- O. m. p. l. s. OMS. *Les arbovirus et leur rôle dans la pathologie humaine*. 1967.
- J. R. Orland, T. L. Wright, and S. Cooper. Acute hepatitis c. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(2) : 321–327, Feb. 2001. ISSN 0270-9139. doi : 10.1053/jhep.2001.22112. PMID : 11172332.
- G. A. Otto and J. D. Puglisi. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell*, 119 (3) :369–380, Oct. 2004. ISSN 0092-8674. doi : 10.1016/j.cell.2004.09.038. PMID : 15507208.

- A. Owsianka, A. W. Tarr, V. S. Juttla, D. Lavillette, B. Bartosch, F.-L. Cosset, J. K. Ball, and A. H. Patel. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis c virus e2 envelope glycoprotein. *Journal of virology*, 79(17) :11095–11104, Sept. 2005. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.79.17.11095-11104.2005. PMID : 16103160.
- A. M. Owsianka, A. W. Tarr, Z.-Y. Keck, T.-K. Li, J. Witteveldt, R. Adair, S. K. H. Foung, J. K. Ball, and A. H. Patel. Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis c virus e2 glycoprotein. *The Journal of general virology*, 89(Pt 3) :653–659, Mar. 2008. ISSN 0022-1317. doi : 10.1099/vir.0.83386-0. PMID : 18272755.
- I. Pachiadakis, G. Pollara, B. M. Chain, and N. V. Naoumov. Is hepatitis c virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *The Lancet infectious diseases*, 5(5) :296–304, May 2005. ISSN 1473-3099. doi : 10.1016/S1473-3099(05)70114-6. PMID : 15854885.
- M. Pallaoro, A. Lahm, G. Biasiol, M. Brunetti, C. Nardella, L. Orsatti, F. Bonelli, S. Orrù, F. Narjes, and C. Steinkühler. Characterization of the hepatitis c virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *Journal of virology*, 75(20) :9939–9946, Oct. 2001. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.75.20.9939-9946.2001. PMID : 11559826.
- G. R. Pape, T. J. Gerlach, H. M. Diepolder, N. Grüner, M. Jung, and T. Santantonio. Role of the specific t-cell response for clearance and control of hepatitis c virus. *Journal of viral hepatitis*, 6 Suppl 1 :36–40, July 1999. ISSN 1352-0504. PMID : 10760033.
- R. Parent, M.-J. Marion, L. Furio, C. Trépo, and M.-A. Petit. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology*, 126(4) :1147–1156, Apr. 2004. ISSN 0016-5085. PMID : 15057753.
- C. Payan, F. Roudot-Thoraval, P. Marcellin, N. Bled, G. Duverlie, I. Fouchard-Hubert, P. Trimoulet, P. Couzigou, D. Cointe, C. Chaput, C. Henquell, A. Abergel, J. M. Pawlotsky, C. Hezode, M. Coudé, A. Blanchi, S. Alain, V. Loustaud-Ratti, P. Chevallier, C. Trepo, V. Gerolami, I. Portal, P. Halfon, M. Bourlière, M. Bogard, E. Plouvier, C. Laffont, G. Agius, C. Silvain, V. Brodard, G. Thieffn, C. Buffet-Janvresse, G. Riachi, F. Grattard, T. Bourlet, F. Stoll-Keller, M. Doffoel, J. Izopet, K. Barange, M. Martinot-Peignoux, M. Branger, A. Rosenberg, P. Sogni, M. L. Chaix, S. Pol, V. Thibault, P. Opolon, A. Charrois, L. Serfaty, B. Fouqueray, J. D. Grange, J. J. Lefrère, and F. Lunel-Fabiani. Changing of hepatitis c virus genotype patterns in france at the beginning of the third millenium : The GEMHEP GenoCII study. *Journal of viral hepatitis*, 12(4) :405–413, July 2005. ISSN 1352-0504. doi : 10.1111/j.1365-2893.2005.00605.x. PMID : 15985012.
- F. Penin, C. Combet, G. Germanidis, P. O. Frainais, G. Deléage, and J. M. Pawlotsky. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis c virus e2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *Journal of virology*, 75(12) :5703–5710, June 2001. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.75.12.5703-5710.2001. PMID : 11356980.
- M. Perotti, N. Mancini, R. A. Diotti, A. W. Tarr, J. K. Ball, A. Owsianka, R. Adair, A. H. Patel, M. Clementi, and R. Burioni. Identification of a broadly cross-reacting and neutralizing human monoclonal antibody directed against the hepatitis c virus e2 protein. *Journal of virology*, 82(2) : 1047–1052, Jan. 2008a. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.01986-07. PMID : 17989176.
- M. Perotti, N. Mancini, R. A. Diotti, A. W. Tarr, J. K. Ball, A. Owsianka, R. Adair, A. H. Patel, M. Clementi, and R. Burioni. Identification of a broadly cross-reacting and neutralizing human monoclonal antibody directed against the hepatitis c virus e2 protein. *Journal of virology*, 82(2) : 1047–1052, Jan. 2008b. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.01986-07. PMID : 17989176.

- M. Persico, E. Persico, R. Suozzo, S. Conte, M. De Seta, L. Coppola, B. Palmentieri, F. C. Sasso, and R. Torella. Natural history of hepatitis c virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology*, 118(4) :760–764, Apr. 2000. ISSN 0016-5085. PMID : 10734027.
- T. V. Pestova, I. N. Shatsky, S. P. Fletcher, R. J. Jackson, and C. U. Hellen. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis c and classical swine fever virus RNAs. *Genes & development*, 12(1) :67–83, Jan. 1998. ISSN 0890-9369. PMID : 9420332.
- M.-A. Petit, C. Jolivet-Reynaud, E. Peronnet, Y. Michal, and C. Trépo. Mapping of a conformational epitope shared between e1 and e2 on the serum-derived human hepatitis c virus envelope. *The Journal of biological chemistry*, 278(45) :44385–44392, Nov. 2003. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M304047200. PMID : 12882983.
- M.-A. Petit, M. Lièvre, S. Peyrol, S. De Sequeira, P. Berthillon, R. W. H. Ruigrok, and C. Trépo. Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis c patients. *Virology*, 336(2) :144–153, June 2005. ISSN 0042-6822. doi : 10.1016/j.virol.2005.03.023. PMID : 15892956.
- T. Pietschmann, V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager. Persistent and transient replication of full-length hepatitis c virus genomes in cell culture. *Journal of virology*, 76(8) :4008–4021, Apr. 2002. ISSN 0022-538X. PMID : 11907240.
- C.-I. Popescu, N. Callens, D. Trinel, P. Roingear, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Hélot, Y. Rouillé, and J. Dubuisson. NS2 protein of hepatitis c virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog*, 7(2) :e1001278, Feb. 2011. doi : 10.1371/journal.ppat.1001278. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001278>.
- O. G. Pybus, M. A. Charleston, S. Gupta, A. Rambaut, E. C. Holmes, and P. H. Harvey. The epidemic behavior of the hepatitis c virus. *Science (New York, N. Y.)*, 292(5525) :2323–2325, June 2001. ISSN 0036-8075. doi : 10.1126/science.1058321. PMID : 11423661.
- O. G. Pybus, P. V. Markov, A. Wu, and A. J. Tatem. Investigating the endemic transmission of the hepatitis c virus. *International journal for parasitology*, 37(8-9) :839–849, July 2007. ISSN 0020-7519. doi : 10.1016/j.ijpara.2007.04.009. PMID : 17521655.
- V. Racanelli and B. Rehermann. The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(2 Suppl 1) :S54–62, Feb. 2006. ISSN 0270-9139. doi : 10.1002/hep.21060. PMID : 16447271.
- S. E. Randolph and D. J. Rogers. The arrival, establishment and spread of exotic diseases : patterns and predictions. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5) :361–371, Apr. 2010. ISSN 1740-1526, 1740-1534. doi : 10.1038/nrmicro2336.
- S. C. Ray, Y. M. Wang, O. Laeyendecker, J. R. Ticehurst, S. A. Villano, and D. L. Thomas. Acute hepatitis c virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia : hypervariable region 1 as a decoy. *Journal of virology*, 73(4) :2938–2946, Apr. 1999. ISSN 0022-538X. PMID : 10074143.
- V. H. Resh and R. T. Cardé. *The Encyclopedia of Insects*. Academic Press., 2003.
- G. R. Reyes. The nonstructural NS5A protein of hepatitis c virus : an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis c virus pathogenesis. *Journal of biomedical science*, 9(3) :187–197, June 2002. ISSN 1021-7770. doi : 59419. PMID : 12065893.
- F. Rodhain. *Impacts potentiels du changement climatique sur la santé : l'exemple des maladies à vecteurs*. In : *Changements climatiques et risques sanitaires en France*. Observatoire national des effets du réchauffement climatique (ONERC), 2007.

- D. Rosa, S. Campagnoli, C. Moretto, E. Guenzi, L. Cousens, M. Chin, C. Dong, A. J. Weiner, J. Y. Lau, Q. L. Choo, D. Chien, P. Pileri, M. Houghton, and S. Abrignani. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis c virus : cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5) :1759–1763, Mar. 1996. ISSN 0027-8424. PMID : 8700831.
- S. D. Ryder. Outcome of hepatitis c infection : Bleak or benign? *Journal of Hepatology*, 47(1) :4–6, July 2007. ISSN 0168-8278. doi : 10.1016/j.jhep.2007.04.006. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827807002152>.
- P. Sabatier. Changement climatique et maladies infectieuses outre-mer. in : Changements climatiques et risques sanitaires en france. *Observatoire national des effets du réchauffement climatique (ONERC)*, page 73–87, 2007.
- M. C. Sabo, V. C. Luca, J. Prentoe, S. E. Hopcraft, K. J. Blight, M. Yi, S. M. Lemon, J. K. Ball, J. Bukh, M. J. Evans, D. H. Fremont, and M. S. Diamond. Neutralizing monoclonal antibodies against hepatitis c virus e2 protein bind discontinuous epitopes and inhibit infection at a postattachment step. *Journal of virology*, 85(14) :7005–7019, July 2011. ISSN 1098-5514. doi : 10.1128/JVI.00586-11. PMID : 21543495.
- T. Saito and J. Gale, Michael. Principles of intracellular viral recognition. *Current opinion in immunology*, 19(1) :17–23, Feb. 2007. ISSN 0952-7915. doi : 10.1016/j.coi.2006.11.003. PMID : 17118636.
- T. Saito, D. M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano, and M. G. Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis c virus RNA. *Nature*, 454(7203) :523–527, July 2008. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/nature07106. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nature/journal/v454/n7203/full/nature07106.html>.
- A. Sakai, M. S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and J. Bukh. 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(20) :11646–11651, Sept. 2003. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.1834545100. PMID : 14504405.
- M. Salvan and J. Mouchet. [aedes albopictus and aedes aegypti at ile de la réunion]. *Annales de la Société belge de médecine tropicale*, 74(4) :323–326, Dec. 1994. ISSN 0772-4128. PMID : 7726666.
- T. Santantonio, E. Medda, C. Ferrari, P. Fabris, G. Cariti, M. Massari, S. Babudieri, M. Toti, R. Francavilla, F. Ancarani, G. Antonucci, G. Scotto, V. Di Marco, G. Pastore, and T. Stroffolini. Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis c in italy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(9) :1154–1159, Nov. 2006. ISSN 1537-6591. doi : 10.1086/507640. PMID : 17029134.
- E. Santolini, L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio, and N. Monica. The NS2 protein of hepatitis c virus is a transmembrane polypeptide. *Journal of virology*, 69(12) :7461–7471, Dec. 1995. ISSN 0022-538X. PMID : 7494252.
- M. Savey and B. Dufour. Diversité des zoonoses. définitions et conséquences pour la surveillance et la lutte. *Épidémiologie et Santé Animale*, page 1–16, 2004.
- B. Schaeffer, B. Mondet, and S. Touzeau. Modélisation de la dynamique de moustiques en zone forestière - application à aedes (stegomyia) africanus theobald, 1910, vecteur de la fièvre jaune en Côte d'Ivoire. *Environnement, Risques & Santé*, 4 :1–14, 2005.

- T. K. H. Scheel and C. M. Rice. Understanding the hepatitis c virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature medicine*, 19(7) :837–849, July 2013. ISSN 1546-170X. doi : 10.1038/nm.3248. PMID : 23836234.
- J. F. Scheid, H. Mouquet, N. Feldhahn, M. S. Seaman, K. Velinzon, J. Pietzsch, R. G. Ott, R. M. Anthony, H. Zebroski, A. Hurley, A. Phogat, B. Chakrabarti, Y. Li, M. Connors, F. Pereyra, B. D. Walker, H. Wardemann, D. Ho, R. T. Wyatt, J. R. Mascola, J. V. Ravetch, and M. C. Nussenzweig. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory b cells in HIV-infected individuals. *Nature*, 458(7238) :636–640, Apr. 2009. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/nature07930. PMID : 19287373.
- J. Schulze Zur Wiesch, D. Ciuffreda, L. Lewis-Ximenez, V. Kasprovicz, B. E. Nolan, H. Streeck, J. Aneja, L. L. Reyor, T. M. Allen, A. W. Lohse, B. McGovern, R. T. Chung, W. W. Kwok, A. Y. Kim, and G. M. Lauer. Broadly directed virus-specific CD4+ t cell responses are primed during acute hepatitis c infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *The Journal of experimental medicine*, 209(1) :61–75, Jan. 2012. ISSN 1540-9538. doi : 10.1084/jem.20100388. PMID : 22213804.
- C. Seeger. Salient molecular features of hepatitis c virus revealed. *Trends in microbiology*, 13(11) : 528–534, Nov. 2005. ISSN 0966-842X. doi : 10.1016/j.tim.2005.08.011. PMID : 16154356.
- A. Serafino, M. B. Valli, F. Andreola, A. Crema, G. Ravagnan, L. Bertolini, and G. Carloni. Suggested role of the golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis c virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *Journal of medical virology*, 70(1) :31–41, May 2003. ISSN 0146-6615. doi : 10.1002/jmv.10367. PMID : 12629641.
- Y. K. Shimizu, S. M. Feinstone, R. H. Purcell, H. J. Alter, and W. T. London. Non-a, non-b hepatitis : ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science (New York, N. Y.)*, 205(4402) :197–200, July 1979. ISSN 0036-8075. PMID : 451589.
- P. Simmonds. Genetic diversity and evolution of hepatitis c virus–15 years on. *The Journal of general virology*, 85(Pt 11) :3173–3188, Nov. 2004. ISSN 0022-1317. doi : 10.1099/vir.0.80401-0. PMID : 15483230.
- P. Simmonds, F. McOmish, P. L. Yap, S. W. Chan, C. K. Lin, G. Dusheiko, A. A. Saeed, and E. C. Holmes. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis c virus : identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *The Journal of general virology*, 74 (Pt 4) : 661–668, Apr. 1993. ISSN 0022-1317. PMID : 8385694.
- K. Singh. Cell cultures derived from larvae of aedes albopictus (skuse) and aedes aegypti (l.). *Curr. Sci.*, pages 506–508, 1967.
- D. V. Sizova, V. G. Kolupaeva, T. V. Pestova, I. N. Shatsky, and C. U. Hellen. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis c virus and classical swine fever virus RNAs. *Journal of virology*, 72(6) :4775–4782, June 1998. ISSN 0022-538X. PMID : 9573242.
- J. Sérandour, J. Willison, W. Thuiller, P. Ravanel, G. Lempérière, and M. Raveton. Environmental drivers for coquillettidia mosquito habitat selection : a method to highlight key field factors. *Hydrobiologia*, 652(1) :377–388, July 2010. ISSN 0018-8158, 1573-5117. doi : 10.1007/s10750-010-0372-y. URL <http://link.springer.com/10.1007/s10750-010-0372-y>.
- A. Stary, W. Kopp, H. Hofmann, C. Heller-Vitouch, and C. Kunz. Seroepidemiologic study of hepatitis c virus in sexually transmitted disease risk groups. *Sexually transmitted diseases*, 19(5) :252–258, Oct. 1992. ISSN 0148-5717. PMID : 1384151.

- C. Strode, C. S. Wondji, J.-P. David, N. J. Hawkes, N. Lumjuan, D. R. Nelson, D. R. Drane, S. H. P. P. Karunaratne, J. Hemingway, t. Black, William C, and H. Ranson. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito aedes aegypti. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(1) :113–123, Jan. 2008. ISSN 0965-1748. doi : 10.1016/j.ibmb.2007.09.007. PMID : 18070670.
- C. L. Tai, W. K. Chi, D. S. Chen, and L. H. Hwang. The helicase activity associated with hepatitis c virus nonstructural protein 3 (NS3). *Journal of virology*, 70(12) :8477–8484, Dec. 1996. ISSN 0022-538X. PMID : 8970970.
- W. Takken and B. G. Knols. Odor-mediated behavior of afrotropical malaria mosquitoes. *Annual review of entomology*, 44 :131–157, 1999. ISSN 0066-4170. doi : 10.1146/annurev.ento.44.1.131. PMID : 9990718.
- C. Tamalet, P. Colson, H. Tissot-Dupont, M. Henry, C. Tourres, N. Tivoli, D. Botta, I. Ravau, I. Poizot-Martin, and N. Yahi. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis c virus isolates : A survey of 535 strains circulating in southern france. *Journal of Medical Virology*, 71(3) :391–398, 2003. ISSN 1096-9071. doi : 10.1002/jmv.10505. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.10505/abstract>.
- S. L. Tan and M. G. Katze. How hepatitis c virus counteracts the interferon response : the jury is still out on NS5A. *Virology*, 284(1) :1–12, May 2001. ISSN 0042-6822. doi : 10.1006/viro.2001.0885. PMID : 11352662.
- Y. Tanaka, S. Agha, N. Saady, F. Kurbanov, E. Orito, T. Kato, M. Abo-Zeid, M. Khalaf, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. Exponential spread of hepatitis c virus genotype 4a in egypt. *Journal of molecular evolution*, 58(2) :191–195, Feb. 2004. ISSN 0022-2844. doi : 10.1007/s00239-003-2541-3. PMID : 15042339.
- A. W. Tarr, A. M. Owsianka, J. M. Timms, C. P. McClure, R. J. P. Brown, T. P. Hickling, T. Pietzschmann, R. Bartenschlager, A. H. Patel, and J. K. Ball. Characterization of the hepatitis c virus e2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(3) :592–601, Mar. 2006. ISSN 0270-9139. doi : 10.1002/hep.21088. PMID : 16496330.
- A. W. Tarr, A. M. Owsianka, D. Jayaraj, R. J. P. Brown, T. P. Hickling, W. L. Irving, A. H. Patel, and J. K. Ball. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis c virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *The Journal of general virology*, 88(Pt 11) :2991–3001, Nov. 2007. ISSN 0022-1317. doi : 10.1099/vir.0.83065-0. PMID : 17947521.
- T. L. Tellinghuisen and C. M. Rice. Interaction between hepatitis c virus proteins and host cell factors. *Current opinion in microbiology*, 5(4) :419–427, Aug. 2002. ISSN 1369-5274. PMID : 12160863.
- A. J. V. Thompson and J. G. McHutchison. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *Journal of Viral Hepatitis*, 16(6) : 377–387, 2009. ISSN 1365-2893. doi : 10.1111/j.1365-2893.2009.01124.x. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2893.2009.01124.x/abstract>.
- M. Troesch, I. Meunier, P. Lapierre, N. Lapointe, F. Alvarez, M. Boucher, and H. Soudeyns. Study of a novel hypervariable region in hepatitis c virus (HCV) e2 envelope glycoprotein. *Virology*, 352 (2) :357–367, Sept. 2006. ISSN 0042-6822. doi : 10.1016/j.virol.2006.05.015. PMID : 16781757.
- S. Trowitzsch, C. Bieniossek, Y. Nie, F. Garzoni, and I. Berger. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *Journal of structural biology*, 172(1) :45–54, Oct. 2010. ISSN 1095-8657. doi : 10.1016/j.jsb.2010.02.010. PMID : 20178849.

- S. L. Tsai, Y. F. Liaw, M. H. Chen, C. Y. Huang, and G. C. Kuo. Detection of type 2-like t-helper cells in hepatitis c virus infection : implications for hepatitis c virus chronicity. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 25(2) :449–458, Feb. 1997. ISSN 0270-9139. doi : 10.1002/hep.510250233. PMID : 9021963.
- M.-F. Tsan. Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Seminars in cancer biology*, 16(1) :32–37, Feb. 2006. ISSN 1044-579X. doi : 10.1016/j.semcancer.2005.07.004. PMID : 16153858.
- M. J. Turell, K. J. Linthicum, L. A. Patrican, F. G. Davies, A. Kairo, and C. L. Bailey. Vector competence of selected african mosquito (diptera : Culicidae) species for rift valley fever virus. *Journal of medical entomology*, 45(1) :102–108, Jan. 2008. ISSN 0022-2585. PMID : 18283949.
- P. Vaquer, R. Canet, A. Llompart, J. Riera, A. Obrador, and J. Gayá. Histological evolution of chronic hepatitis c. factors related to progression. *Liver*, 14(5) :265–269, Oct. 1994. ISSN 0106-9543. PMID : 7527889.
- J. Verbeeck, P. Maes, P. Lemey, O. G. Pybus, E. Wollants, E. Song, F. Nevens, J. Fevery, W. Delport, S. Van der Merwe, and M. Van Ranst. Investigating the origin and spread of hepatitis c virus genotype 5a. *Journal of virology*, 80(9) :4220–4226, May 2006. ISSN 0022-538X. doi : 10.1128/JVI.80.9.4220-4226.2006. PMID : 16611881.
- T. Wakita, T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.-G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang. Production of infectious hepatitis c virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine*, 11(7) :791–796, July 2005. ISSN 1078-8956. doi : 10.1038/nm1268. PMID : 15951748.
- C. Wang, S. Y. Le, N. Ali, and A. Siddiqui. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis c virus 5' noncoding region. *RNA (New York, N.Y.)*, 1(5) :526–537, July 1995. ISSN 1355-8382. PMID : 7489514.
- J. W. Ward. The hidden epidemic of hepatitis c virus infection in the united states : occult transmission and burden of disease. *Topics in antiviral medicine*, 21(1) :15–19, Mar. 2013. ISSN 2161-5853. PMID : 23596274.
- L. Waxman, M. Whitney, B. A. Pollok, L. C. Kuo, and P. L. Darke. Host cell factor requirement for hepatitis c virus enzyme maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24) :13931–13935, Nov. 2001. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.241510898. PMID : 11707594.
- N. E. Weisser and J. C. Hall. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology advances*, 27(4) :502–520, Aug. 2009. ISSN 1873-1899. doi : 10.1016/j.biotechadv.2009.04.004. PMID : 19374944.
- B. Wölk, D. Sansonno, H. G. Kräusslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum, and D. Moradpour. 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(5) :2293–2304, Mar. 2000. ISSN 0022-538X. PMID : 10666260.
- Z. C. Xie, J. I. Riezu-Boj, J. J. Lasarte, J. Guillen, J. H. Su, M. P. Civeira, and J. Prieto. Transmission of hepatitis c virus infection to tree shrews. *Virology*, 244(2) :513–520, May 1998. ISSN 0042-6822. doi : 10.1006/viro.1998.9127. PMID : 9601519.
- X. Xu, H. Chen, X. Cao, and K. Ben. Efficient infection of tree shrew (*tupaia belangeri*) with hepatitis c virus grown in cell culture or from patient plasma. *The Journal of general virology*, 88(Pt 9) : 2504–2512, Sept. 2007. ISSN 0022-1317. doi : 10.1099/vir.0.82878-0. PMID : 17698660.

- B. A. Yamar, D. Diallo, C. M. F. Kebe, I. Dia, and M. Diallo. Aspects of bioecology of two rift valley fever virus vectors in senegal (west africa) : *Aedes vexans* and *Culex poicilipes* (diptera : Culicidae). *Journal of medical entomology*, 42(5) :739–750, Sept. 2005. ISSN 0022-2585. PMID : 16363157.
- K. Yasui, T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S. I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J. R. Wands, and M. Kohara. The native form and maturation process of hepatitis c virus core protein. *Journal of virology*, 72(7) :6048–6055, July 1998. ISSN 0022-538X. PMID : 9621068.
- M. Yoneyama, M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology*, 5(7) :730–737, July 2004. ISSN 1529-2908. doi : 10.1038/ni1087. PMID : 15208624.
- N. N. Zein. Clinical significance of hepatitis c virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2) :223–235, Apr. 2000. ISSN 0893-8512, 1098-6618. doi : 10.1128/CMR.13.2.223-235.2000. URL <http://cmr.asm.org/content/13/2/223>. PMID : 10755999.
- E. Z. Zhang, D. J. Bartels, J. D. Frantz, S. Seepersaud, J. A. Lippke, B. Shames, Y. Zhou, C. Lin, A. Kwong, and T. L. Kieffer. Development of a sensitive RT-PCR method for amplifying and sequencing near full-length HCV genotype 1 RNA from patient samples. *Virology Journal*, 10(1) :53, Feb. 2013. ISSN 1743-422X. doi : 10.1186/1743-422X-10-53. URL <http://www.virologyj.com/content/10/1/53/abstract>. PMID : 23402332.
- X. Zhao, Z.-Y. Tang, B. Klumpp, G. Wolff-Vorbeck, H. Barth, S. Levy, F. von Weizsäcker, H. E. Blum, and T. F. Baumert. Primary hepatocytes of tupaia belangeri as a potential model for hepatitis c virus infection. *The Journal of clinical investigation*, 109(2) :221–232, Jan. 2002. ISSN 0021-9738. doi : 10.1172/JCI13011. PMID : 11805134.
- R. M. Zinkernagel, D. Moskophidis, T. Kündig, S. Oehen, H. Pircher, and H. Hengartner. Effector t-cell induction and t-cell memory versus peripheral deletion of t cells. *Immunological reviews*, 133 : 199–223, June 1993. ISSN 0105-2896. PMID : 8225368.