

Université de Montréal

**Développement de lignées de poissons zébrés
transgéniques pour l'étude du rôle de la protéine F dans
la pathogenèse de l'hépatite C**

par

Mathieu Quesnel-Vallières

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise *ès* Sciences
en microbiologie et immunologie

mars, 2010

© Mathieu Quesnel-Vallières, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Développement de lignées de poissons zébrés transgéniques pour l'étude du rôle de la
protéine F dans la pathogenèse de l'hépatite C

présenté par :

Mathieu Quesnel-Vallières

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Carolina Alfieri, présidente-rapporteuse

Dr Hugo Soudeyns, directeur de recherche

Dre Naglaa Shoukry, membre du jury

Résumé

Le virus de l'hépatite C (VHC) est une des principales causes d'hépatite chronique. La protéine F du VHC est codée par un cadre de lecture alternatif du gène de la capsid, Core. La protéine F a été découverte après que l'on ait associé Core à plusieurs des fonctions pathogènes du VHC. Nous proposons donc que certaines fonctions biologiques et pathogènes attribuées à la protéine Core résultent de l'activité de la protéine F. Nous avons choisi de développer trois lignées de poissons zébrés (*Danio rerio*) qui expriment différentes versions de la protéine F afin d'étudier les effets de la protéine F et leur incidence dans la pathogenèse du VHC.

Deux versions de la séquence codant pour la protéine F (AF11 et AUG26) et une version mutante du gène *core* (CoremutI) ont été introduites sur les vecteurs d'un système d'expression répressible spécifique au foie. Ces vecteurs ont été co-injectés dans des embryons unicellulaires de poissons zébrés pour générer les poissons fondateurs des lignées transgéniques. 19, 21 et 36 poissons ont été choisis comme fondateurs pour les lignées AF11, AUG26 et CoremutI respectivement. De ce nombre, 9, 11 et 11 poissons ont atteint la maturité, dans l'ordre pour les mêmes lignées, et seront croisés pour donner naissance à des lignées transgéniques stables. Les résultats de ces expériences nous permettront de mieux cerner les propriétés biologiques de la protéine F et de définir son rôle dans la pathogenèse du VHC.

Mots-clés: Virus de l'hépatite C (VHC), protéine F, ARFP, poisson zébré, transgénèse.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of liver steatosis, fibrosis and hepatocellular carcinoma. HCV F protein is expressed from an alternative reading frame within the Core sequence. F protein was discovered after many of the pathogenic determinants of HCV had been associated with the effects of Core. Hence, we propose that a part of the functions attributed to Core result from the activity of the F protein. We produced and selected 19, 21 and 36 transgenic zebrafish (*Danio rerio*) to give rise to 3 independent lines expressing different versions of the F protein. Of these founders, 9, 11 and 11 were raised to maturity and will be bred to generate stable transgenic lines. Characterizing the phenotype of these transgenic fish will help determine the precise role of the F protein in the pathogenesis of hepatitis C.

Keywords: Hepatitis C virus (HCV), F protein, ARFP, zebrafish, transgenesis.

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1 Virus de l'hépatite C.....	2
1.1.1 Épidémiologie	2
1.1.2 Histoire naturelle de l'infection.....	2
1.1.3 Classification et diversité génétique	5
1.1.4 Génome et caractéristiques générales.....	5
1.1.5 Protéines structurales	9
1.1.6 Protéines non-structurales.....	9
1.1.7 Cycle de réplication	10
1.1.8 Évasion virale.....	13
1.1.9 Traitement	14
1.1.10 Modèles d'étude	16
1.2 Protéine F.....	17
1.2.1 Protéine Core.....	17
1.2.2 Découverte de la protéine F	19
1.2.3 Modes de production	19
1.2.4 Propriétés biochimiques et biologiques	23
1.2.5 Localisation intracellulaire.....	23
1.2.6 Fonctions biologiques	24
1.2.7 Reconnaissance immunitaire.....	26
1.2.8 Structures secondaires d'ARN	27
1.3 Poisson zébré.....	30
1.3.1 Avantages pratiques.....	30
1.3.2 Utilisation du poisson zébré en recherche biomédicale.....	31
1.3.3 Anatomie comparée du foie	32
1.3.4 Transgénése.....	34

1.4	Hypothèse et objectifs	37
2.	Matériel et méthodes	39
2.1	Optimisation des gènes	40
2.2	Constructions génétiques	40
2.3	Structures secondaires d'ARN	48
2.4	Culture cellulaire et transfections.....	48
2.5	Immunofluorescence et microscopie confocale	48
2.6	Maintien des poissons zébrés.....	49
2.7	Transgénèse.....	50
2.8	Sélection des poissons fondateurs.....	51
3.	Résultats	52
3.1	Constructions génétiques	53
3.2	Optimisation des gènes	55
3.3	Structures secondaires d'ARN	57
3.4	Expression <i>in vitro</i> et localisation cellulaire de la protéine F	59
3.5	Microinjection.....	64
3.6	Poissons fondateurs	66
4.	Discussion	69
4.1	Construction génétiques.....	70
4.2	Localisation cellulaire.....	74
4.3	Lignées transgéniques.....	77
4.4	Poissons fondateurs	80
4.5	Analyse du phénotype	80
5.	Conclusion et perspectives	82
6.	Bibliographie	85

Liste des tableaux

Tableau 1. Amorces utilisées pour les constructions génétiques.....	45
Tableau 2. Liste des constructions génétiques et rôle des lignées transgéniques correspondantes.....	54
Tableau 3. Interprétation des phénotypes possibles pour les lignées AF11, AUG26 et CoremutI.....	79

Liste des figures

Figure 1.1. Histoire naturelle de l'hépatite C.....	4
Figure 1.2. Organisation génomique du VHC.....	7
Figure 1.3. Structure de la particule virale.....	8
Figure 1.4. Mécanisme d'entrée du VHC.....	12
Figure 1.5. Modes de production de la protéine F.....	22
Figure 1.6. Structures secondaires d'ARN dans la région génomique de Core.....	29
Figure 1.7 Anatomie comparée du foie des mammifères et des téléostéens.....	33
Figure 1.8. Transgénèse du poisson zébré avec le système <i>Tol2</i>	36
Figure 2.1 Stratégie de construction des gènes AF11 et AUG26.....	44
Figure 2.2 Cartes des constructions plasmidiques.....	46
Figure 3.1 Profil d'utilisation des codons chez le poisson zébré.....	56
Figure 3.2 Structures d'ARN et séquence peptidique des mutants de Core.....	58
Figure 3.3. Localisation de la protéine F produite par les gènes AF11, AUG26 et Core1a dans les cellules ZF-L.....	61
Figure 3.4. Association entre la protéine F et les mitochondries dans les cellules ZF-L. ...	62
Figure 3.5. Expression de la protéine F à partir des mutants CoremutI, CoremutII et CoremutIII.....	63
Figure 3.6. Efficacité d'intégration des transgènes avec le système <i>Tol2</i> -LF2.8-Tet-Off... 65	65
Figure 3.7. Expression ectopique ou non spécifique de la fluorescence chez des embryons co-injectés avec pT2-TRE-AUG26-AcGFP et pT2-LF2.8-tTA2.....	67
Figure 3.8. Profil d'expression recherché pour les poissons transgéniques fondateurs.	68
Figure 4.1. Structures d'ARN des gènes AF11 et AUG26 comparées à Core1a.....	73

Liste des abréviations

3'NTR	<i>3' non translated region</i>
5'NTR	<i>5' non translated region</i>
ADRP	<i>adipose differentiation related protein</i>
ALT	alanine aminotransférase
AST	aspartate aminotransférase
ARFP	<i>alternate reading frame protein</i>
ARNsb	ARN simple brin
ARNdb	ARN double brin
ASON	<i>antisense oligonucleotide</i>
CAI	<i>codon adaptation index</i>
CHC	carcinome hépatocellulaire
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GAG	glycosaminoglycane
GFP	green fluorescent protein
HBx	protéine X du virus de l'hépatite B
HE	Hématoxyline-éosine
IFN- α	Interféron- α
IR	inverted repeats
IRES	internal ribosome entry site

LDL-R	low density lipoprotein receptor
L-FABP	<i>liver fatty acid binding protein</i>
MCS	multi cloning site
pA	signal de polyadénylation
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
pb	paire de bases
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RE	réticulum endoplasmique
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SV40	virus simien 40
SVR	<i>sustained virological response</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRE	<i>tetracycline response element</i>
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

Remerciements

Au cours des quelques années passées au laboratoire, j'ai eu le sincère plaisir de côtoyer des collègues d'une grande valeur. Je salue celles qui y sont depuis mon arrivée, Doris, Élyse, Martine et Natasha, ceux qui y sont venus et qui y sont toujours, Anne-Julie et Fallah, et ceux qui en sont partis, Réginald, Stéphanie et Josiane. Vous avez facilité mon entrée dans un univers complexe.

Ce projet de recherche constituait un formidable défi. Il m'aura offert assez de difficultés pour me donner envie de continuer et m'aura appris la persévérance et l'humilité. Je le dois à mon directeur de recherche, Dr Hugo Soudeyns, à sa grande patience, à son audace et à sa vision lucide de la science. Mais surtout à sa confiance, lui qui a « cru en ce projet et qui a toujours continué à y croire malgré vents et marées ».

Vents et marées m'ont d'ailleurs mené au-delà de l'horizon, où j'ai gagné une expérience technique et humaine d'une valeur inestimable. Je remercie Dr Jen-Leih Wu et toute son équipe de m'avoir accueilli, d'avoir partagé sans retenue une expertise unique et de m'avoir ouvert les portes d'une culture riche et belle. Je pense à mes amis Wangta, Shin-Jie, Sanco, Mornica et à tous les autres en qui je reconnais la beauté de Taiwan.

Je m'arrête enfin à mes proches. À mes parents qui m'ont donné une vie tellement facile et qui ont préparé les années heureuses que je vis, merci. Et merci à ma chérie, maintenant mon épouse, qui fait ma joie de vivre, qui stimule mes idées avec les siennes, m'enrichit de ses connaissances et m'encourage par son enthousiasme.

1. Introduction

1.1 Virus de l'hépatite C

1.1.1 Épidémiologie

Le virus de l'hépatite C (VHC) infecte près de 170 millions de personnes à travers le monde (1). La prévalence du virus est plus élevée dans les pays en développement, avec un sommet en Égypte où on estime que 15% à 22% de la population est infectée (2). Cependant les États-Unis, avec plus de 2,7 millions de cas (3), et le Canada, avec une prévalence de 0,8% dans la population générale (4) et une incidence de 10 à 20 cas par 100 000 habitants (5), sont aussi fortement affectés. Le virus se transmet par voie parentérale, par contacts sexuels et plus rarement de la mère à l'enfant durant la grossesse ou lors de l'accouchement (6). Dans le monde occidental, l'utilisation de drogues injectables est le principal facteur de risque pour l'acquisition du virus, tandis que de mauvaises pratiques médicales seraient à l'origine des hauts taux d'incidence qu'on observe dans certains pays en développement d'Afrique et d'Asie (6). Parmi ces mauvaises pratiques, on note la réutilisation de seringues, l'administration non nécessaire de médicaments par injection, le recours aux donneurs de sang payés par les banques de sang et l'absence de dépistage systématique du VHC lors des dons de sang (7).

1.1.2 Histoire naturelle de l'infection

Durant les 6 premiers mois de l'infection, le VHC provoque une hépatite aiguë, et ce, très rapidement après l'inoculation. L'ARN viral peut déjà être détecté dans le sérum des patients 1 à 2 semaines seulement après exposition et un niveau élevé d'alanine aminotransférase (ALT) sérique, signe de dommage hépatique, est observé dès la 2^e semaine pour atteindre un maximum 7 à 8 semaines après exposition (8) (**Figure 1.1**). Cependant, ces indices ne seront examinés que chez les patients pour qui on suspecte une infection au VHC (9). En effet, les symptômes de la phase aiguë, qui peuvent se manifester par une jaunisse, de la fatigue, des myalgies, de la fièvre, de la nausée et des vomissements, ne surviennent que chez environ 20% des patients et l'infection passe donc souvent

inaperçue durant cette période (10). Seulement 15% des personnes infectées arriveront à éliminer le virus au cours des premiers mois d'infection; dans les autres cas, le virus persiste pour provoquer une hépatite chronique (11). Malgré que des signes d'inflammation, de stéatose et de fibrose puissent être détectés dans les trois premières années de la phase chronique (12), la maladie peut progresser en restant asymptomatique pour des périodes allant de 20 à 40 ans, après quoi on observe des cirrhoses dans 20% des cas et des carcinomes hépatocellulaires (CHC) dans 4% des cas (11).

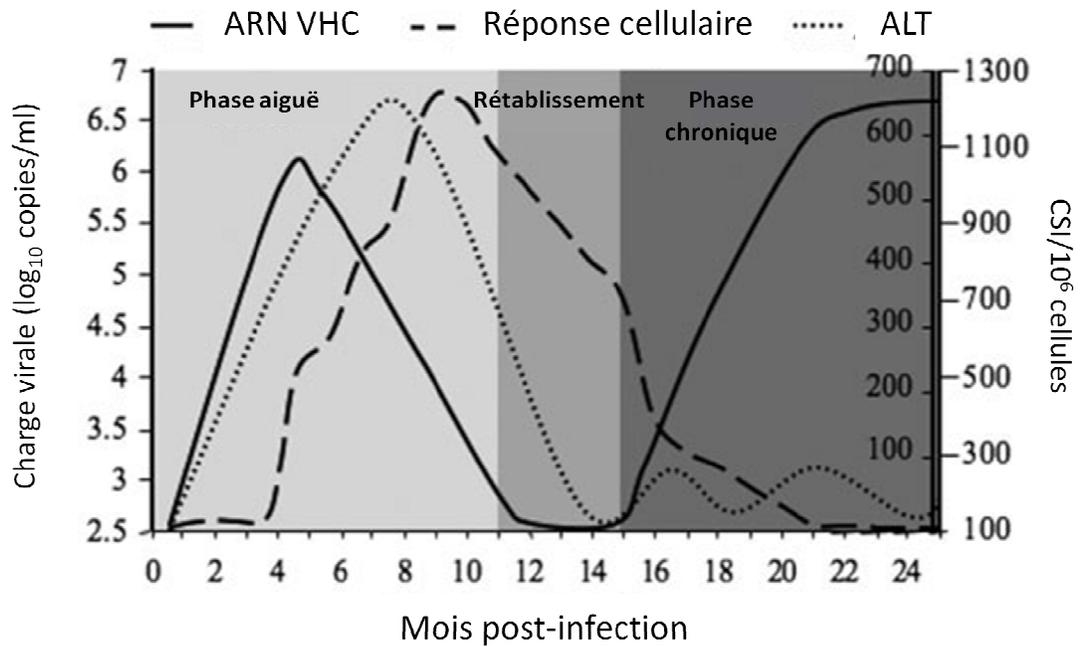


Figure 1.1. Histoire naturelle de l'hépatite C.

Le virus établit d'abord une infection aiguë qui reste souvent asymptomatique malgré une réplication active du virus et un niveau élevé d'ALT sérique. Dans près de 85% des cas, le virus persiste et établit une infection chronique dont les conséquences pourront mener à la cirrhose du foie et au CHC. CSI : cellules sécrétrices d'interféron. (Adapté de Blackard *et al.*, *Hepatology*, 2008).

1.1.3 Classification et diversité génétique

Le VHC fait partie du genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Le virus est classifié en 6 génotypes numérotés de 1 à 6 et chaque génotype est subdivisé en sous-types notés de *a* à *n*, où *n* est le nombre de sous-types inclus dans un génotype donné. On compte ainsi un total de 83 sous-types (13) qui diffèrent entre eux dans une proportion de 20% à 25% (14). Enfin, au sein d'une personne infectée, le virus se différencie en une population de variants à laquelle on réfère par le terme de « quasiespèce ». Les différents variants sont tous issus de l'inoculum initial, mais évoluent et acquièrent des mutations qui les distinguent les uns des autres (15). L'établissement du virus en quasiespèce lui confère un avantage face aux anticorps neutralisants de l'hôte et pose aussi le problème du développement rapide de résistance si on le soumet à un traitement spécifique.

1.1.4 Génome et caractéristiques générales

Le génome du VHC est constitué d'une molécule d'ARN simple brin (ARNsb) de polarité positive qui code une unique polyprotéine et qui est flanquée à ses extrémités 5' et 3' de séquences non traduites (5'NTR – 5' *non translated region*; 3'NTR – 3' *non translated region*) (**Figure 1.2**). On a prédit *in silico* que la région 5'NTR contenait quatre domaines structuraux (16; 17) qui constituent un site d'entrée interne du ribosome (IRES – *internal ribosome entry site*) servant à initier la traduction coiffe-indépendante de la polyprotéine (18). Après avoir été produite, la polyprotéine est clivée par des protéases virales et cellulaires pour donner les 10 protéines matures du virus (19). La région 3'NTR quant à elle contient des structures d'ARN agissant en *cis* et nécessaires à la réplication du génome (20). La particule virale a un diamètre de 55-60 nm et se compose d'une capsidie protéique renfermant le génome d'ARNsb et d'une enveloppe lipidique, dérivée de la membrane de la cellule hôte, dans laquelle s'insèrent des hétérodimères des protéines d'enveloppe E1 et E2 (**Figure 1.3**) (20). Les hépatocytes sont la première cible du VHC, mais on a démontré qu'une sous-population spécifique du virus pouvait également se répliquer dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*) dans un

contexte de co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (21).

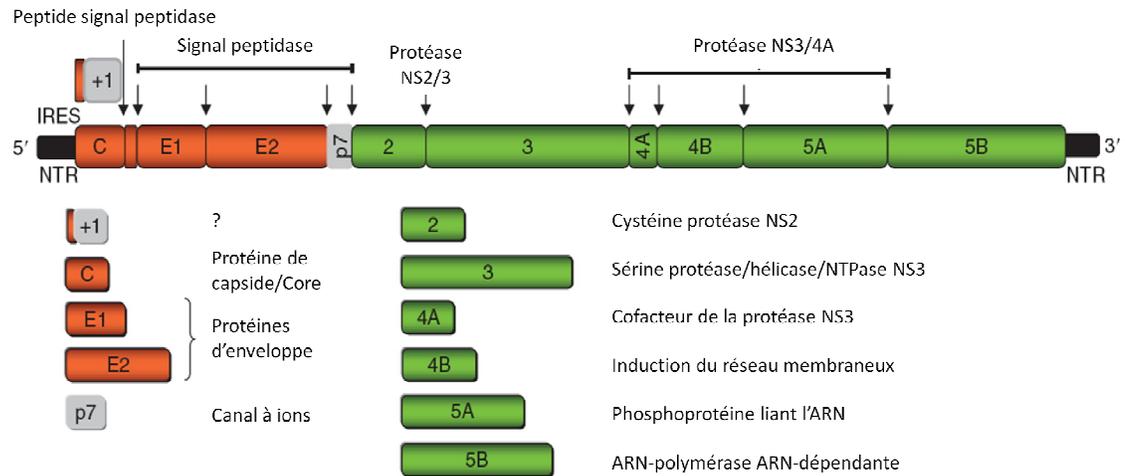


Figure 1.2. Organisation génomique du VHC.

Les gènes encodant les protéines structurales, notés en rouge, sont regroupés dans la région 5' du génome et sont précédés de la région 5'NTR. Les gènes encodant les protéines non structurales, notés en vert, se retrouvent en 3' du génome et sont suivis de la région 3'NTR. Les régions non transcrites 5'NTR et 3'NTR contiennent des structures secondaires d'ARN hautement conservées qui contribuent à la réplication virale. La région 5'NTR comprend notamment un IRES qui permet le recrutement coiffe-indépendante de la machinerie ribosomale et qui initie la traduction ininterrompue du génome complet. Il en résulte une polyprotéine qui sera clivée par des enzymes cellulaires et virales pour produire les protéines matures du VHC. (Adapté de Bartenschlager et Bühler, *Encyclopedia of Virology*, 2008).

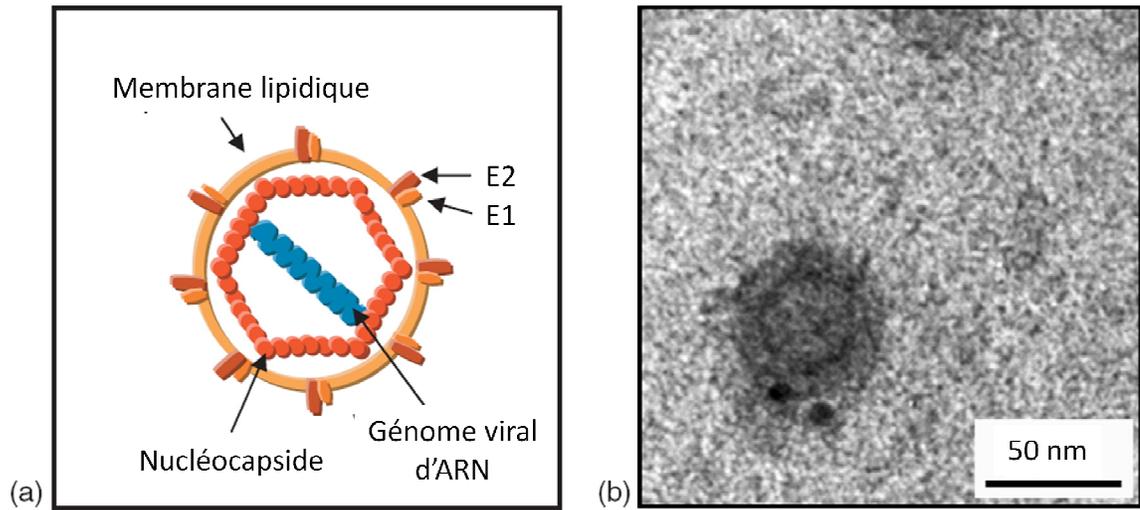


Figure 1.3. Structure de la particule virale.

A. Le génome d'ARNsb de polarité positive est entouré d'une capsidie composée principalement de la protéine Core. Le virus est recouvert d'une enveloppe lipidique parsemée des glycoprotéines E1 et E2, qui catalysent l'entrée virale. **B.** Micrographie électronique d'une particule de VHC produite en culture cellulaire. L'enveloppe a un diamètre d'environ 60 nm alors que la capsidie a un diamètre d'environ 30 nm (20). (Adapté de Bartenschlager et Bühler, *Encyclopedia of Virology*, 2008).

1.1.5 Protéines structurales

Parmi les protéines matures, on distingue 3 protéines structurales qui se trouvent à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine et qui précèdent les 7 protéines non-structurales (**Figure 1.2**). Les protéines structurales comptent la protéine de coque, ou Core, qui est la principale composante de la nucléocapside, et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 qui interagissent par des liens non-covalents pour former un complexe transmembranaire parsemant l'enveloppe (22). La sous-unité E2 de l'hétérodimère E1/E2 est celle qui est impliquée directement dans l'interaction entre le virus et ses récepteurs d'entrée (23).

1.1.6 Protéines non-structurales

Les protéines non-structurales comprennent les protéines p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (**Figure 1.2**). La protéine membranaire p7 s'organise en canaux à ions dans différents systèmes artificiels (24; 25), mais sa fonction dans le cycle répliatif reste mal comprise. La protéine NS2 est produite par l'action de l'auto-protéase NS2-3 qui clive l'extrémité N-terminale de NS3 pour libérer NS2 et la protéase NS3 (26). La fonction de NS2 est inconnue, mais on a démontré que cette protéine joue un rôle essentiel dans l'infectivité (27) et l'assemblage du virus (28). NS3 comporte un domaine sérine-protéase en N-terminal et un domaine ARN-hélicase/NTPase en C-terminal qui lui permettent de cliver les jonctions NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A et NS5A/B (29). Pour ce faire, la protéase NS3 a besoin de son co-facteur NS4A. Comme dans le cas de NS2 pour l'auto-protéase NS2-3, NS4A sert d'ancrage à la membrane pour la protéase NS3-4A (19). NS4B produit le réseau membranaire qui sert de structure d'échafaudage au complexe de répliation (30). NS5A est ancrée à la membrane par son hélice α N-terminale et est impliquée dans des interactions protéine-protéine spécifiques essentielles à la formation du complexe de répliation (31). Enfin, NS5B est l'ARN-polymérase-ARN-dépendante qui synthétise aussi bien les brins d'ARN complémentaires de polarité négative à partir du brin génomique que

les brins génomiques de polarité positive à partir de brins d'ARN complémentaires de polarité négative, et elle est retenue à la membrane par son domaine C-terminal (26).

1.1.7 Cycle de réplication

Le cycle de réplication viral s'amorce par l'entrée du virus dans une cellule-hôte. Cette étape nécessite l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 avec les récepteurs cellulaires de surface CD81 (32), SR-BI (33) et, dans une étape tardive de l'entrée, Claudine-1 (34). Ces facteurs ont longtemps été considérés comme nécessaires sans toutefois être suffisants pour permettre l'entrée virale, puisque des lignées cellulaires surexprimant ces trois récepteurs résistent à l'infection par le VHC (34). Le co-récepteur manquant, l'Occludine, a été récemment identifié (35; 36). En plus de ces quatre facteurs essentiels, certaines données suggèrent que les glycosaminoglycanes (GAG) et le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R – *low density lipoprotein receptor*) contribueraient aussi aux premières phases de l'entrée (37). L'importance des LDL-R a été exposée dans une récente étude qui démontre que l'apolipoprotéine E associée aux virions interagit avec ces récepteurs pour faciliter l'entrée virale (38).

La séquence exacte dans laquelle les différents événements se produisent n'est pas connue. La particule virale pourrait d'abord s'attacher indirectement à la cellule-hôte *via* une interaction entre les LDL-R et l'apolipoprotéine E. Ceci faciliterait les interactions directes de E1/E2 avec SR-BI et/ou CD81, qui elles-mêmes permettraient l'association du virus avec les protéines de jonctions serrées Claudine-1 et Occludine (39). L'étape finale d'entrée passerait par l'internalisation du virion lors d'une endocytose médiée par la clathrine, et la relâche du génome viral dans le cytoplasme grâce à l'acidification de l'endosome précoce (40; 41) (**Figure 1.4**). Le génome viral libéré peut alors s'associer à la sous-unité ribosomale 40S grâce à l'IRES trouvé dans sa région 5'NTR pour initier l'assemblage du complexe de traduction et la production de la polyprotéine virale (42). Le réseau membranaire se forme à ce moment, probablement à partir du réticulum endoplasmique rugueux, et permet la maturation des protéines virales par l'action des

protéases cellulaires et virales. Le réseau membranaire sert également d'échafaudage au complexe de réplication. Ce dernier synthétise des brins complémentaires d'ARN de polarité négative à partir du génome ainsi que des brins d'ARN de polarité positive à partir de la matrice d'ARN de polarité négative. Les brins d'ARN de polarité positive nouvellement produits pourront soit constituer les brins génomiques de nouveaux virions et être empaquetés dans des capsides, soit être directement traduits pour contribuer à la synthèse de nouvelles protéines virales.

Finalement, les étapes tardives du cycle de réplication sont mal connues. Les virions pourraient être produits par bourgeonnement dans le réticulum endoplasmique, puis simplement exportés par la voie de sécrétion cellulaire et relâchés par fusion de la vésicule sécrétoire à la membrane plasmique (26).

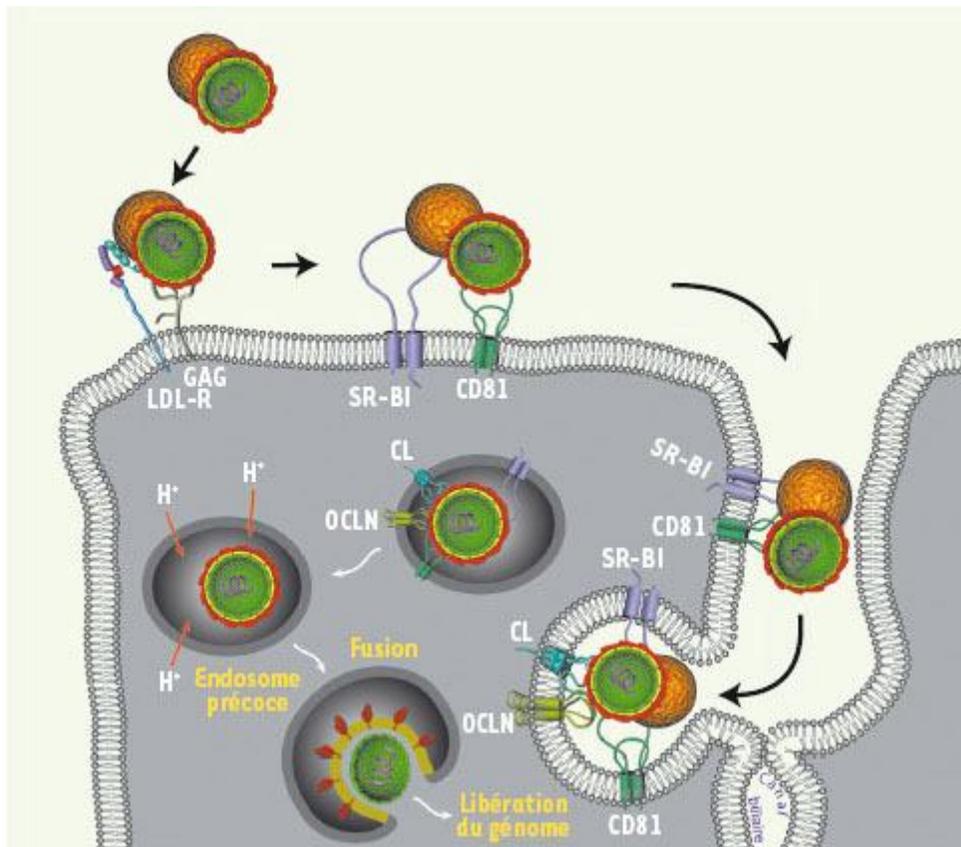


Figure 1.4. Mécanisme d'entrée du VHC.

La première interaction pourrait intervenir entre l'Apolipoprotéine E se trouvant associé à la surface du virion et les LDL-R. Viendrait ensuite une interaction directe entre les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, et les co-recepteurs d'entrée SR-BI et CD81. Ceci permet une migration du virion jusqu'à une jonction serrée où le virus complète la dernière étape avant l'endocytose en se liant à l'Occludine (OCLN) et Claudine-1 (CL) (39). (Tiré de Birke et Cocquerel, *Médecine Sciences*, 2009).

1.1.8 Évasion virale

Durant la phase aiguë de l'infection, le VHC parvient à battre de vitesse la réponse immunitaire initiale et produit déjà des milliards de nouvelles particules virales par jour au moment où la réponse des lymphocytes T s'amorce (8; 43). En plus de sa très grande vitesse de réplication, le virus dispose de nombreux moyens pour contrer la réponse immunitaire spécifique lorsque celle-ci se présente finalement. Par exemple, on a démontré chez le chimpanzé qu'une activation précoce et robuste des lymphocytes T CD4⁺ était nécessaire pour le contrôle de l'infection aiguë (43; 44). Cependant, en plus d'être activées, les cellules T CD4⁺ doivent également présenter un profil d'activation de type T_H1 pour initier la réponse cellulaire et être efficaces. Or on sait que la protéine Core du VHC se lie au récepteur gC1q sur les cellules dendritiques pour limiter l'expression d'IL-12, ce qui biaise les cellules T CD4⁺ vers une différenciation de type T_H2 et qui stimule une réponse humorale plutôt que cellulaire (45).

La réponse humorale s'avère inefficace contre le VHC puisque le haut taux de mutation dans les régions hypervariables d'E2 résulte en la production de nombreux variants échappant aux anticorps neutralisants et que la glycosylation d'E2 près du site de liaison à CD81 empêche les anticorps de se lier au virus dans cette région et d'inhiber l'attachement (46). Par ailleurs, même si les lymphocytes T CD4⁺ adoptent le profil T_H1, ce qui devrait normalement permettre une bonne coordination de la réponse des cellules T CD8⁺, le virus peut toujours échapper à la réponse cellulaire grâce aux mutations qui sont générées au sein de la quasiespèce pour de nombreux épitopes du VHC, ce qui affaiblit la reconnaissance par les cellules T CD8⁺, altère la liaison des peptides viraux aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou même modifie l'apprêtement des antigènes (47; 48).

Le virus possède aussi les outils pour contrecarrer les mécanismes cellulaires intrinsèques de résistance et de détection des pathogènes. En effet, la cellule infectée peut reconnaître des structures moléculaires propres aux pathogènes (PAMP – *pathogen-*

associated molecular pattern) par le biais des récepteurs reconnaissant les patrons moléculaires (PRR – *pattern-recognition receptor*). L'ARN double-brin (ARNdb) produit par le complexe de réplication du VHC est un PAMP qui est reconnu par le récepteur TLR3. Cette reconnaissance déclenche normalement une cascade de signalisation menant à la transcription d'interférons et de cytokines initiant la défense de l'hôte. Lors de la reconnaissance de l'ARNdb du VHC par le TLR3, un des facteurs de la cascade de signalisation qui en découle, IPS-1, est clivé par la protéase NS3-4A et le déclenchement de la réponse anti-virale est ainsi bloqué (49; 50). TRIF, un autre facteur de la voie de signalisation initiée par TLR3, est aussi clivé par NS3-4A, ce qui mène encore une fois à une réponse antivirale atténuée (51).

1.1.9 Traitement

Le traitement standard se compose d'une combinaison d'interféron-alpha (IFN- α) conjugué à du polyéthylène-glycol (pegIFN- α) administré par voie sous-cutanée une fois par semaine et de ribavirine administrée par voie orale une fois par jour, le tout pour une période de 48 semaines. Ce régime ne permet une réponse virologique soutenue (SVR – *sustained virologic response*) que chez 40% à 80% des patients (52; 53; 54; 55). Le taux de SVR est significativement plus bas chez les patients infectés par le VHC de génotype 1 que chez ceux infectés par les génotypes 2 ou 3 (56). Le génotype 1 étant de loin le plus prévalent en Amérique du Nord (3) et en Asie (57), la résistance est donc une limite majeure du traitement. Ce phénomène n'est probablement pas étranger à la non-spécificité du traitement par rapport au VHC. En effet, le mécanisme par lequel la combinaison de pegIFN- α et de ribavirine agit reste mal connu, mais implique probablement une modulation du profil d'activation des cellules T auxiliaires par la ribavirine ainsi que l'activation des mécanismes antiviraux cellulaires par l'IFN- α (56). En plus du haut taux de résistance, le traitement actuel peut provoquer d'importants effets secondaires (58).

Le telaprevir (VX-950), un inhibiteur spécifique à la sérine protéase NS3/4A, fait présentement l'objet d'essais cliniques de phase 3. Cette molécule a déjà démontré un bon

potentiel en phase 2 sur des patients infectés par un virus du génotype 1, avec des taux de succès atteignant 61% à 69% lorsque utilisé en combinaison avec le pegIFN- α et la ribavirine (59; 60). Cette nouvelle trithérapie ne représente toutefois pas la cure parfaite contre le VHC puisque le virus persiste toujours chez une partie des patients traités et que les effets secondaires qui y sont associés sont encore plus importants que pour la combinaison standard de pegIFN- α et de ribavirine (59; 60).

Enfin, la voie de la thérapie moléculaire a été considérée comme une alternative permettant de cibler des régions conservées du virus. En effet, plusieurs classes de petites molécules peuvent être synthétisées pour reconnaître spécifiquement des séquences du génome viral. Parmi ces molécules, on compte les petits ARN interférants (siRNA – *small interfering RNA*), les oligonucléotides antisens (ASON – *antisense oligonucleotide*), les aptamères ainsi que les ribozymes et les désoxyribozymes (61). Outre les aptamères, toutes ces molécules entraîneront, directement ou indirectement, le clivage de l'ARN viral suite à leur hybridation avec leur cible. Les aptamères quant à eux peuvent se lier directement aux protéines virales pour inhiber leur fonction, ou à l'ARN viral pour empêcher sa traduction (62; 63). Quoique plusieurs de ces molécules aient donné des résultats intéressants *in vitro*, on a observé *in vivo* qu'elles s'accumulent dans les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer plutôt que dans les hépatocytes, principal site de répllication du virus, et n'atteignent donc pas leur cible, ce qui constitue un obstacle majeur pour leur utilisation clinique (64).

Depuis la première description du VHC en 1989 (65), on considère que la meilleure façon de combattre le VHC passe par le développement d'un vaccin préventif. Ce vaccin n'existe toujours pas et la très grande diversité génétique du VHC a fortement ralenti les efforts déployés dans ce sens. Les quelques formules testées chez le chimpanzé ont échoué à procurer une immunité croisée aux animaux contre des virus hétérologues au génotype utilisé pour l'immunisation (66; 67). De plus, des études prospectives auprès de clientèles à haut risque pour l'infection au VHC ont montré que la réinfection suite à l'élimination spontanée du virus était toujours possible (68; 69; 70; 71).

1.1.10 Modèles d'étude

De toutes les difficultés qu'a rencontrées la recherche sur le VHC, l'absence d'un bon modèle d'étude, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, a été l'élément qui a le plus contribué à ralentir la caractérisation du virus et le développement de traitements (72). La production de particules virales infectieuses en culture cellulaire n'a été décrite pour la première fois qu'en 2005 (73; 74; 75). Cette avancée a été possible grâce à l'utilisation d'un isolat particulier du VHC de génotype 2a, désigné JFH-1, qui a été cloné à partir du sérum d'un patient japonais souffrant d'hépatite fulminante. Ce système demeurait cependant limité dans ses applications, ne pouvant être utilisé que dans la lignée cellulaire HuH-7, et sa validité pouvait être remise en question considérant que JFH-1 ne reflète qu'un seul génotype d'un virus extrêmement diversifié et présentait des propriétés qui n'ont jamais été retrouvées dans les autres isolats du VHC. Des constructions chimériques ont ensuite été développées à partir de l'isolat JFH-1 pour répondre à ces critiques ou pour augmenter l'efficacité du système. Par exemple, le remplacement de la région structurale de JFH-1 par celle d'un clone de génotype 2a a permis d'augmenter significativement l'infectivité du réplicon (73) et des chimères infectieuses reproduisant des virus de génotype 1a et 1b ont aussi été produites (76). Plus récemment, une équipe a mis au point une approche prometteuse qui permet l'infection persistante d'une culture d'hépatocytes primaires à partir d'un clone infectieux ou d'un virus sauvage isolé du sérum de patients (77). Ce système consiste en une co-culture d'hépatocytes primaires humains et de fibroblastes murins embryonnaires qui permet la formation de couches d'hépatocytes polarisés et reliés par des jonctions serrées sous forme de colonies. Le profil d'expression de plusieurs facteurs d'entrée du VHC dans ces colonies, notamment Claudine-1 et Occludine, est semblable à ce qu'on retrouve dans le foie humain.

Il existe par ailleurs trois systèmes expérimentaux pour l'étude du VHC *in vivo*. Le premier, le chimpanzé, pose des limites de disponibilité, de coûts et de taille d'échantillon, en plus de soulever des questions éthiques importantes (78). Le deuxième, la souris

chimérique avec foie humanisé, est obtenu en greffant des hépatocytes humains à une souris transgénique immunosupprimée chez qui la surexpression de l'activateur uPA est responsable de dommage hépatique important (79). Ces souris ne peuvent cependant être produites qu'en petits nombres et leur utilisation est limitée par des contraintes logistiques, en plus de ne pas permettre d'évaluer la contribution du système immunitaire sur la pathogenèse et le cours de l'infection. Enfin, le dernier système se base aussi sur une souris immunosupprimée pour assurer la tolérance envers une xéno greffe. Dans ce cas-ci, les cellules greffées sont dérivées de la lignée Huh-7, elle-même établit à partir d'un carcinome hépatocellulaire, et sont permissives au clone JFH-1 (80). Cependant, les souris greffées développent rapidement d'importantes tumeurs et doivent être sacrifiées quatre semaines seulement après l'infection. Elles ne permettent donc pas de suivre les effets des composantes virales à long terme.

1.2 Protéine F

1.2.1 Protéine Core

La protéine de capsid Core est une protéine de 21 kDa codée par un cadre de lecture de 537 paires de bases (pb). On lui a attribué des fonctions associées à la pathologie du VHC, notamment au niveau de la fibrose, de la stéatose et du CHC. Parmi ses fonctions contribuant à la stéatose, Core réorganise la distribution des gouttelettes lipidiques intracellulaires en s'associant à celles-ci et cause leur accumulation dans l'espace périnucléaire (81). Core peut également causer la stéatose *via* l'accumulation des lipoprotéines de très basse densité (VLDL – *very low density lipoprotein*) en empêchant leur sécrétion (82).

Core affecte aussi les mécanismes d'apoptose dans le but d'assurer la persistance virale, soit en inhibant la mort cellulaire ou en la provoquant, selon la situation. Elle agit comme régulateur positif de l'apoptose par la voie Fas dans une lignée cellulaire de

lymphocytes T lymphoblastoïdes en stimulant l'oligomérisation de Fas (83; 84), et par la voie du facteur de nécrose des tumeurs (TNF – *tumor necrosis factor*) dans les lignées HepG2 et HeLa (85). Elle stimule aussi l'apoptose en induisant un stress du réticulum endoplasmique (RE) et une déplétion en calcium du RE (86). L'induction de l'apoptose des hépatocytes est une cause importante de la fibrogenèse car elle cause une inflammation *via* l'activation des cellules stellaires qui phagocytent les corps apoptotiques (87).

Core cause aussi l'effet contraire en inhibant l'apoptose. Par exemple, elle protège des hépatocytes transgéniques exprimant le génome complet du VHC et la lignée HepG2 transfectée de l'apoptose induite par la voie de Fas et du TNF en activant NFκB (88; 89) et en inhibant la relâche du cytochrome c des mitochondries (90). On sait que l'inhibition de l'apoptose est un facteur déterminant pour la promotion de la carcinogénèse dans les cellules exprimant la protéine X (HBx) du virus de l'hépatite B (VHB) (91) et Core pourrait contribuer à l'oncogénèse de la même manière.

Un autre mécanisme par lequel Core pourrait stimuler le développement du CHC serait en interagissant et en modulant de manière post-traductionnelle la fonction des suppresseurs de tumeur p53 (92; 93) et p73 (94) et en régulant l'expression de p21 (95; 96; 97; 98). Elle régule aussi la transcription de certains proto-oncogènes, notamment *c-myc* (99), et collabore avec *H-ras* pour transformer des fibroblastes murins en culture primaire (100). Enfin, Core promeut la transformation cellulaire *via* l'activation du facteur de transcription STAT3 (101). Cependant, les données les plus importantes qui ont permis de décrire le rôle de Core dans la pathogénèse de l'hépatite C sont venues des modèles de souris transgéniques. Dans un premier modèle, des souris exprimant Core spécifiquement au foie développaient des stéatoses hépatiques dès l'âge de trois mois (102) et des CHC après 16 à 19 mois (103). Dans une seconde étude, l'expression des protéines structurales du VHC dans les lymphocytes T de la souris entraînait des infiltrations lymphocytaires dans le foie desquelles découlaient des dommages hépatiques (104). Bien que dans cette dernière étude les protéines E1 et E2 étaient co-exprimées avec Core, une autre souris

transgénique dans laquelle seulement E1 et E2 étaient exprimées au foie ne produisait aucun phénotype (105).

1.2.2 Découverte de la protéine F

Malgré la très grande diversité génétique du VHC, des analyses bioinformatiques du profil de distribution des substitutions nucléotidiques sur le génome ont rapidement révélé un niveau anormalement élevé de conservation de la séquence dans région encodant Core; on y remarquait notamment une suppression des substitutions synonymes (106; 107). Cette particularité suggérait une contrainte fonctionnelle sur les substitutions dans cette région. De fait, on y a découvert un cadre de lecture ouvert en (+1) de la séquence codant Core (106) ainsi que des structures secondaires d'ARN (107), qui pouvaient tous deux expliquer la conservation de la séquence. Il a fallu attendre jusqu'en 2001 pour finalement voir deux équipes indépendantes rapporter l'expression d'une protéine de 16-17 kDa correspondant au cadre de lecture ouvert en (+1) de la région Core chez des patients infectés par le VHC (108; 109). Cette protéine fut nommée F (*frameshift*), ARFP (*alternate reading frame protein*) ou simplement Core (+1). Le cadre de lecture ouvert l'encodant est conservé parmi tous les génotypes du VHC (108). Bien que la protéine n'ait jamais été détectée directement dans le sérum de patients, de nombreuses évidences sont venues confirmer qu'elle était bien exprimée durant l'infection chez l'humain et qu'elle suscitait l'élaboration d'une réponse immunitaire spécifique, aussi bien cellulaire qu'humorale (110; 111; 112; 113).

1.2.3 Modes de production

Dans leur première publication sur l'expression de la protéine F, Xu et collègues proposaient que celle-ci était produite par initiation de la traduction à partir du codon AUG de Core et qu'il s'ensuivait un glissement ribosomal (-2/+1) du cadre de lecture aux codons 8 à 11 de Core (109) (**Figure 1.5**). Le mécanisme de glissement ribosomal décrit était stimulé par une séquence ininterrompue de 10 adénines aux codons 8 à 11 et fut confirmé par une autre équipe peu après la découverte de l'expression de la protéine F (114). Or, si le cadre de lecture ouvert de la protéine F est conservé dans tous les génotypes, il n'en est pas

de même pour la séquence de 10 adénines qu'on croyait être responsable du glissement ribosomal (-2/+1) et de la production de la protéine F (111; 115). L'expression d'une protéine de 16 kDa, correspondant à la protéine F, avait d'ailleurs été rapportée auparavant à partir d'isolats qui ne présentaient pas la séquence de 10 adénines (116).

Des études subséquentes ont donc tenté de démontrer quel mécanisme pouvait permettre l'expression de la protéine F dans les conditions où la séquence d'adénines était absente. Plusieurs hypothèses ont été testées par différentes équipes et utilisant différents systèmes expérimentaux. Vassilaki *et al.* ont d'abord montré dans deux lignées cellulaires qu'une initiation de la traduction à partir de deux codons AUG aux codons 85(+1) et 87(+1) produisait une version tronquée, plus courte de la protéine F, sans toutefois exclure la possibilité d'une co-expression d'une version plus longue de la protéine (117). Une autre équipe a plutôt démontré dans trois systèmes, soit *E. coli*, des lysats de réticulocytes de lapin et des cellules HeLa, que l'expression de la protéine F résultait d'un double événement de changement de cadre de lecture, d'abord (+1) au codon 42, puis (-1) au codon 144 pour revenir dans le cadre de lecture de Core (118). Il résultait de ce mécanisme une protéine hybride Core/F (DFC – *double frameshifted Core*). Cependant, l'hypothèse du changement de cadre de lecture au codon 42 est discutable. En effet, ce phénomène a été observé chez *E. coli* et le codon AGG qui promouvait le glissement ribosomal est un codon rare chez les procaryotes. La présence de ce codon rare pourrait ralentir les ribosomes et ainsi provoquer le glissement (119). Le codon AGG n'étant pas rare chez l'homme, il est peu probable qu'un tel événement se produise durant l'infection naturelle.

Enfin, Baril et Brakier-Gingras ont proposé que la protéine F était produite par initiation de la traduction à un codon non-AUG en position 26(+1) (115). Il s'avéra que le codon non-AUG 26(+1) pouvait être soit GCG ou GUG et cette hypothèse fut prouvée dans un système de lysat de réticulocytes de lapin ainsi que dans la lignée cellulaire HEK293FT. Par ailleurs, Baril et Brakier-Gingras ont observé une augmentation de l'expression de leur construction après qu'ils aient modifié celle-ci pour inclure la région comportant les codons

initiateurs 85(+1) et 87(+1) dont le rôle dans la production de la protéine F avait précédemment été exposé par Vassilaki et ses collaborateurs (115).

Des études postérieures sont venues supporter les hypothèses de changement de cadre de lecture par glissement ribosomal aux codons 8-11 (120; 121) et de l'initiation de la traduction aux codons 85(+1) et 87(+1) (122). Une autre encore est venue ajouter une hypothèse pour expliquer le changement de cadre de lecture aux codons 8-11 avec la possibilité que la polymérase virale produise des délétions ou des insertions ponctuelles dans cette région précise au moment de la transcription (*transcriptional slippage*) (123). Les deux hypothèses qui ressortent sont donc celle de l'initiation du cadre de lecture à un codon 26(+1) non AUG et celle des codons initiateurs 85(+1) et 87(+1). Ces deux hypothèses n'étant pas mutuellement exclusives, ceci laisse croire que la protéine F pourrait représenter une famille de protéines qui seraient toutes issues du même cadre de lecture.

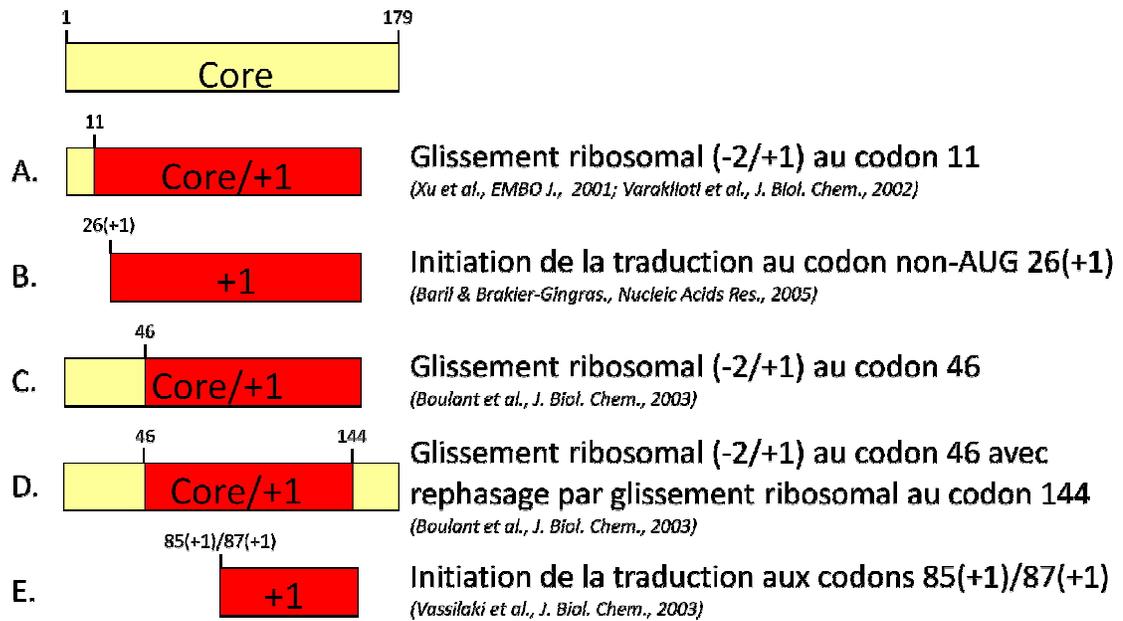


Figure 1.5. Modes de production de la protéine F.

Les hypothèses quant au mode de production de la protéine F incluent des protéines hybrides portant des portions encodées dans le cadre de lecture de Core (jaune) et dans le cadre (+1) (rouge), ainsi que des protéines issues exclusivement du cadre de lecture (+1). La position du codon stop dans le cadre (+1) varie selon les hypothèses et les génotypes du virus. Les positions des codons d'importance sont notées au-dessus des protéines et numérotées par rapport au premier codon du cadre de lecture de Core.

1.2.4 Propriétés biochimiques et biologiques

Toutes les versions proposées de la protéine F sont hautement basiques avec un point isoélectrique de 11.5 (124). Des analyses d'hydrophobicité par la méthode de Kyte et Doolittle ont exposé la présence de deux domaines majeurs d'hydrophobicité sur la protéine correspondant aux résidus 29 à 45 et 95 à 118 (125). On a prédit *in silico* que la protéine devait être très instable (125), une prédiction qui appuyait les données récoltées précédemment à partir de la synthèse de la protéine *in vitro* et de tests en culture cellulaire qui ont mesuré sa demi-vie à environ 10 minutes (126; 127). Il a aussi été démontré que la protéine F était dégradée par le protéasome (125; 126; 128). La protéine F partage peu d'homologie avec les autres protéines virales et cellulaires connues et il est donc difficile de prédire sa fonction biologique (114).

1.2.5 Localisation intracellulaire

La protéine F semble avoir une localisation cellulaire ubiquitaire. D'abord, bien qu'elle ne possède aucun domaine transmembranaire (125), la protéine a été trouvée associée au réticulum endoplasmique par différentes équipes (122; 125; 126; 127). Elle a également été observée dans le cytoplasme (122; 125; 129), dans la région périnucléaire (122; 126; 130), au noyau (129; 131) ainsi qu'aux mitochondries (122; 129). Comme pour le mode de production de la protéine F, le système expérimental utilisé influence grandement la localisation intracellulaire de la protéine. Entre autres, Ratinier et collègues ont montré que la simple fusion de la protéine F avec la protéine verte fluorescente (GFP – *Green fluorescent protein*) pouvait modifier sa localisation à différents compartiments cellulaires selon que la GFP était fusionnée en N-terminal ou en C-terminal (129). Ils ont aussi démontré que la localisation variait en fonction de la version de la protéine et du génotype étudié, renforçant ainsi l'idée que la protéine F puisse se présenter sous plusieurs formes et posséder différentes propriétés biologiques en différentes circonstances.

1.2.6 Fonctions biologiques

Les études qui ont porté sur Core ont toujours été effectuées avec des constructions basées sur des séquences de type sauvage contenant le cadre de lecture de la protéine F. En théorie, ces séquences permettaient donc une co-expression des deux protéines. Suite à la découverte de la protéine F, il semblait donc approprié de réévaluer les fonctions initialement attribuées à Core afin de départager le rôle de chacune des deux protéines. Si les études liées aux fonctions de la protéine F ont été peu nombreuses et parcellaires jusqu'à maintenant, un consensus s'est rapidement établi quant à son rôle négligeable dans la complétion du cycle de réplication du VHC. En effet, les systèmes de réplicons subgénomiques avaient déjà démontré que le génome viral pouvait se répliquer sans la portion Core du génome, et donc sans la protéine F, avant même la première description de cette dernière (132; 133). De plus, dans une étude plus spécifique qui utilisait le clone infectieux en culture cellulaire JFH-1 et une chimère du génome prototype H77 avec JFH-1, l'introduction de mutations non-sens dans le cadre de lecture de Core (+1) n'altérait ni la réplication virale, ni la production de virions, ni la relâche de particules virales *in vitro*, pas plus que la prolifération virale chez des souris avec foie humanisé (134).

Ces informations sur le cycle de réplication virale n'excluent toutefois pas un rôle de la protéine F dans l'infection naturelle, où la présence d'une réponse immunitaire et l'évasion et la persistance virale constituent un contexte qui ne peut être reproduit avec les méthodes expérimentales actuelles. Il est intéressant de constater que l'expression de la protéine F est réprimée par Core *in cis* ou *in trans* (125; 135). Ce lien inverse entre la réplication virale, qui implique un haut niveau de production de Core, et l'expression de la protéine F pourrait expliquer la faible expression de la protéine *in vitro* et la difficulté de la détecter *in vivo*. Cette régulation suggère aussi un rôle durant les phases de faible réplication virale, soit très tôt ou tard dans la phase chronique, et une participation à la persistance du virus de même qu'à la pathogenèse. On a d'ailleurs démontré que la protéine F assumait plusieurs fonctions antérieurement attribuées à Core et reliées à l'oncogenèse et à la fibrogenèse. On sait par exemple qu'elle diminue l'expression de p21 (136), un gène

suppresseur de tumeur qui inhibe les kinases cycline-dépendantes pour contrôler l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en réponse à un stress (137). Elle pourrait aussi affecter indirectement p21 *via* son action sur un autre gène suppresseur de tumeurs, p53 (138), mais ces résultats sont contestés (136). Une étude utilisant le système double-hybride chez la levure et la co-immunoprécipitation a montré que la protéine F pouvait lier MM-1 et interférer avec sa capacité d'inhiber le proto-oncogène *c-Myc in vitro* (130). Une autre équipe a également observé une augmentation de l'expression de *c-Myc* suite à la transfection de cellules HepG2 avec la protéine F (138). Ces fonctions sont toutes associées au contrôle du cycle cellulaire. Corroborant aussi l'idée que le virus puisse imposer son contrôle du cycle cellulaire *via* l'expression de la protéine F, on a remarqué que cette dernière s'associait à la tubuline et aux microtubules durant la division cellulaire (124; 125) et à PFD2 pour perturber le cytosquelette de tubuline (131). L'ensemble de ces données expose un rôle potentiellement direct de la protéine F dans le développement du CHC.

Outre la transformation cellulaire opérée directement par des gènes viraux, il est généralement reconnu que l'apparition du CHC constitue une étape avancée de la cirrhose dans les hépatites chroniques virales (87). Certaines données nous amènent à croire que la protéine F participerait directement à ce processus en induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou chimiotactiques telles que l'IL-6, l'IL-8, MCP-1 et MIP-1 β , promouvant ainsi la fibrose et le dommage hépatique (139).

La régulation de gènes suppresseurs de tumeurs, de proto-oncogènes et de protéines pro-inflammatoires par la protéine F constitue possiblement un moyen pour le virus de persister chez son hôte en contrôlant le cycle cellulaire des cellules infectées et en modulant la réponse immunitaire. Une étude de double-hybride chez la levure a relevé 36 partenaires d'interaction pour la protéine F (140) et des travaux sur la lignée cellulaire Huh-7 ont relevé par micropuces une répression de l'expression de 125 gènes et une augmentation de l'expression de 143 autres gènes lorsque la protéine était exprimée (141). Parmi les partenaires d'interaction et gènes dont l'expression était modifiée par la protéine F, on compte des gènes et des protéines impliqués dans le métabolisme des glucides, la synthèse

et le transport des protéines, la transduction de signaux, la transcription, l'apoptose, l'immunorégulation au niveau humoral et cellulaire, et l'oncogenèse (140; 141).

1.2.7 Reconnaissance immunitaire

L'existence de réponses cellulaire et humorale spécifiques à la protéine F a été le principal indice qui a permis de déterminer hors de tout doute que la protéine était bel et bien exprimée lors de l'infection naturelle. De manière générale, on retrouve une réponse humorale anti-F chez 40 à 70% des patients infectés chroniquement, et ce indépendamment du génotype, du titre viral et de la co-infection avec le VIH-1 (111; 112; 113; 142). Par ailleurs, si la majorité des patients développent des anticorps contre la protéine seulement durant la phase chronique, il a aussi été montré qu'une réponse humorale anti-F pouvait être montée durant la phase aiguë de l'infection chez une faible proportion de patients (143). Du côté de la réponse cellulaire, 20% des patients possèdent des lymphocytes T CD4+ fonctionnels spécifiques à des épitopes de la protéine F (111) alors qu'environ 80% des patients d'une deuxième étude présentaient des précurseurs de cellules T cytotoxiques spécifiques à la protéine F (112). Des cellules T CD8+ mémoires pouvant être activées par la présentation de peptides dérivés de la protéine F ont aussi été retrouvées chez des patients infectés (111).

En accord avec la grande conservation de la séquence Core (+1), les anticorps anti-F présentent une grande réactivité croisée avec les protéines produites à partir de différents génotypes (110; 113; 142) et leurs titres peuvent être aussi élevés que ceux des anticorps anti-Core (110). Le même phénomène est observé pour les cellules T spécifiques à la protéine F, qui peuvent réagir à des peptides viraux issus de différents génotypes (111; 112). Ceci ferait de la protéine F un candidat intéressant à inclure dans une formule vaccinale dans le cas où la réponse anti-F serait protectrice contre le VHC.

1.2.8 Structures secondaires d'ARN

Des prédictions *in silico* ont suggéré l'existence de structures secondaires d'ARN hautement conservées dans la région génomique de Core, formant quatre tiges-boucles nommées respectivement SL47, SL87, SL248 et SL443 (17; 107) (**Figure 1.6**). Avant la découverte de la protéine F, on avait proposé que ces structures étaient responsables de la conservation de la séquence dans la région Core (107). Non seulement ces structures sont-elles conservées à travers les différents génotypes de VHC, mais on en retrouve de semblables chez d'autres virus où on leur a souvent attribué des rôles dans la réplication virale et la modulation de la réponse immunitaire (144). Dans le cas du VHC, deux équipes ont récemment publié des résultats démontrant l'importance des structures d'ARN *in vitro* et *in vivo* (134; 145). La première de ces études, menée par l'équipe de Charles Rice, a démontré grâce à une série de mutations dans un clone infectieux qui influençaient soit les structures secondaires d'ARN de la région génomique de Core, soit le cadre de lecture Core (+1), que ce dernier n'était pas essentiel à la réplication virale et à l'établissement de l'infection chez le chimpanzé (145). De plus, des réversions rétablissant les structures secondaires d'ARN étaient sélectionnées au cours de l'infection.

La deuxième étude, menée par l'équipe de Ralf Bartenschlager, a aussi utilisé une approche de mutagenèse dirigée pour générer des mutants affectant soit la structure d'ARN, soit la production de la protéine F. Elle a montré que les mutations modifiant les structures secondaires affectaient la réplication et le potentiel d'infection du virus dans un modèle de souris avec foie humanisé, contrairement aux mutations non-sens dans le cadre de lecture (+1) (134). Parmi les quatre tiges-boucles présentes dans cette région, deux d'entre elles, SL47 et SL87, semblent avoir une plus grande importance fonctionnelle (134). Cependant, ces études sont basées sur des prédictions *in silico* de repliement de l'ARN et aucune preuve n'a été apportée en laboratoire pour démontrer l'existence véritable de ces structures au sein de l'ARN génomique du VHC. Les conclusions auxquelles en viennent les auteurs de ces études sont aussi questionnables puisque les substitutions ciblées pour modifier la

structure d'ARN introduisaient des codons rares dans le cadre de lecture (+1). Ceci pourrait diminuer ou même empêcher la traduction de la protéine F dans ces modèles. À cet effet, aucune des deux études n'a réussi à démontrer que la production de la protéine F était véritablement inhibée dans leur système lors de l'introduction des codons non-sens ou que, au contraire, elle était produite dans les situations où on visait la modification de la structure secondaire tout en conservant le cadre de lecture ouvert en (+1). De plus, les évidences apportées par rapport à l'importance des structures d'ARN ne modifient en rien les hypothèses concernant le rôle de la protéine F dans le maintien de l'infection dans un contexte naturel. Les fonctions dont pourraient être responsables les structures SL47 et SL87 ne permettent pas non plus d'expliquer les résultats qui avaient précédemment été générés par rapport aux fonctions présumées de la protéine F.

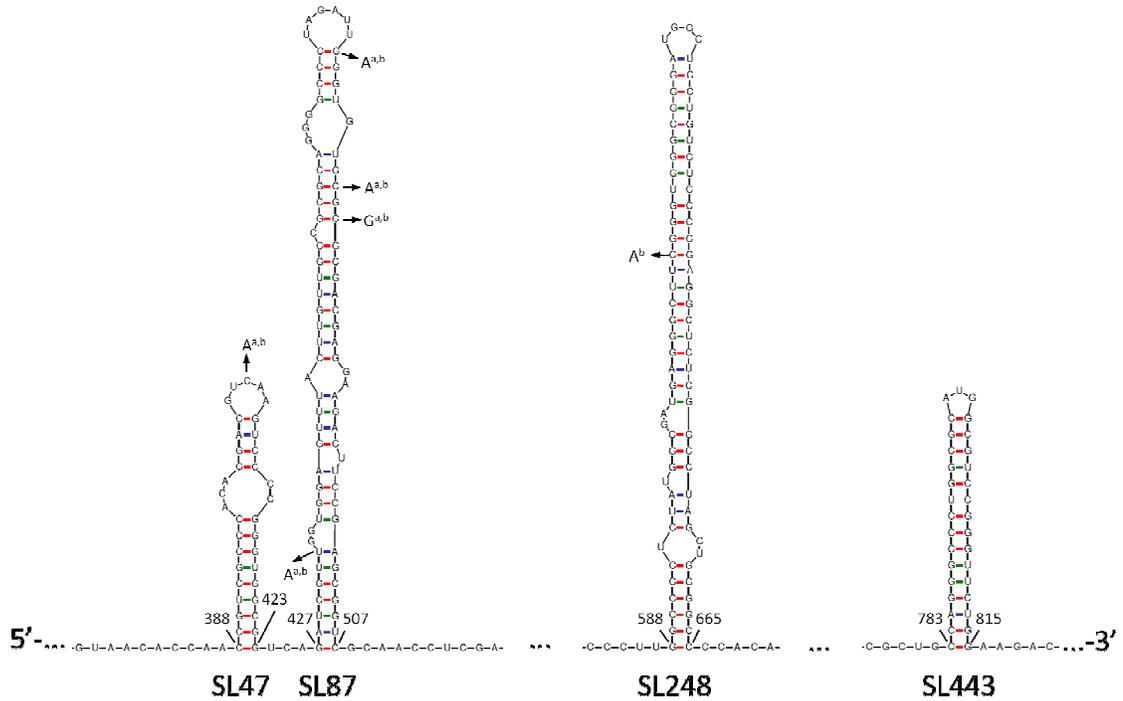


Figure 1.6. Structures secondaires d'ARN dans la région génomique de Core.

Quatre structures en tige-boucle ont été prédites *in silico* à partir de la séquence nucléotidique de l'ARN génomique du gène Core. Les substitutions non-sens introduites dans le cadre Core (+1) par ^aMcMullan *et al.* (145) et ^bVassilaki *et al.* (134) sont indiquées. La position des bases notée au-dessus de la séquence d'ARN correspond à la numérotation du génome prototype H77 (GenBank, numéro d'accès AF009606).

1.3 Poisson zébré

1.3.1 Avantages pratiques

Si la souris a longtemps été préférée pour son haut degré d'homologie et ses ressemblances anatomiques avec l'homme, l'avancé de la biologie cellulaire a révélé que les mécanismes cellulaires qui s'opèrent chez des animaux inférieurs, comme la drosophile (146) et le ver *Caenorhabditis elegans* (147), sont conservés par rapport aux mammifères. L'aisance relative des manipulations génétiques chez les invertébrés leur confère un grand avantage par rapport aux modèles de mammifères et la puissance des études qui les utilisent est assurée par le grand échantillon qu'on peut facilement produire pour ces espèces. L'absence d'organes et de plusieurs tissus différenciés limite toutefois l'extrapolation à l'homme des découvertes faites chez les invertébrés.

Le poisson zébré, *Danio rerio*, un poisson de l'infra-classe des téléostéens, est un animal qui présente de nombreux avantages pratiques et qui peut remplacer avantageusement de nombreux autres modèles traditionnellement utilisés dans des domaines aussi divers que la génétique, la biologie développementale et le cancer. De nombreuses méthodes de clonage (148), de mutagenèse (149; 150; 151), de transgénèse (152) et de cartographie génétique (153) ont été développées pour ce modèle. Le poisson zébré concilie les avantages des invertébrés avec ceux d'un animal qui partage la même ontogenèse et une structure organismique très proche des mammifères. En plus des outils moléculaires qui ont été développés et appliqués au poisson zébré, ce dernier peut être maintenu en grands nombres dans des espaces restreints et à peu de frais. Les individus atteignent leur maturité sexuelle à 3 mois et peuvent dès lors produire des centaines d'embryons en quelques minutes au moment voulu par l'expérimentateur. De plus, le développement *ex vivo* de son embryon transparent facilite l'utilisation de marqueurs colorimétriques chez l'animal vivant. Les adultes mesurent de 3 à 6 cm, demandent peu d'entretien et résistent bien aux manipulations et aux variations environnementales.

1.3.2 Utilisation du poisson zébré en recherche biomédicale

Le poisson zébré s'est d'abord établi comme organisme modèle dans le domaine de la biologie développementale (154). Un certain nombre d'études se sont par la suite intéressées plus spécifiquement au développement du foie (155). Les effets d'un grand nombre de mutations sur le développement du foie ont été caractérisés pour arriver à une meilleure compréhension de l'hépatogenèse. Ces travaux ont confirmé que la maturation hépatique survenait de la même manière chez le poisson zébré que chez la souris (156). Ces recherches ont aussi mené à l'identification de promoteurs tissus-spécifiques, parmi lesquels on compte le promoteur de la *liver fatty acid binding protein* (L-FABP) qui restreint l'expression du gène au foie dès les premières heures de l'embryogenèse (157; 158) et qui a permis de cibler l'expression de marqueurs fluorescents au foie pour faciliter la visualisation du phénotype chez des mutants durant leur développement (159).

En cancérologie, on connaît depuis plusieurs dizaines d'années la similarité frappante entre les caractéristiques histologiques des tumeurs de mammifères et de poissons et entre les facteurs qui contribuent au développement de tumeurs chez les deux espèces (160). Dans la nature, les poissons développent d'ailleurs spontanément les mêmes types de cancers que les humains (161). La caractérisation plus récente des mécanismes moléculaires et cellulaires s'opérant durant la transformation cellulaire et le développement de tumeurs a permis d'expliquer les similarités qui avaient été observées. Des études de génomique comparative ont d'abord exposé la conservation des gènes régulant le cycle cellulaire, des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes (162). De nombreuses recherches ont aussi été complétées à partir de mutations introduites dans des gènes suppresseurs de tumeurs ou de lignées transgéniques surexprimant certains oncogènes (163). Dans tous les cas, les gènes mutés chez le poisson zébré avaient un gène orthologue chez la souris et chez l'homme.

Enfin, des études de génomique fonctionnelle ont confirmé et élargi les perspectives de modélisation du cancer chez le poisson zébré en comparant le profil d'expression des gènes impliqués dans la progression de tumeurs chez le poisson zébré et l'homme à l'aide

de micropuces (164; 165). Les auteurs de ces recherches ont démontré que plusieurs gènes surexprimés ou réprimés durant le développement des tumeurs du foie, de l'estomac, du poumon et de la prostate chez le poisson zébré avaient le même profil d'expression différentielle chez l'humain. La conservation était particulièrement marquée pour les gènes du foie. Dans ce type précis de tumeurs, les gènes dont l'expression était modifiée appartenaient à des processus cellulaires importants et associés à la transformation cellulaire, plus précisément au contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération, à l'apoptose, à la réplication et la réparation de l'ADN, à la synthèse protéique, et à l'organisation cytosquelettique (164; 165).

1.3.3 Anatomie comparée du foie

Contrairement au foie embryonnaire, peu de données concernant le foie adulte du poisson zébré ont été amassées. Le foie assume les mêmes fonctions de métabolisme, détoxification et homéostasie chez le téléostéen que chez l'homme, mais diffère sur certains points en termes anatomiques. Par exemple, le foie des téléostéens est composé d'un seul lobe alors qu'il en compte trois chez les mammifères (166). Les radicules de la veine porte hépatique, les artères hépatiques et les conduits biliaires sont distribués aléatoirement dans le parenchyme hépatique et les hépatocytes sont arrangés en tubules entourant les canalicules biliaires chez le poisson zébré, tandis que les radicules de la veine porte hépatique, les artères hépatiques et les conduits biliaires sont regroupés en triades portales et les hépatocytes arrangés en bicouches pour former les canalicules biliaires chez le mammifère (167) (**Figure 1.7**). Outre ces différences, pour rejoindre le tube digestif la bile sort du foie du poisson zébré par des conduits extrahépatiques semblables en structure et en organisation à ceux retrouvés chez les mammifères (167). Par ailleurs, les propriétés et mécanismes de régénération de l'organe du poisson zébré sont également similaires à ceux des mammifères (168). De plus, si le foie conserve les mêmes mécanismes cellulaires et moléculaires et assume les mêmes fonctions biologiques, il présente aussi le même profil histologique chez les deux espèces en ce qui concerne des pathologies comme la stéatose, la fibrose et la néoplasie (156).

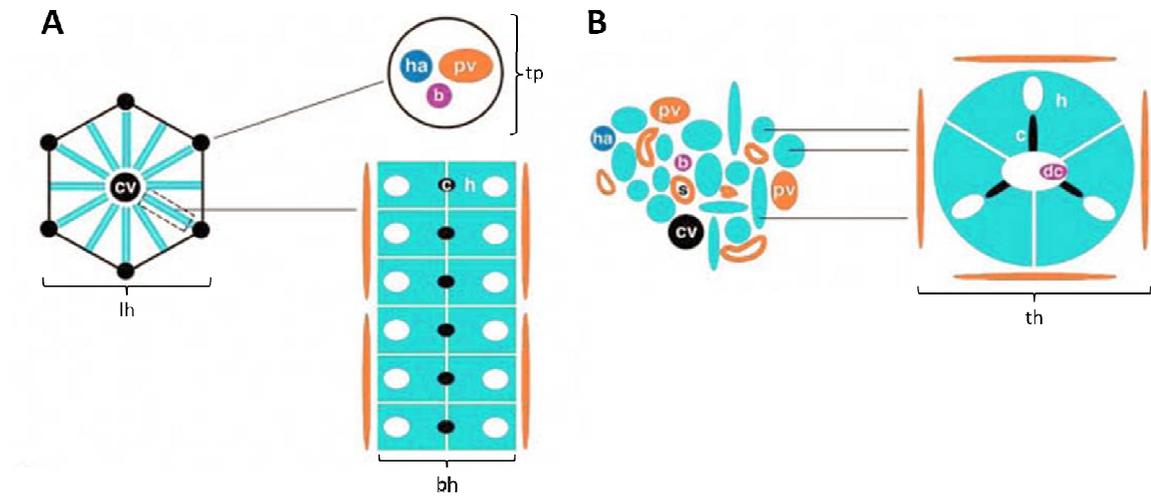


Figure 1.7 Anatomie comparée du foie des mammifères et des téléostéens.

A. Chez le mammifère, les hépatocytes (h) s'organisent en bicouches (bh) polarisées au milieu desquels les canalicules (c) sont formés par une région spécialisée de la membrane apicale des hépatocytes. Des triades portales (tp) composées de canaux biliaires (b), d'artères hépatiques (ha) et des radicules de la veine porte hépatiques (pv) entourent les bicouches d'hépatocytes pour compléter le lobule hépatique (lh), défini comme l'unité fonctionnelle du foie. Le sang arrive dans le lobule hépatique *via* la veine centrale (cv). **B.** Le lobule hépatique est moins bien défini chez les poissons téléostéens. Chez ces poissons, plutôt que de s'organiser en bicouches, les hépatocytes (h) forment des tubules (th) au milieu desquels se trouvent les canalicules biliaires. Les triades portales, clairement définies chez les mammifères, n'existent pas chez les téléostéens; les canaux biliaires (b), artères hépatiques (ha) et radicules de la veine porte hépatique (pv) sont répartis aléatoirement à travers les tubules d'hépatocytes (167). (Adapté de Lorent *et al.*, *Development*, 2004).

1.3.4 Transgénèse

Un des grands avantages du poisson zébré par rapport à la souris est la facilité avec laquelle on peut en modifier le génome. La ponte d'un grand nombre d'œufs transparents presque sur demande a fait de la transgénèse une approche très attirante pour répondre à plusieurs types de questions de recherche. Pour y arriver, plusieurs techniques ont été explorées, soit la microinjection (152), l'électroporation (169), le fusil à particules (170), et la transplantation de cellules embryonnaires dans la blastula (171). La microinjection se résume en l'injection d'une construction génétique dans le cytoplasme d'un embryon unicellulaire à l'aide d'une aiguille et d'un microinjecteur. Le principe très simple à la base de cette méthode, qui permet de traiter un grand nombre d'œufs rapidement avec un équipement et une préparation préalable minimal, l'a imposée comme choix privilégié pour un grand nombre de laboratoires.

On a d'abord appliqué cette méthode sans l'aide d'outils moléculaires, mais l'ADN qui était injecté dans l'embryon unicellulaire formait des concatémères extrachromosomaux et était transcrit de manière transitoire avant de s'intégrer au génome dans des stades plus tardifs de l'embryogenèse (172; 173). Il en résultait des animaux chez qui seules certaines cellules avaient intégré le transgène et qui ne le transmettaient qu'à une fraction de leur progéniture (152; 174). Des stratégies ont donc été testées pour améliorer la technique et garantir que l'ADN injecté s'intégrerait aux stades les plus précoces possible, idéalement au stade unicellulaire.

La première de ces stratégies a été de co-injecter le transgène avec l'endonucléase de guidage *I-SceI* codée par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (175). Cette enzyme reconnaît et clive un site de 18 paires de bases dont la fréquence se limite à une apparition par 70 millions de bases dans n'importe quelle séquence aléatoire (176). Elle pourrait améliorer l'efficacité d'intégration en clivant l'ADN injecté et empêchant sa concatémérisation par les ligases et réplicases de l'embryon (176). Lorsque la séquence de reconnaissance de l'enzyme est présente sur la construction génétique, son application

permet l'intégration uniforme du transgène dans environ 70% des œufs et donne une efficacité de transmission des fondateurs à la première génération-fille de 30% avec le poisson zébré (175; 177). La seconde technique, qui repose sur les propriétés des transposons, s'est cependant avérée encore plus efficace. Les transposons sont des fragments d'ADN capables de se déplacer d'un locus à un autre, au sein d'un même génome ou encore vers un génome différent. Un transposon est constitué de séquences inversées répétées (IR – *inverted repeats*) flanquant de part et d'autre une région codant une transposase, l'enzyme qui catalyse sa propre transposition (176). L'enzyme peut aussi agir en *trans* sur les IR du transposon et ainsi transposer de n'importe quelle séquence flanquée par les IR.

Le transposon *Tol2*, isolé à partir du génome du médaka (178), a été le premier transposon fonctionnel identifié chez les vertébrés et on a démontré qu'il pouvait s'exciser et s'insérer *de novo* dans le génome de son hôte (179). On a plus tard découvert que les événements de transposition générés par *Tol2* pouvaient aussi se produire dans d'autres espèces, dont le poisson zébré (180; 181). Peu après, la preuve de l'efficacité de cet élément pour la transgénèse chez le poisson zébré était complétée (182). Ce système procure une efficacité de transmission du transgène à la progéniture de 50% (183), ce qui permet de diminuer grandement le nombre de fondateurs à maintenir pour générer une lignée transgénique et faisant ainsi de la transgénèse du poisson zébré une opération réalisable dans des laboratoires disposant d'installations de taille limitée (**Figure 1.8**).

En plus de permettre une haute efficacité d'intégration des transgènes, le système *Tol2* permet de vérifier, quelques heures seulement après la microinjection, que les constructions d'ADN ont bien été excisées du vecteur et intégrées au génome de l'embryon. Pour ce faire, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR – *polymerase chain reaction*) est effectuée en utilisant des amorces complémentaires à des régions des fragments de *Tol2* situés de part et d'autre du transgène et qui demeurent sur le vecteur après l'excision par la transposase. Le bon fonctionnement du système peut ainsi être visualisé par la présence d'une bande à environ 250 pb sur gel d'agarose (184).

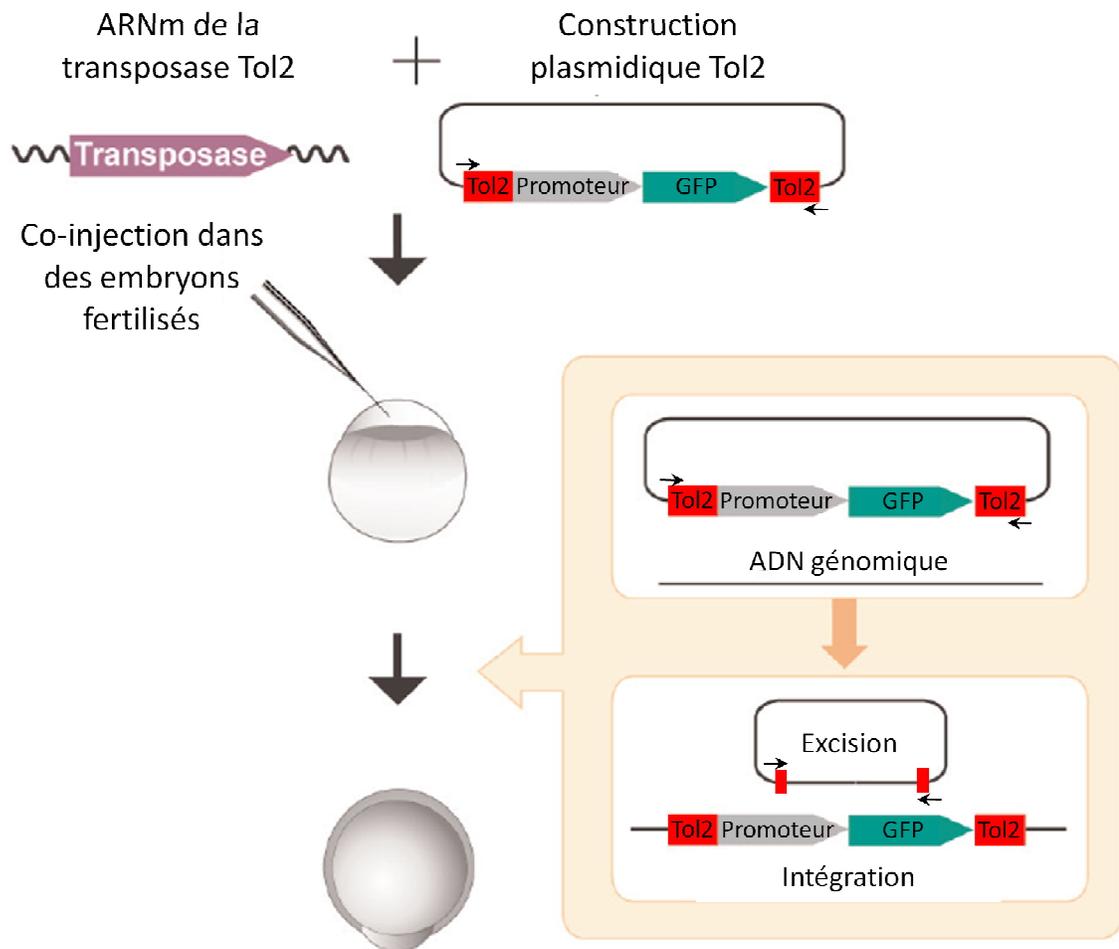


Figure 1.8. Transgénèse du poisson zébré avec le système *Tol2*.

L'ARNm de la transposase *Tol2* est produit *in vitro* puis co-injecté dans l'embryon unicellulaire avec une construction plasmidique portant les IR du transposon *Tol2* (rouge) et la GFP comme gène rapporteur (vert). Suite à l'injection, la construction *Tol2* est excisée du plasmide et intégrée au génome de l'embryon (185). Les positions des amorces utilisées pour vérifier l'intégration sont notées par des flèches (→ et ←) (Adapté de Kawakami, *Genome Biol.*, 2007).

1.4 Hypothèse et objectifs

L'infection chronique par le VHC mène à la stéatose et à la cirrhose du foie ainsi qu'au CHC. Les mécanismes qui sous-tendent ces manifestations sont mal définis, mais incluent probablement des facteurs d'ordre immunitaire et une action virale directe (186; 187). Parmi les facteurs viraux, la protéine Core a été associée à des fonctions pouvant générer plusieurs des signes cliniques inhérents à l'hépatite C (188). Entre autres, deux modèles de souris transgéniques exprimant Core présentent du dommage hépatique (104) ou des stéatoses sévères et des CHC (102; 103). Or, la vaste majorité des études ayant porté sur Core ont utilisé des gènes viraux de type sauvage, qui comportaient donc un cadre de lecture ouvert en (+1) (106). Il a été démontré que ce cadre de lecture ouvert peut produire une protéine, la protéine F, *in vitro* et durant l'infection chronique (108; 109; 114). La protéine F ne partage d'homologie avec aucune protéine virale ou cellulaire connue et son rôle exact demeure inconnu. Le rôle de la protéine Core dans les pathologies observées sur les modèles animaux qui ont précédemment été développés, et particulièrement dans les modèles de souris transgéniques, doit être réévalué dans le but de définir la contribution de la protéine F dans la pathogénèse du VHC.

Considérant que la protéine F pouvait être exprimée dans la plupart des systèmes expérimentaux visant à élucider les propriétés de Core, nous proposons donc que certaines des fonctions initialement attribuées à Core dans la pathogénèse de l'hépatite C résultent de l'action de la protéine F. Nous proposons les deux objectifs suivants :

Objectif 1 : Déterminer la toxicité directe de la protéine F sur le foie dans le contexte de l'infection chronique.

Objectif 2 : Distinguer les fonctions pathogènes assumées par la protéine F de celles de la protéine Core.

Afin de répondre à notre premier objectif et d'évaluer l'effet de la protéine F dans un contexte de chronicité, nous avons cherché à développer un modèle animal exprimant la

protéine sur une longue période de temps. En l'absence de bons modèles animaux pour étudier le VHC (72), nous avons choisi de produire des lignées de poissons zébrés transgéniques. Le système utilisé nous permettra d'exprimer le transgène de manière stable durant plusieurs mois chez l'animal et d'en réprimer l'expression au besoin. Pour répondre à notre second objectif et départager clairement des fonctions de la protéine F et Core, nous avons généré différentes séquences mutantes de Core de sorte à ce que nous puissions exprimer exclusivement l'une ou l'autre des deux protéines. Ces mutants ont aussi été conçus de manière à ce que l'apport des structures secondaires d'ARN qui se retrouvent dans cette région génomique soit également considéré. L'ensemble de ces lignées nous permettra dans un deuxième temps de déterminer le rôle respectif de Core, de la protéine F et des structures secondaires d'ARN dans la pathogénèse du VHC et pourront guider le développement de molécules thérapeutiques ciblant la protéine F et/ou l'élaboration d'un vaccin tirant avantage de la conservation de cette portion du VHC.

2. Matériel et méthodes

2.1 Optimisation des gènes

Deux versions du gène codant pour la protéine F ont été optimisées pour l'expression dans le poisson zébré (AF11opti et AUG26opti). L'optimisation a été effectuée avec l'algorithme OptimumGene de GenScript (Piscataway, NJ, É.-U.). L'algorithme OptimumGene prend en considération, entre autres, le biais d'usage des codons pour l'espèce dans laquelle l'expression est prévue, le contenu en GC et CpG de l'ADN codant, les sites d'épissage cryptiques, la structure secondaire de l'ARNm, les motifs d'instabilité de l'ARNm, et l'énergie libre de l'ARNm (189). Les séquences optimisées ont été synthétisées par GenScript et insérées dans pUC57 entre les sites *BmiI* et *AclI*.

2.2 Constructions génétiques

Deux versions de la séquence du cadre de lecture ouvert de la protéine F, AF11 et AUG26, avaient précédemment été assemblées au laboratoire [Myriam Troesch et Hugo Soudeyns, données non publiées; et (112)] (**Figure 2.1**). Le gène AF11 comporte une insertion double au codon 12 du gène *core* pour forcer le changement de cadre de lecture en (+1). Trois substitutions silencieuses ont également été introduites aux codons 8, 9 et 10 pour perturber la séquence promouvant le glissement ribosomal. Pour AUG26, le codon GUG en position 26 (+1) est remplacé par un codon AUG et placé dans un contexte de Kozak fort pour permettre une expression robuste du gène. Le signal de polyadénylation (pA) du virus simien 40 (SV40 – *Simian virus 40*) avait été placé en aval des deux gènes pour former AF11-pA et AUG26-pA. Des sites de restriction *EcoRI* et *SpeI* ont été rajoutés en 5' et 3' de AF11-pA et AUG26-pA en utilisant respectivement les amorces sens AF11pAEcoRIFw et AUG26pAEcoRIFw et l'amorce antisens commune ARFPpASpeIRv (**Tableau 1**). Ces séquences ont ensuite été clonées séparément sur le vecteur pBS-PCKII-eGFPpA pour créer pBS-AF11pA-PCKII-eGFPpA et pBS-AUG26pA-PCKII-eGFPpA.

Le vecteur pBS-PCKII-eGFPpA avait préalablement été généré à partir du plasmide pBSII-KS sur lequel le gène amélioré de la GFP (eGFP – *enhanced green fluorescent*

protein) a été cloné en utilisant les sites *XbaI* et *NotI*. La eGFP a été placée sous le contrôle du promoteur de la cytokératine II (PCKII), qui cible spécifiquement l'expression aux cellules épidermales du poisson zébré (190), afin d'obtenir un gène rapporteur dont l'expression sera indépendante du transgène à l'étude. Cette manipulation permet d'éliminer le biais qui pourrait être dû à la co-expression de la eGFP et de la protéine F dans les hépatocytes des poissons zébrés. PCKII a été amplifié avec les amorces CKII(-141) et CKIIR, décrites par Wang *et al.* (190), à partir d'ADN génomique de poisson zébré isolé de cellules ZF-L (ATCC # CRL-2643) et introduit en amont de la eGFP grâce aux sites *SpeI* en 5' et *XbaI* en 3'. Le pA du SV40 a aussi été ajouté en 3' de la eGFP grâce aux sites *NotI* et *SacII*.

Des vecteurs contrôles pBS-Core1apA-PCKII-eGFPpA, pBS-HBxpA-PCKII-eGFPpA et pBS-eGFPpA-PCKII-eGFPpA ont aussi été assemblés. D'abord, les amorces Core1aEcoRIFw et Core1aNotIRv ont permis d'amplifier le gène *Core* par PCR sur transcription inverse (RT-PCR – *reverse transcription* PCR) à partir d'ARN viral isolé du sérum d'un patient infecté par le VHC de génotype 1a. L'ARN viral a été purifié du sérum avec la trousse QIAmp Viral RNA de QIAGEN (Mississauga, ON). Ce gène a été co-ligué avec le pA du SV40 directement dans pBS-PCKII-eGFPpA en prenant avantage du site *EcoRI* en 5' de *Core* et du site *SpeI* en 3' du pA. Le gène codant pour la protéine HBx du VHB a été amplifié par PCR à partir d'ADN viral isolé du sérum d'un patient co-infecté par le VIH-1 et le VHB avec les amorces HBxX13Fw et HBxBRv qui ont été décrites par Hsia *et al.* (191). Les sites *EcoRI* et *NotI* ont été ajoutées aux extrémités 5' et 3' du gène, respectivement, pour permettre le clonage de HBx avec pA dans pBS-PCKII-eGFPpA de la même manière que *Core*. Enfin, eGFP a été co-ligué avec pA et inséré sur pBS-PCKII-eGFPpA en amont de PCKII de la même manière que *Core*.

Trois mutants de *Core* ont été générés dans le but d'obtenir des séquences qui permettraient l'expression de *Core* sans protéine F. Les mutations non-sens ont été ciblées aux codons 30 (CoremutI), 31 (CoremutII) et 44 (CoremutIII) et correspondent respectivement aux substitutions C90A, T93A et G132A. Les mutants ont été produits par

mutagénèse dirigée avec les amorces CoremutIFw et CoremutIRv pour CoremutI, CoremutIIFw et CoremutIIRv pour CoremutII, et CoremutIIIFw et CoremutIIIRv pour CoremutIII. Les trois mutants ont été co-ligués avec pA et clonés sur pBS-PCKII-eGFPpA en amont de PCKII de la même manière que Core.

Chacune des constructions complétées a ensuite été transférée sur le vecteur pT2-LF2.8-tTA2, généreusement fourni par Jen-Leih Wu (Academia Sinica, Taipei, Taiwan). Le vecteur pT2-LF2.8-tTA2 contient les IR du transposon *Tol2* pour permettre une haute efficacité d'intégration, ainsi que le promoteur de la L-FABP (LF2.8) qui permet de cibler l'expression du transgène au foie du poisson zébré (157; 158) (**Figure 2.2**). L'élément tTA2 a été excisé de pT2-LF2.8-tTA2 avec les enzymes *EcoRI* et *ClaI* et remplacé par AF11pA-PCKII-eGFPpA, AUG26pA-PCKII-eGFPpA, Core1apA-PCKII-eGFPpA, HBxpA-PCKII-eGFPpA, eGFPpA-PCKII-eGFPpA, CoremutIpA-PCKII-eGFPpA, CoremutIIPa-PCKII-eGFPpA ou CoremutIIIPa-PCKII-eGFPpA, qui avaient été préparés avec *EcoRI* et *AclI*.

AF11pA, AUG26pA, CoremutIpA, AF11opti et AUG26opti ont également été introduits sur les vecteurs pT2-TRE-AcGFP et pT2-TRE-HcRed, fournis par Jen-Leih Wu (**Figure 2.2**). Ces deux vecteurs portent l'élément de réponse à la tétracycline (TRE – *tetracycline response element*) et constituent la deuxième partie du système d'expression répressible bipartite Tet-Off (192; 193). AF11pA, AUG26pA, CoremutIpA, AF11opti et AUG26opti ont été préparés avec *BmtI* et *AclI* à partir de pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-AUG26pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-CoremutIpA-PCKII-eGFPpA, pUC57-AF11opti et pUC57-AUG26opti, respectivement, et clonés individuellement dans les sites *BmtI* et *ClaI* disponibles sur pT2-TRE-AcGFP et pT2-TRE-HcRed. Cette manipulation a permis d'introduire les cinq gènes dans un système d'expression Tet-Off en utilisant soit la eGFP, soit la protéine fluorescente rouge (RFP – *red fluorescent protein*) HcRed comme gènes rapporteurs. L'expression de ces gènes est donc répressible par l'ajout de doxycycline au milieu de croissance des poissons zébrés transgéniques.

Toutes les séquences amplifiées par PCR ou par RT-PCR ont d'abord été clonées dans le vecteur pCRII-TOPO d'Invitrogen (Carlsbad, CA, É.-U.) et séquencées (Plateforme de séquençage, Centre de recherche du CHUL, Québec, QC) avant d'être assemblées. Les constructions finales ont également été vérifiées par séquençage.

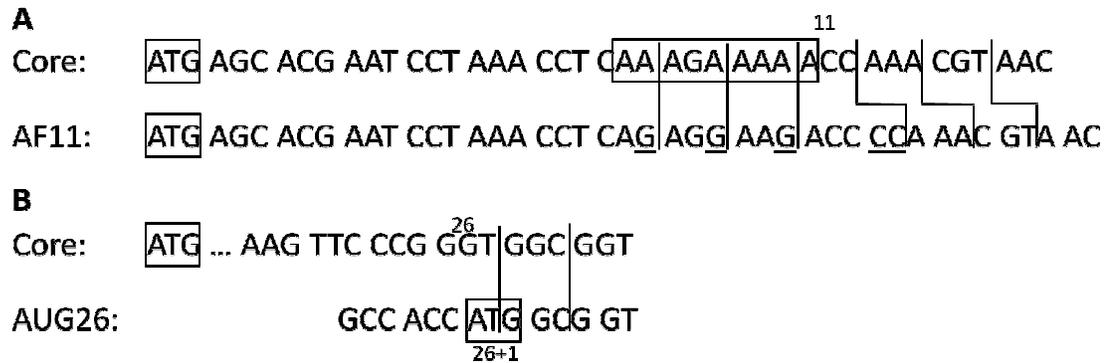


Figure 2.1 Stratégie de construction des gènes AF11 et AUG26.

A. Deux désoxycytidines ont été insérées au codon 11 du gène *core* pour permettre l'expression de la protéine F selon l'hypothèse du glissement ribosomal (-2/+1) aux codons 8-11 (108; 109). **B.** L'hypothèse de l'initiation de la traduction au codon interne 26(+1) (115) est simulée par la génération d'une séquence dans laquelle les codons 26(+1) GCG ou GTG trouvés dans le génome viral de type sauvage sont remplacés par un codon ATG placé dans un contexte de Kozak fort. La position des codons est donnée au-dessus des séquences.

Tableau 1. Amorces utilisées pour les constructions génétiques.

Les sites de restriction sont notés en caractères gras. Les amorces notées (^a) sont tirées de Wang *et al.*, *Differentiation*, 2006 et les amorces notées (^b) sont tirées de Hsia *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997.

Amorces	Séquences nucléotidiques (5'-3')
AF11pAEcoRIFw	CCGAATTC GCCACCATGAGCACGAATCCT
AUG26pAEcoRIFw	G CGAATTC GCCACCATGGCGGTCAGATCGTTG
ARFPpASpeIRv	GA ACTAGTGGATCGATCCAG
CKII(-141)F ^a	GGCGTGTGTATCACTTGGACAGG
CKIIR ^a	CTGTCGTCTACGAGGGGGTGAGG
CkII(-141)SpeIFw	AGA ACTAGT TTTCGAACAGTGTATTGTAGTTCCTC
CkIIRXbaIRv	AGAT CTAGAG GAGATCTGGAGCAGGAGAGC
Core1aEcoRIFw	CCC GAATTC ATGAGCACGAATCCTAAA
Core1aNotIRv	AAT GCGGCCG CGGCTGAAGCGGGCAC
CoremutIFw	GCGGTCAGATAGTTGGTGGAG
CoremutIRv	CTCCACCAACTATCTGACCGC
CoremutIIFw	GTCAGATCGTAGGTGGAGTTT
CoremutIIRv	AAACTCCACCTACGATCTGAC
CoremutIIIFw	GCCTAGATTAGGTGTGCGCGCG
CoremutIIIRv	CGCGCACACCTAATCTAGGGC
HBxX13Fw ^b	ATGGCTGCTCGGGTGTGC
HBxBRv ^b	AAGGAAAGAAGTCAGAAGG
HBxEcoRIFw	TT GAATTC ATGGCTGCTCGGGTGTGC
HBxNotIRv	TT GCGGCCG CAGATGATTAGGCAGAGGTG
GFPXbaIFw	AGAT CTAGAG CCACCCACAACCATGGTGGAGCAAG
GFPNotIRvI	AGT GCGGCCG CCTTGTACAGCTCGTCCATGG
SV40pAshortNotIFw	AAC GCGGCCG CAAACAACTACTAC
SV40pASaIIIRv	TGT CCGCGG ATTACCCTGTTATCCCTAGGATCGATCCAG
SV40pASpeIRv	ACTAGT GGATCGATCCAGACA

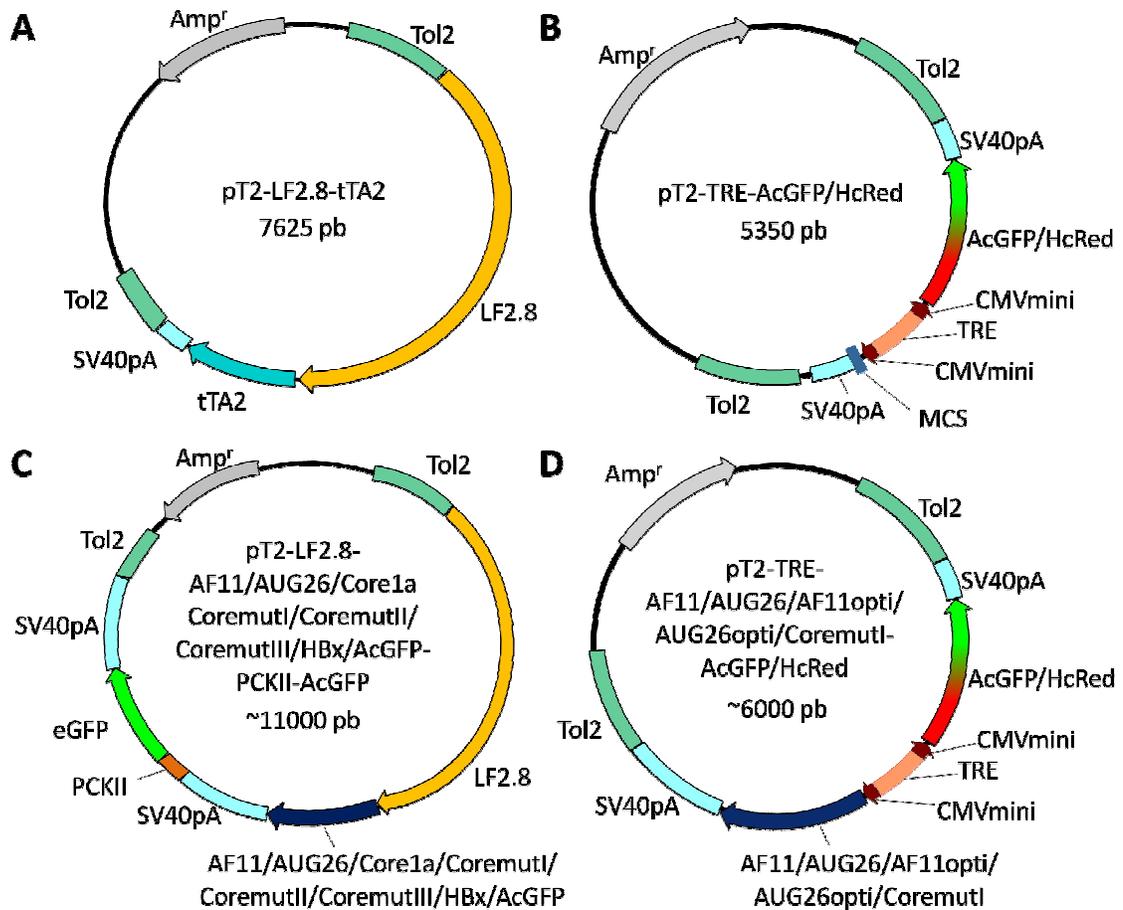


Figure 2.2 Cartes des constructions plasmidiques.

A. et **B.** Co-injectés dans l'embryon unicellulaire du poisson zébré, pT2-LF2.8-tTA2 et pT2-TRE-AcGFP/HcRed forment ensemble le système d'expression répressible *Tol2*-LF2.8-Tet-Off spécifique au foie. **A.** Le promoteur LF2.8 dirige l'expression du transactivateur tTA2 spécifiquement au foie. Lorsqu'exprimé, tTA2 peut se lier à l'élément TRE et transactiver le promoteur hybride composé de TRE et d'une version réduite du promoteur précoce du cytomégalo virus (CMVmini) qui se trouve sur pT2-TRE-AcGFP ou pT2-TRE-HcRed. **B.** Le promoteur hybride TRE-CMVmini stimule de manière bidirectionnelle un fort niveau de transcription de l'AcGFP ou de la HcRed et du transgène d'intérêt inséré dans le site de clonage (MCS – *multiple cloning site*) du vecteur. Lorsque

présente dans l'environnement des poissons transgéniques, la doxycycline, un dérivé de la tétracycline, se lie à TRE et empêche sa transactivation par tTA2, bloquant ainsi l'expression du transgène. **C.** Le vecteur pT2-LF2.8-AF11/AUG26/Core1a/CoremutI/CoremutII/CoremutIII/HBx/eGFP-PCKII-eGFP est destiné à être utilisé seul lors de la microinjection. Le transgène d'intérêt est placé directement sous l'influence du promoteur LF2.8 tandis que le gène rapporteur eGFP est introduit en aval du promoteur PCKII pour être exprimé spécifiquement dans les cellules épithéliales. **D.** Le transgène d'intérêt est introduit dans le MCS de pT2-TRE-AcGFP/HcRed pour être utilisé dans le système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off.

2.3 Structures secondaires d'ARN

Les structures secondaires de la région de Core ont été prédites en utilisant le programme mfold version 2.3 (194). Les paramètres d'analyses ont été harmonisés aux contraintes proposées par Smith *et al.* (17; 107) et la simulation a été ajustée à 28°C pour correspondre aux conditions expérimentales, soit la température corporelle du poisson zébré.

2.4 Culture cellulaire et transfections

Les cellules de la lignée ZF-L (ATCC # CRL-2643) ont été maintenues dans un milieu composé à 50% de milieu Leibovitz's L-15 (Invitrogen), à 35% de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium à haute concentration de glucose (Invitrogen) et à 15% de milieu Ham's F-12, enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), 0,15 g/L de bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich; Oakville, ON), 15 mM d'HEPES (Sigma-Aldrich), 0,01 mg/ml d'insuline bovine (Sigma-Aldrich), 50 ng/ml de facteur de croissance épidermal murin (ProSpec; Rehovot, Israël), 100 U/ml de pénicilline (Invitrogen) et 100 mg/ml de streptomycine (Invitrogen). Les cellules ont été maintenues à 28°C dans un système d'atmosphère libre. Elles ont été transférées sur des lames à 4 chambres (Lab-Tek; Hatfield, PA, É.-U.) 24 h avant transfection en vue de les visualiser par immunofluorescence. Le milieu de culture a été renouvelé 4 h avant transfection. L'ADN transfecté a été purifié avec la trousse QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) et sa pureté et sa concentration ont été vérifiées au spectrophotomètre. L'ADN purifié a été dilué dans du milieu de culture sans sérum avec du polyéthylèneimine linéaire de 25 kDa (Polysciences; Warrington, PA, É.-U.) dans un ratio 1 : 2, puis ajouté au surnageant des cellules en culture et incubé 24 h.

2.5 Immunofluorescence et microscopie confocale

Les cellules transfectées avec de l'ADN portant une séquence codant la protéine F ont été traitées avec 5 µM de l'inhibiteur de protéasome MG132 (Sigma) 2 h avant fixation.

Le marqueur mitochondrial MitoTracker Deep Red (Invitrogen) a été ajouté au surnageant 30 min avant fixation à une concentration de 200 nM. Environ 24 h après la transfection, les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde 4% durant 15 minutes à la température de la pièce. Un traitement de 5 min avec du Triton-X100 à 0,2% à la température de la pièce a suivi la fixation pour perméabiliser les cellules. Un anticorps monoclonal primaire contre la protéine F, généreusement fourni par Glauca Paranhos-Baccala (BioMérieux, Lyon, France), ou un anticorps monoclonal primaire anti-Core (Anogen, Mississauga, ON) ont été incubés avec les cellules transfectées à 4°C toute la nuit à des concentrations respectives de 6,4 µg/ml et 10 µg/ml. Ces anticorps primaires ont été générés chez la souris. Un anticorps anti-souris généré chez la chèvre et couplé au fluorochrome Hilyte Fluor 488 (AnaSpec, Fremont, CA, É.-U.) a été utilisé à une concentration de 10 µg/ml et incubé 1 h à la température de la pièce avec les cellules pour révéler la protéine F. La fluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope confocal LSM 510 META de Carl Zeiss (Jena, Allemagne).

2.6 Maintien des poissons zébrés

Les poissons zébrés ont été gardés à 28°C dans une salle dédiée à cet effet suivant un cycle de 14 h de lumière et 10 h de noirceur. Ils étaient nourris une ou deux fois par jour avec un régime à base d'artémies. La nuit précédant la microinjection, des groupes de 3 mâles et 3 femelles de type sauvage étaient sélectionnés et gardés séparés dans des réservoirs de reproduction jusqu'au matin suivant. À l'ouverture des lumières au matin suivant, les individus des deux sexes étaient réunis et laissés en contact pour quelques dizaines de minutes ou jusqu'à ce que des embryons aient été produits. Les œufs étaient alors récoltés pour la microinjection et les parents étaient à nouveau séparés par sexe et retournés parmi les leurs jusqu'à ce qu'ils soient prêts à se reproduire à nouveau, environ une semaine plus tard. Les œufs de type sauvage microinjectés pour la transgénèse ont été conservés dans de l'eau oxygénée dans un incubateur à 28°C jusqu'à 5 à 7 jours d'âge. À ce moment, les embryons étaient transférés dans des réservoirs appropriés et nourris une

fois par jour avec des paramécies. À 10 jours, les embryons commençaient à être nourris avec un régime combiné de paramécies et de larves d'artémies. À environ 14 jours, les poissons débutaient leur régime composé exclusivement d'artémies.

2.7 Transgénèse

L'ARNm de la transposase *Tol2* a été synthétisé à partir du vecteur pCS-TP (183), fourni par Koichi Kawakami (National Institute of Genetics, Mishida, Japon), avec la trousse mMESSAGING mMACHINE (Ambion; Austin, TX, É.-U.), traité à la DNase, puis purifié avec la trousse MEGA Clear (Ambion). Les constructions plasmidiques ont été purifiées avec la trousse MiniPlus Plasmid DNA Extraction Miniprep System (Viogene; Taipei, Taiwan). La pureté et la concentration de l'ADN et de l'ARNm ont été mesurées au spectrophotomètre. Pour pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-AUG26pA-PCKII-eGFPpA et pT2-LF2.8-CoremutIpA-PCKII-eGFPpA, la solution d'injection contenait 25 ng/μl ou 50 ng/μl d'ADN, 25 ng/μl ou 50 ng/μl d'ARNm de la transposase, 0,2% de KCl et 0,125% de rouge phénol. Les vecteurs pT2-TRE-AF11pA-AcGFP, pT2-TRE-AUG26pA-AcGFP et pT2-TRE-CoremutIpA-AcGFP, quant à eux, ont chacun été co-injectés avec pT2-LF2.8-tTA2. Dans ce cas, la solution d'injection contenait 25 ng/μl de chaque plasmide et 50 ng/μl d'ARNm, 0,2% de KCl et 0,125% de rouge phénol. Les aiguilles pour l'injection ont été préparées à partir de capillaires de borosilicate de 0,5 mm avec un Flaming/Brown Micropipette Puller modèle P-97 (Sutter Instrument, Novato, CA, É.-U.) dans les conditions suivantes : pression d'air = 500, chaleur = 290, traction = 215, vitesse = 150, temps de chauffage = 100. Environ 1 nl de solution d'injection était injecté dans les embryons au stade unicellulaire. Environ 10 h après injection, 10 embryons par construction injectée étaient prélevés et lysés à 56°C pour 2 h dans une solution à 200 μg/ml de protéinase K pour vérifier l'intégration des transgènes par PCR de la manière qui a précédemment été décrite pour des constructions *Tol2* (184). La réaction de PCR comprenait les amorces BS1 (5'-AACAAAAGCTGGAGCTCCACCG-3') et TYR1 (5'-AAGGCTCTTGGATACGAG-TACGCC-3') (184) et 1 ml de la solution de lyse comme

matrice dans un volume total de réaction de 25 ml. Les groupes qui présentaient un taux d'intégration inférieur à 70% étaient rejetés. Toutes les étapes directement reliées à la transgénèse ont été effectuée au laboratoire du Dr Jen-Leih Wu.

2.8 Sélection des poissons fondateurs

Cinq à sept jours après injection, les embryons étaient anesthésiés avec 0,5 µl/ml de 2-phénoxyéthanol puis examinés sous stéréoscope à fluorescence. Les embryons exprimant la fluorescence spécifiquement au foie étaient sélectionnés et élevés comme poissons fondateurs de leurs lignées respectives. Les poissons ne montrant pas de fluorescence ou de la fluorescence dans des tissus ectopiques étaient rejetés.

3. Résultats

3.1 Constructions génétiques

L'essentiel des études menées sur la protéine F à ce jour ont porté sur la dissection du mécanisme par lequel la protéine était produite. Les études précédentes visant à déterminer le véritable rôle de cette protéine lors de l'infection naturelle ont utilisé des systèmes artificiels et les résultats obtenus variaient selon la version et le génotype de la protéine utilisée. Nous avons donc cherché à développer un système qui se rapprocherait du caractère chronique de la maladie et qui s'inscrirait dans un contexte systémique plutôt que cellulaire. À cette fin, nous avons choisi le poisson zébré, un modèle déjà établi en cancer et en développement du foie, chez qui l'expression transgénique stable de la protéine F nous aidera à cerner si cette dernière joue un rôle direct dans le développement de la pathologie associée au VHC. Nous avons généré un total de 18 vecteurs exprimant soit la protéine F, Core, des mutants de Core, HBx, GFP, ou des versions optimisées de la séquence codant la protéine F (**Tableau 2**). Ces différents gènes ont été introduits dans deux systèmes, le premier utilisant le promoteur PCKII pour diriger spécifiquement l'expression du gène rapporteur dans un tissu distinct de celui du transgène d'intérêt pour éviter toute forme d'interaction entre le gène d'intérêt et le gène rapporteur, et un deuxième utilisant les éléments Tet-Off pour ajouter la possibilité de réprimer l'expression du transgène dans le cas où celui-ci serait toxique ou modifierait le développement normal des animaux transgéniques. Les deux systèmes incluent le promoteur LF2.8 et les éléments *Tol2* pour permettre une intégration efficace des transgènes dans le génome du poisson zébré et générer des lignées transgéniques stables avec expression du transgène confinée au foie.

Tableau 2. Liste des constructions génétiques et rôle des lignées transgéniques correspondantes.

Construction	Transgène exprimé	Rôle visé
pT2-LF2.8-AF11-PCKII-eGFP	Protéine F	Évaluation de l'effet direct de la protéine F telle que produite par glissement ribosomal aux codons 8-11
pT2-LF2.8-AUG26-PCKII-eGFP	Protéine F	Évaluation de l'effet direct de la protéine F telle que produite par initiation de la traduction au codon 26(+1)
pT2-LF2.8-Core1a-PCKII-eGFP	Core et protéine F	Contrôle positif de pathogénèse
pT2-LF2.8-CoremutI-PCKII-eGFP	Core	Distinction entre les effets de la protéine F, de Core et des structures secondaires d'ARN sur la pathogénèse
pT2-LF2.8-CoremutII-PCKII-eGFP	Core	Distinction entre les effets de la protéine F, de Core et des structures secondaires d'ARN sur la pathogénèse
pT2-LF2.8-CoremutIII-PCKII-eGFP	Core	Distinction entre les effets de la protéine F, de Core et des structures secondaires d'ARN sur la pathogénèse
pT2-LF2.8-HBx-PCKII-eGFP	HBx	Contrôle positif de pathogénèse
pT2-LF2.8-eGFP-PCKII-eGFP	eGFP	Contrôle négatif de pathogénèse
pT2-TRE-AF11-AcGFP	Protéine F	Évaluation de l'effet direct de la protéine F telle que produite par glissement ribosomal aux codons 8-11
pT2-TRE-AUG26-AcGFP	Protéine F	Évaluation de l'effet direct de la protéine F telle que produite par initiation de la traduction au codon 26(+1)
pT2-TRE-CoremutI-AcGFP	Core	Distinction entre les effets de la protéine F, de Core et des structures secondaires d'ARN sur la pathogénèse
pT2-TRE-AF11opti-AcGFP	Protéine F	Association entre le niveau d'expression de la protéine F et la pathogénèse
pT2-TRE-AUG26opti-AcGFP	Protéine F	Association entre le niveau d'expression de la protéine F et la pathogénèse
pT2-TRE-AF11-HcRed	Protéine F	Évaluation de l'effet direct de la protéine F telle que produite par glissement ribosomal aux codons 8-11
pT2-TRE-AUG26-HcRed	Protéine F	Évaluation de l'effet direct de la protéine F telle que produite par initiation de la traduction au codon 26(+1)
pT2-TRE-CoremutI-HcRed	Core	Distinction entre les effets de la protéine F, de Core et des structures secondaires d'ARN sur la pathogénèse
pT2-TRE-AF11opti-HcRed	Protéine F	Association entre le niveau d'expression de la protéine F et la pathogénèse
pT2-TRE-AUG26opti-HcRed	Protéine F	Association entre le niveau d'expression de la protéine F et la pathogénèse

3.2 Optimisation des gènes

La pathogénèse de l'hépatite C est un processus lent et les manifestations cliniques durant l'infection naturelle n'apparaissent souvent qu'après 15 ou 20 ans d'infection chronique. Dans le but d'accélérer le processus de pathogénèse dans nos lignées transgéniques, en admettant que la protéine F y contribue directement, nous avons entrepris de produire des constructions portant des versions optimisées des gènes AF11 et AUG26 afin d'augmenter le niveau d'expression de la protéine. Les gènes optimisés AF11opti et AUG26opti présentent tous deux un profil d'utilisation des codons chez le poisson zébré amélioré par rapport à leur contrepartie de type sauvage (**Figure 3.1**). L'index d'adaptation des codons (CAI – *codon adaptation index*), qui est une mesure du biais d'utilisation de codons synonymes dans une séquence codante par rapport à la fréquence relative d'utilisation de ces codons au sein d'une espèce donnée (195), passe ainsi de 0,67 pour AF11 à 0,90 pour AF11opti et de 0,65 pour AUG26 à 0,90 pour AUG26opti.

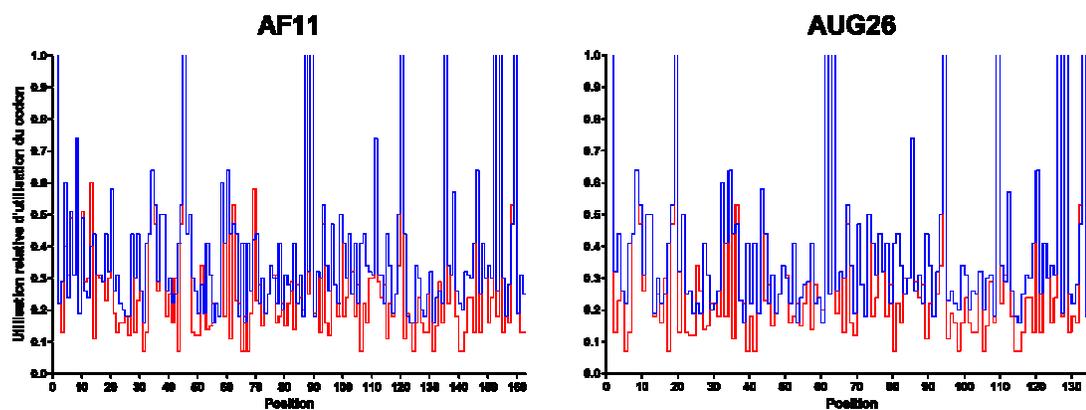


Figure 3.1 Profil d'utilisation des codons chez le poisson zébré.

La fréquence relative d'utilisation d'un codon pour un résidu donné est montrée avant (trait rouge) et après (trait bleu) optimisation des gènes AF11 et AUG26.

3.3 Structures secondaires d'ARN

L'importance des structures secondaires d'ARN présentes dans la région génomique de Core a récemment été soulevée et, en dépit du fait que leur existence *in vivo* n'ait pas été directement confirmée, il semble qu'elles aient une importance fonctionnelle pour l'infectiosité du virus (134; 145). Afin de départager le rôle de Core, de la protéine F et des structures secondaires d'ARN, nous avons généré trois mutants pour lesquels une substitution ponctuelle introduit un codon non-sens dans le cadre (+1) sans affecter le cadre (0) (**Figure 3.2A**). Les mutants générés doivent stopper la traduction de la protéine F de manière précoce et ont aussi été choisis pour la conservation des structures secondaires d'ARN qui devaient se rapprocher le plus possible de celles du gène sauvage. Les prédictions de repliement chez les mutants CoremutI, CoremutII et CoremutIII ont révélé que, en théorie, les structures secondaires d'ARN n'étaient pas, ou très peu, affectées par les substitutions (**Figure 3.2B**). Pour le mutant CoremutI, on ne prédit aucune altération à ce niveau par rapport au gène sauvage. Toutes les simulations ont également été ajustées à 37°C pour correspondre aux conditions utilisées par les études antérieures. Les résultats n'ont montré aucune différence entre les structures calculées à 28°C et à 37°C.

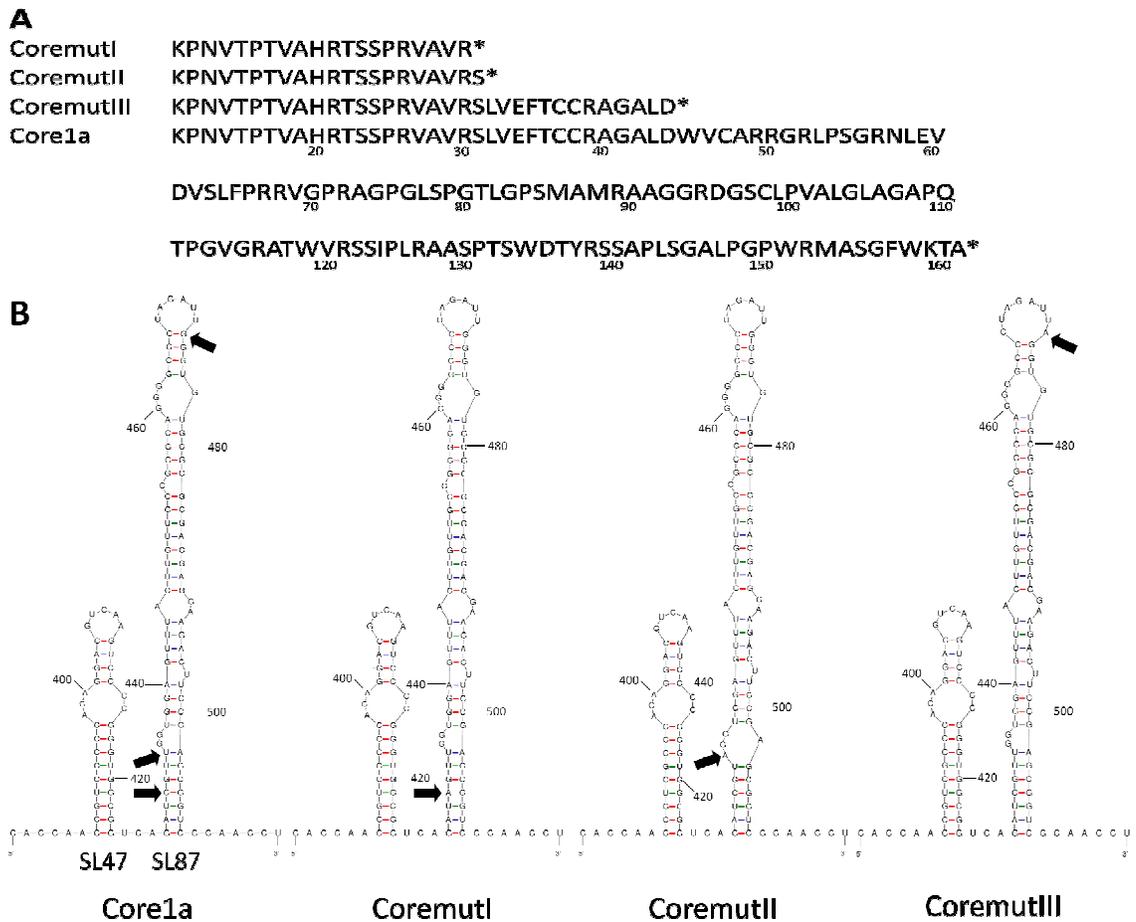


Figure 3.2 Structures d'ARN et séquence peptidique des mutants de Core.

Les trois substitutions sont silencieuses dans le cadre de lecture de Core, mais introduisent des codons stop dans le cadre (+1). **A.** Alignement des séquences peptidiques des mutants et de Core1a dans le cadre de lecture (+1) à partir du codon 11 de Core. Les positions sont notées au-dessus de la séquence par rapport au premier codon de Core dans le cadre (0) **B.** Les structures d'ARN ont été prédites *in silico*. Seule la boucle SL87 de la région Core a été visée par la stratégie de mutagenèse. Les flèches pleines indiquent la position des sites mutés. La position des bases est notée au-dessus de la séquence d'ARN par rapport au premier nucléotide du génome du VHC selon la numérotation du génome prototype H77 (GenBank, numéro d'accès AF009606).

3.4 Expression *in vitro* et localisation cellulaire de la protéine F

Afin de vérifier le bon fonctionnement de nos constructions, les vecteurs pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-AUG26pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-Core1apA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-CoremutIpA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-CoremutIIpA-PCKII-eGFPpA et pT2-LF2.8-CoremutIIIpA-PCKII-eGFPpA ont été transfectés dans la lignée d'hépatocytes de poisson zébré ZF-L. On a d'abord cherché à détecter la protéine F telle que produite par pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-AUG26pA-PCKII-eGFPpA et pT2-LF2.8-Core1apA-PCKII-eGFPpA par immunofluorescence indirecte (**Figure 3.3**). La protéine a pu être détectée dans les trois cas, y compris pour le gène Core1a qui exprimait aussi Core. Le signal pour la protéine F était cependant plus faible avec Core1a qu'avec les gènes AF11 et AUG26. Dans les trois cas, on observe une localisation semblable de la protéine, soit une localisation cytoplasmique et nucléaire.

La protéine F ne semble pas associée à un compartiment cytoplasmique particulier, mais des structures exemptes de protéine F ont pu être identifiées pour toutes les constructions. Ces structures se présentent en tailles et en nombres variables et se retrouvent dans la région périnucléaire. Leur identification n'a cependant pas pu être complétée. Par ailleurs, des études précédentes avaient avancé une association possible de la protéine F avec les mitochondries (122; 129). Nous avons donc vérifié s'il y avait co-localisation de la protéine F et des mitochondries dans les cellules ZF-L à l'aide d'un marquage mitochondrial spécifique (**Figure 3.4**). Le marquage mitochondrial a démontré que la protéine n'était associée aux mitochondries pour aucun de nos trois gènes. Il est intéressant de noter que les structures exemptes de la protéine F semblent également exemptes de mitochondries.

Nous avons enfin analysé si l'expression de la protéine F était toujours possible à partir des gènes mutants de Core1a, soit CoremutI, CoremutII et CoremutIII. Ces mutants portent un codon stop dans le cadre de lecture (+1) et doivent donc empêcher l'expression

de la protéine F. Étonnamment, la protéine F a été détectée pour les trois mutants malgré la présence des codons non-sens placés à une différente position pour chaque construction (**Figure 3.5**). Encore une fois, la protéine F présente une localisation cytoplasmique et nucléaire, et les structures exemptes de la protéine sont toujours présentes. Pour toutes les constructions, des contrôles négatifs constitués de cellules non transfectées, de cellules transfectées marquées avec l'anticorps primaire, mais sans anticorps secondaire, ou l'inverse, étaient inclus et ne présentaient aucune fluorescence.

Les résultats obtenus en immunofluorescence ont permis de démontrer que les vecteurs générés en vue de la transgénèse produisaient bien la protéine F. Les mutants CoremutI, CoremutII et CoremutIII ont donné des résultats inattendus puisqu'ils expriment la protéine F malgré les substitutions non-sens qui ont été introduites dans le cadre de lecture (+1), mais CoremutI a tout de même été sélectionné parmi les constructions devant servir à la transgénèse dans le but d'en approfondir la caractérisation et, éventuellement, d'apporter de nouvelles informations quant au mécanisme qui permet l'expression de la protéine F à partir d'un tel mutant. En plus de CoremutI, AF11 et AUG26 ont aussi été sélectionnés pour produire les premières lignées de poissons transgéniques.

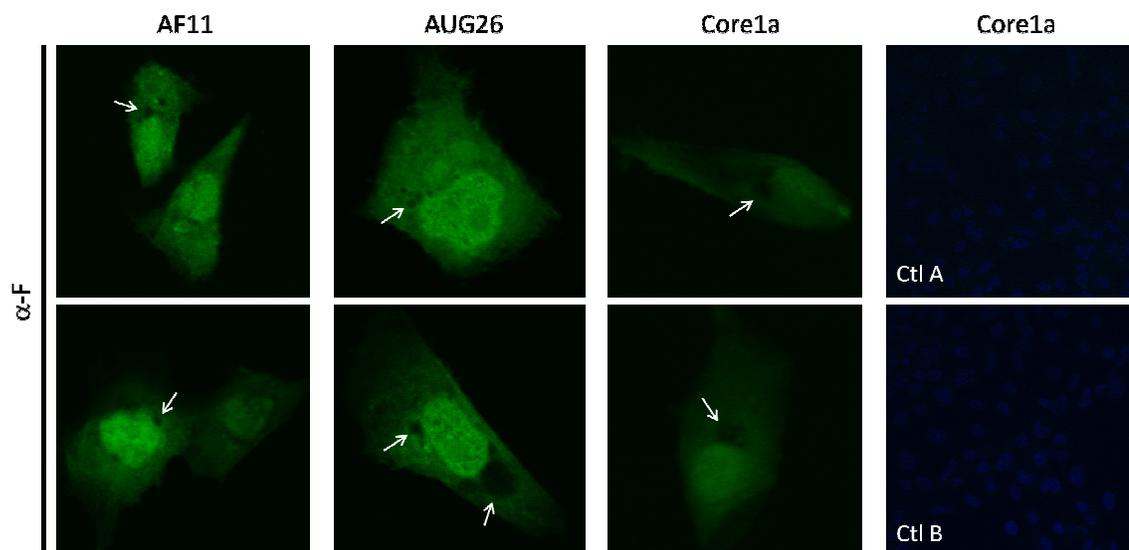


Figure 3.3. Localisation de la protéine F produite par les gènes AF11, AUG26 et Core1a dans les cellules ZF-L.

La lignée ZF-L a été transfectée avec pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA (AF11), pT2-LF2.8-AUG26pA-PCKII-eGFPpA (AUG26) et pT2-LF2.8-Core1apA-PCKII-eGFPpA (Core1a) et la protéine F a été détectée avec un anticorps monoclonal primaire anti-F et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome HiLyte Fluor 488. Les flèches blanches indiquent des structures exemptes de la protéine F. **Ctl A.** Cellules transfectées avec pT2-LF2.8-Core1apA-PCKII-eGFPpA et marquées avec l'anticorps primaire anti-F, mais sans l'anticorps secondaire. **Ctl B.** Cellules transfectées avec pT2-LF2.8-Core1apA-PCKII-eGFPpA et marquées avec l'anticorps secondaire, mais sans l'anticorps primaire anti-F. Les noyaux des lames contrôles ont été colorés au DAPI.

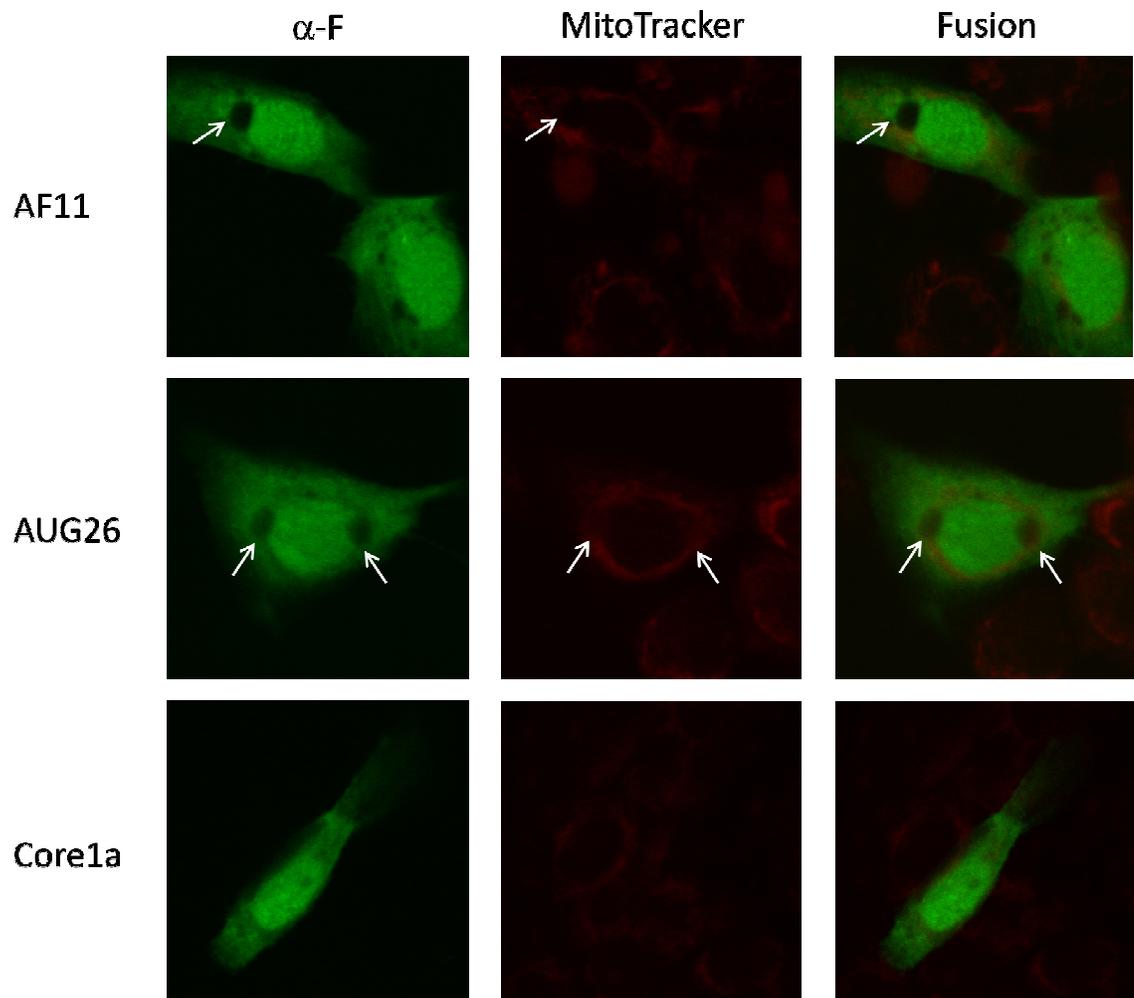


Figure 3.4. Association entre la protéine F et les mitochondries dans les cellules ZF-L.

La lignée ZF-L a été transfectée avec pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA (AF11), pT2-LF2.8-AUG26pA-PCKII-eGFPpA (AUG26) et pT2-LF2.8-Core1apA-PCKII-eGFPpA (Core1a). La protéine F a été détectée avec un anticorps monoclonal primaire anti-F et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome HiLyte Fluor 488, et les mitochondries avec le marqueur MitoTracker Deep Red. Les flèches blanches montrent des structures exemptes de la protéine F.

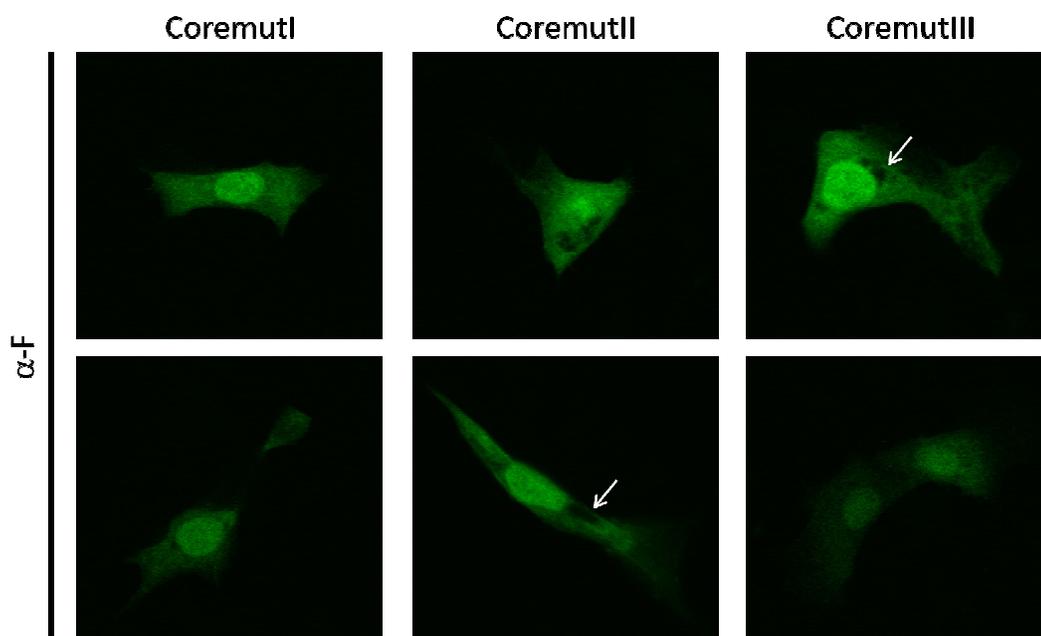


Figure 3.5. Expression de la protéine F à partir des mutants CoremutI, CoremutII et CoremutIII.

La lignée ZF-L a été transfectée avec pT2-LF2.8-CoremutI_{pA}-PCKII-eGFPpA (CoremutI), pT2-LF2.8-CoremutII_{pA}-PCKII-eGFPpA (CoremutII) et pT2-LF2.8-CoremutIII_{pA}-PCKII-eGFPpA (CoremutIII) et la protéine F a été détectée avec un anticorps monoclonal primaire anti-F et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome HiLyte Fluor 488. Les flèches blanches indiquent des structures exemptes de la protéine F.

3.5 Microinjection

Les constructions pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA et pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA ont respectivement été co-injectées avec l'ARNm de la transposase *Tol2* dans des embryons unicellulaires de poissons zébrés pour produire les poissons transgéniques fondateurs. Les constructions portant les IR de *Tol2* et co-injectés avec l'ARNm de la transposase permettent généralement d'obtenir un taux d'intégration supérieur ou égal à 70% (Jen-Leih Wu, communication personnelle). Malgré de nombreux essais avec différentes concentrations d'ADN plasmique, d'ARNm et de KCl, l'injection des plasmides pT2-LF2.8-AF11pA-PCKII-eGFPpA, pT2-LF2.8-AUG26pA-PCKII-eGFPpA et pT2-LF2.8-CoremutIpA-PCKII-eGFPpA n'a permis au mieux que 30% d'intégration. Un taux d'efficacité aussi bas pourrait être dû à la taille importante de nos constructions. Nous avons donc opté pour le système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off qui a été développé au laboratoire de Jen-Leih Wu. Ce système, qui utilise deux plasmides complémentaires, permet l'expression d'un transgène d'intérêt spécifiquement au foie avec la GFP ou la RFP comme gène rapporteur et qui peut être réprimé par l'ajout de doxycycline. Ce système a aussi l'avantage de faire passer nos constructions de près de 8 kb à environ 3,4 kb. Les vecteurs pT2-TRE-AF11pA-AcGFP, pT2-TRE-AUG26pA-AcGFP et pT2-TRE-CoremutIpA-AcGFP ont donc été générés pour augmenter l'efficacité d'intégration des transgènes. En co-injectant individuellement ces plasmides avec pT2-LF2.8-tTA2 et l'ARNm de la transposase, nous avons pu obtenir une efficacité d'intégration supérieure à 70% pour les trois constructions lors de toutes les séances d'injection (**Figure 3.6**). Au total, entre 6000 et 8000 œufs ont été injectés pour chaque construction.

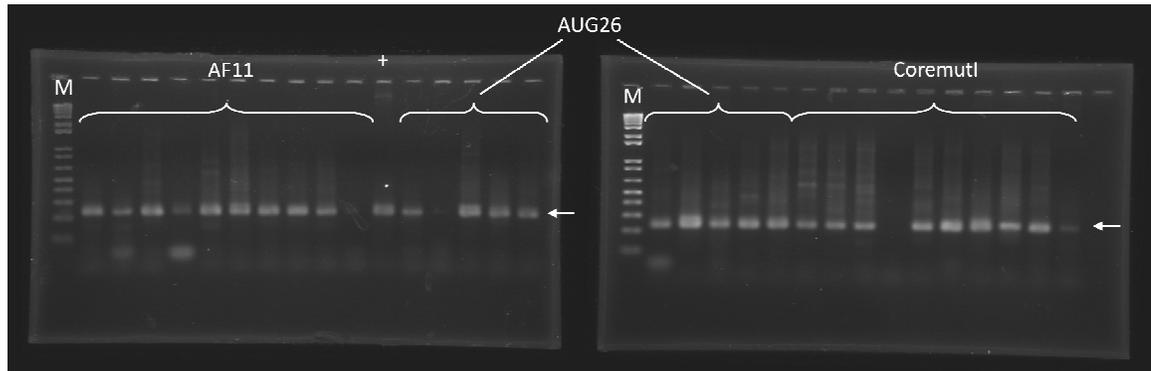


Figure 3.6. Efficacité d'intégration des transgènes avec le système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off.

Les résultats de la PCR démontrant l'excision des transgènes sont donnés pour une séance d'injection donnée pour les vecteurs pT2-TRE-AF11pA-AcGFP (AF11), pT2-TRE-AUG26pA-AcGFP (AUG26) et pT2-TRE-CoremutIpA-AcGFP (CoremutI). La flèche blanche marque la position des bandes attendues à 250 pb. Dans ce cas-ci, l'intégration du transgène est confirmée dans 9 embryons sur 10 pour chaque construction. + : contrôle positif de la PCR. M : 1 kb DNA ladder (SolGent; DaeJeon, Corée du Sud).

3.6 Poissons fondateurs

Suite à la vérification de l'intégration des transgènes par PCR, leur expression a été évaluée en se basant sur le profil de fluorescence du gène rapporteur. Comme le gène rapporteur est sous le contrôle du même promoteur et présent sur le même plasmide que les gènes d'intérêt, la spécificité d'expression de la fluorescence représente également la spécificité d'expression du gène à l'étude. Pour qu'un embryon soit considéré comme un poisson fondateur, il doit présenter une expression robuste de la fluorescence spécifiquement au foie. Le système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off permet d'obtenir cette spécificité chez environ 1% des embryons injectés (Wangta Liu et Jen-Leih Wu, données non publiées). Lors de l'examen des embryons 5 à 7 jours après l'injection, une majorité d'embryons présentaient une expression ectopique ou non spécifique de la fluorescence (**Figure 3.7**). Ces profils d'expression sont dus à l'intégration du transgène dans des régions génomiques qui sont activement transcrites dans des tissus autres que le foie. Il a récemment été démontré que près de 40% des événements d'insertion du transposon *Tol2* surviennent dans des unités transcriptionnelles du poisson zébré (196), ce qui explique le grand nombre d'embryons avec expression non-spécifique obtenu avec le système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off.

Des poissons arborant un profil d'expression spécifique au foie ont pu être obtenus pour les constructions AF11, AUG26 et CoremutI (**Figure 3.8**). Les embryons sélectionnés comme fondateurs exprimaient différents niveaux de fluorescence et plusieurs mosaïques d'expression ont été observées, allant d'une expression dans quelques cellules à une expression presque uniforme dans tout le foie. Selon les critères précédemment énumérés, 19 poissons fondateurs ont été retenus pour la lignée AF11-Tet-Off, 21 fondateurs ont été retenus pour la lignée AUG26-Tet-Off et 36 fondateurs ont été retenus pour la lignée CoremutI-Tet-Off. Quatre à cinq mois plus tard, 9 individus de la lignée AF11-Tet-Off et 11 individus des lignées AUG26-Tet-Off et CoremutI-Tet-Off, respectivement, ont survécu et seront croisés avec des poissons de type sauvage.



Figure 3.7. Expression ectopique ou non spécifique de la fluorescence chez des embryons co-injectés avec pT2-TRE-AUG26-AcGFP et pT2-LF2.8-tTA2.

A. Un embryon de 7 jours présente une expression ectopique du gène rapporteur sans expression dans le foie (flèche noire). **B.** Un embryon de 7 jours présente une expression du gène rapporteur dans le foie (flèche noire et flèche blanche) et une expression non spécifique dans l'œil et le tube neural (flèches rouges). Les images sont montrées en contraste de phase (panneau de gauche), en fluorescence (panneau central) et en superposition (panneau de droite).

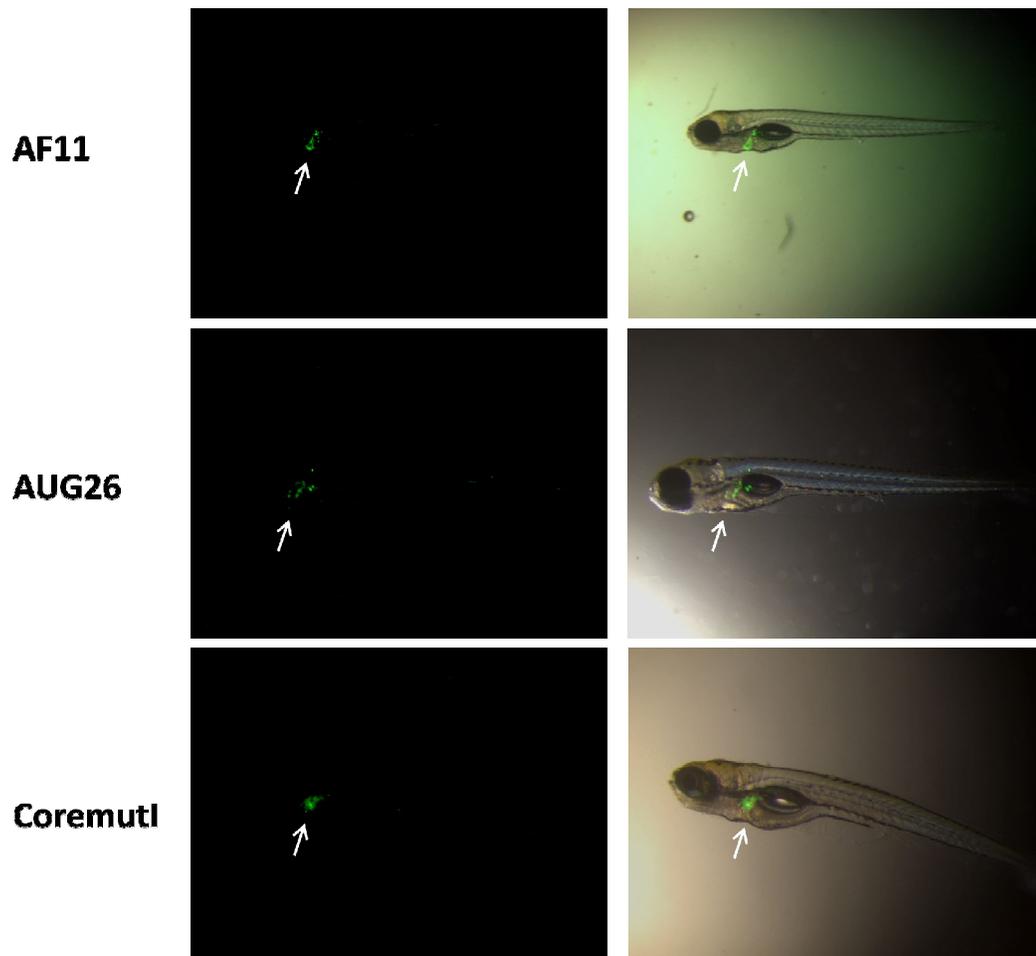


Figure 3.8. Profil d'expression recherché pour les poissons transgéniques fondateurs.

Des embryons co-injectés avec pT2-LF2.8-tTA2 et pT2-TRE-AF11pA-AcGFP (AF11), pT2-TRE-AUG26pA-AcGFP (AUG26) ou pT2-TRE-CoremutIpA-AcGFP (CoremutI) présentent une expression du gène rapporteur spécifiquement au foie (flèches blanches). Les poissons montrés sont âgés de 6 jours (AF11) ou 7 jours (AUG26 et CoremutI). L'expression de la GFP est visualisée en fluorescence (panneau de gauche) et donnée en superposition avec l'embryon en contraste de phase (panneau de droite).

4. Discussion

Un total de 18 vecteurs, comprenant quatre versions de la séquence encodant la protéine F et trois mutants du gène *core*, ont été produits. Cette bibliothèque compte aussi plusieurs contrôles ainsi que différents marqueurs fluorescents associés à un même transgène d'intérêt. Trois constructions d'intérêt stratégique, AF11, AUG26 et CoremutI, ont été choisies pour lancer les premières lignées transgéniques, dont deux expriment différentes versions de la protéine F, et une troisième qui permet théoriquement l'expression de la protéine Core sans la protéine F. Des expériences d'immunofluorescence sur une lignée d'hépatocytes de poissons zébrés nous ont permis de localiser la protéine F au cytoplasme et au noyau. Les transgènes ont été placés dans un système ciblant leur expression au foie du poisson zébré et pouvant être réprimée par l'ajout de doxycycline au milieu, puis ont été injectés dans des embryons au stade unicellulaire pour obtenir les fondateurs des lignées de poissons zébrés transgéniques. De 19 à 36 fondateurs ont été sélectionnés pour chaque lignée.

4.1 Construction génétiques

Nous avons généré plusieurs versions des gènes encodant la protéine F et Core. On peut s'attendre à ce que les gènes AF11 et AUG26, qui expriment tous deux exclusivement la protéine F, produisent le même phénotype. Deux facteurs pourraient cependant expliquer des phénotypes divergents. D'abord, il faut considérer les travaux que d'autres équipes ont complétés *in vitro*. On a observé, par exemple, des localisations cellulaires différentes selon la version de la protéine F exprimée (122; 125; 126; 127; 129; 130; 131). Ceci implique donc la possibilité que différentes formes de la protéine occupent des fonctions distinctes selon le compartiment cellulaire dans lequel elles se retrouvent. Ensuite, contrairement à AUG26, dont la séquence complète s'inscrit dans le cadre de lecture (+1), AF11 porte les 11 premiers codons de Core en plus de la séquence en (+1) et présente la même structure secondaire d'ARN que le gène Core de type sauvage dans les tiges-boucles SL47 et SL87 (**Figure 4.1**).

La présence des tiges-boucles pourrait influencer nos résultats pour cette construction particulière. Afin de distinguer leur apport sur le phénotype, nous disposons de trois mutants de Core, soit CoremutI, CoremutII et CoremutIII, qui portent tous trois la séquence sauvage de Core dans laquelle un codon non-sens dans le cadre de lecture de la protéine F a été introduit. Nos prédictions révèlent que la structure secondaire d'ARN demeure intacte pour le gène CoremutI et qu'elle n'est que légèrement modifiée pour les gènes CoremutII et CoremutIII. Ces mutants, particulièrement CoremutI, revêtent un intérêt certain dans la définition de l'importance des structures secondaires d'ARN dans la pathologie (134; 145). Ils permettront aussi d'évaluer la possibilité d'un effet agoniste de la co-expression de Core et de la protéine F. Les résultats extraits de ces lignées pourront être comparés à ceux de lignées exprimant Core1a et AF11 pour isoler les fonctions respectives de la protéine F, Core et des tiges-boucles.

Ces expériences reposent toutefois sur la supposition que les ARNm transcrits à partir de nos constructions prendront la même conformation que s'ils se trouvaient dans le contexte de l'ARN génomique, en admettant que les prédictions *in silico* soient conformes à la biologie naturelle du cycle viral. Cette critique s'applique aussi aux rares travaux qui se sont attardés à l'importance des structures d'ARN dans la réplication virale et l'infection. En effet, les deux équipes qui se sont affairées à démontrer que les structures d'ARN importaient plus que la protéine F pour le bon fonctionnement du cycle viral (134; 145) ont basé leurs hypothèses sur le modèle émis par le groupe de Peter Simmonds à partir d'analyses *in silico* (107). Or l'existence et la conformation *in situ* des structures secondaires d'ARN restent encore à établir.

D'autre part, les signes cliniques associés au VHC n'apparaissent chez l'homme qu'après plusieurs années d'infection, malgré une réplication virale active (11). La protéine F n'est probablement exprimée que très faiblement au cours de l'infection. Si cette dernière participe à la pathogénèse du VHC comme nous l'avons proposé, l'apparition de la maladie pourrait être accélérée en augmentant son niveau d'expression. Les gènes optimisés AF11opti et AUG26opti ont été créés afin d'établir un lien entre le niveau d'expression de

la protéine F et la pathologie en comparant les profils de développement de la maladie dans des lignées AF11opti et AUG26opti avec ceux des lignées AF11 et AUG26.

Finalement, suite à la découverte que Core réprimait l'expression de la protéine F (125; 135), Vassilaki et Mavromara ont émis l'hypothèse que la protéine Core pourrait médier la dégradation de la protéine F *via* le protéasome (124). Ceci laisse présager que la protéine F pourrait avoir un rôle dans la régulation du cycle viral, sachant que Core est fortement exprimée durant la réplication active du virus. Les interactions entre Core et la protéine F pourraient être exposées en créant une lignée dans laquelle l'expression de la protéine F serait possible à un haut niveau malgré l'expression de Core. Une telle idée est techniquement réalisable grâce aux vecteurs du système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off qui ont été construits en parallèle avec deux gènes rapporteurs différents, soit GFP et RFP, et qui permettraient de sélectionner facilement les fondateurs de lignées co-exprimant les deux transgènes. En plus de faciliter la sélection des poissons fondateurs, les gènes rapporteurs placés dans le contexte du système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off présentent l'avantage de révéler à une échelle macroscopique la transformation cellulaire *via* la perte de fluorescence dans les tissus tumoraux.

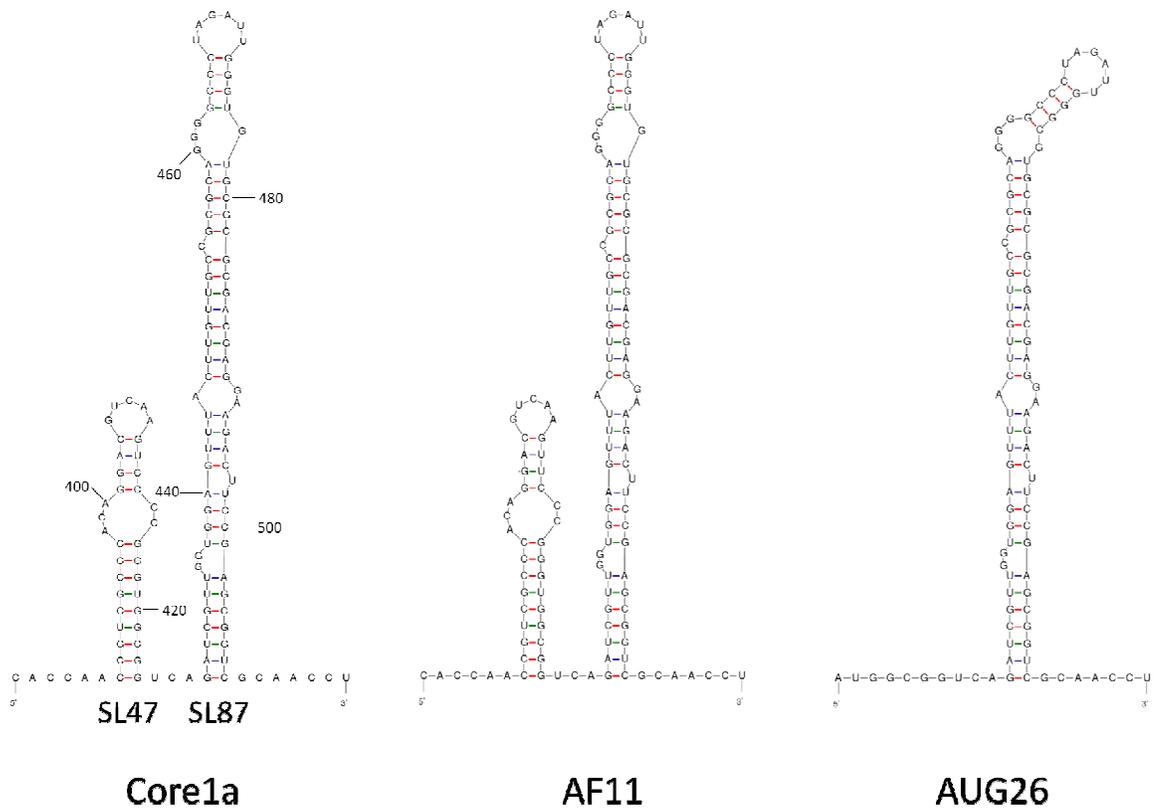


Figure 4.1. Structures d'ARN des gènes AF11 et AUG26 comparées à Core1a.

Le gène AF11 partage les mêmes structures en tiges-boucles que le gène sauvage Core1a. Le gène AUG26 n'inclut pas la boucle SL47 et possède une boucle SL87 altérée.

4.2 Localisation cellulaire

La protéine F exprimée dans les cellules ZF-L se localise dans le cytoplasme et le noyau pour les gènes AF11, AUG26 ou Core1a. Le gène Core1a exprime Core en même temps que la protéine F et la co-expression de Core n'influencerait donc pas la localisation de la protéine F. Dans des lignées de cellules humaines, plusieurs équipes ont localisé la protéine F au cytoplasme (122; 125; 129) ou au noyau (129; 131) et sa présence dans les deux compartiments cellulaires en même temps a aussi été rapportée (129).

Selon les hypothèses proposées pour le mode de production de la protéine F, les gènes que nous utilisons permettent tous l'expression d'au moins deux versions de la protéine, soit par l'initiation de la traduction au codon 26(+1) et par l'initiation de la traduction aux codons 85(+1)/87(+1). Des données publiées récemment montrent que les protéines issues de l'initiation de la traduction au codon 26(+1) ou d'un codon AUG inséré au codon 13 (+1) s'associent plus précisément aux mitochondries (122; 129). Nous avons donc effectué un marquage mitochondrial sur les cellules transfectées avec AF11, AUG26 et Core1a pour vérifier si la co-localisation était aussi reproduite dans les cellules ZF-L. Nos résultats montrent que l'association avec les mitochondries n'existe pas dans notre système. Par contre, les résultats de la littérature se contredisent eux-mêmes à propos de la localisation de ces formes de la protéine F aux mitochondries. Ratinier *et al.* ont trouvé une association aux mitochondries à partir d'une protéine de fusion seulement lorsque la GFP était fusionnée en N-terminal de la protéine F (129). La fusion en C-terminal entraînait plutôt une localisation nucléaire et cytoplasmique diffuse ressemblant à nos résultats (129). Il se peut aussi que la forme courte de la protéine issue de l'initiation de la traduction aux codons 85(+1)/87(+1), qui peut être produite dans toutes nos constructions et qui a précédemment été localisée au cytoplasme (122), soit la forme prédominante exprimée par tous nos gènes. La présence de la protéine tronquée expliquerait que la localisation soit la même pour AF11, AUG26 et Core1a puisque sa présence dans l'ensemble du cytoplasme et

du noyau camouflerait la localisation plus fine d'un autre produit du cadre de lecture alternatif de Core.

Les mutants CoremutI, CoremutII et CoremutIII devaient permettre l'expression de Core sans la protéine F et sans modifier les structures secondaires d'ARN. Nous avons démontré par simulation *in silico* que les mutations introduites dans le gène de Core n'affectaient pas, ou très peu, les structures d'ARN. Nous avons donc voulu démontrer *in vivo* que les mutations non-sens introduites dans le cadre de lecture (+1) empêchaient l'expression de la protéine. Faute d'anticorps anti-F en quantité suffisante pour effectuer des immunobuvardages sur la lignée ZF-L transfectée avec CoremutI, CoremutII et CoremutIII, l'expression de la protéine F a été évaluée par immunofluorescence.

Étonnamment, la présence de la protéine F a été révélée pour les trois mutants. La position des mutations non-sens devait entraîner l'expression d'une protéine tronquée très courte qui, selon le mode de production retenu et le mutant étudié, ferait de 3 à 34 acides aminés. La possibilité que l'anticorps monoclonal anti-F utilisé ait reconnu un tel polypeptide apparaît donc invraisemblable. Par contre, les mutations non-sens sélectionnées bloquent l'expression de la protéine F par glissement ribosomal aux codons 8-11, par initiation de la traduction au codon 26(+1) et par glissement ribosomal au codon 42, mais permettent tout de même l'expression de la forme plus courte de la protéine par initiation de la traduction aux codons 85(+1)/87(+1), les trois mutations se trouvant en amont de ces codons. Nos résultats suggèrent donc que la protéine F est efficacement produite à partir des codons initiateurs 85(+1)/87(+1) dans les hépatocytes de poisson zébré, comme il le fut démontré dans des cellules humaines (117; 121; 122). De plus, la protéine issue du cadre de lecture (+1) détectée sur nos mutants se localisait exactement de la même manière que pour AF11, AUG26 et Core1a, soit au cytoplasme et au noyau.

Une fois confirmées, ces données renforceraient davantage l'hypothèse selon laquelle l'initiation de la traduction aux codons 85(+1)/87(+1) serait le mode privilégié d'expression de la protéine F même dans un contexte où le changement de cadre de lecture

aux codons 8-11 ou 42 et l'initiation au codon 26(+1) sont possibles, et que cette forme soit celle qui donne la distribution cellulaire observée pour les six constructions testées. Il faut toutefois considérer la possibilité que l'anticorps monoclonal anti-F utilisé ne soit pas spécifique et que nos observations résultent d'une réactivité de l'anticorps avec Core ou avec une protéine cellulaire. Outre qu'en se basant sur un profil de fluorescence distinct selon que l'anticorps anti-Core ou anti-F était utilisé, il nous est impossible de confirmer hors de tout doute par immunofluorescence que la protéine F est bien exprimée à partir de nos constructions. Pour ce faire, un immunobuvardage avec l'anticorps anti-F s'impose pour déterminer la taille de la protéine détectée et confirmer qu'il s'agit bien de la protéine F. La localisation de la protéine dans les hépatocytes de poisson zébré pourrait être vérifiée par des fusions de la protéine F avec une protéine fluorescente. Cette méthode a déjà été employée avec succès par d'autres (129). Il serait aussi intéressant de créer des protéines de fusion fluorescentes pour les trois mutants décrits ici et de tester l'ensemble de ces constructions *in vivo* en utilisant la microinjection dans des embryons de poissons zébrés pour obtenir une expression transitoire des protéines de fusion dans le foie.

Enfin, nous avons observé des régions cytoplasmiques qui demeuraient exemptes de la protéine F sur toutes les constructions expérimentées *in vitro*. Ces régions étaient présentes sur la grande majorité des cellules analysées, toujours situées en périphérie du noyau, et, quoiqu'elles se présentaient sous différentes tailles, occupaient souvent un grand espace dans le cytoplasme. La plupart des cellules transfectées n'arboraient qu'une ou deux de ces régions. Ces dernières n'ont pas pu être identifiées avec certitude, mais elles ressemblaient étrangement aux grosses gouttelettes lipidiques que Piodi *et al.* avaient observées dans des cellules Huh7 transfectées avec le gène Core de génotype 3a (197). Ceci pourrait être confirmé par un co-marquage de la protéine F et de la protéine associée à la différenciation adipeuse (ADRP – *adipose differentiation related protein*), qui se lie à la surface des gouttelettes lipidiques intracellulaires.

4.3 Lignées transgéniques

Le poisson zébré n'a jamais été employé comme modèle en virologie. Pour cette raison, le développement de lignées contrôles importait pour démontrer que le phénotype observé était attribuable au transgène plutôt qu'au système de transgénèse, ainsi que pour justifier la validité du poissons zébré comme modèle pour l'étude d'un virus humain. Deux vecteurs ont été produits dans cette optique, soit les vecteurs pBS-Core1apA-PCKII-eGFPpA et pBS-HBxpA-PCKII-eGFPpA. Les deux gènes viraux introduits dans ces vecteurs, Core et HBx, ont déjà démontré leur potentiel pathogène dans des souris transgéniques grâce auxquelles on a pu associer leur expression à la pathologie observée chez l'homme infecté respectivement par le VHC et le VHB (102; 103; 198). Dans le but d'établir la valeur du poisson zébré comme modèle, on s'attend à ce qu'en exprimant ces transgènes dans le foie du poisson zébré, les mêmes phénotypes que ceux trouvés chez la souris et chez l'homme soient reproduits. Une étude menée par Rekha *et al.* a d'ailleurs permis de modéliser la maladie hépatique chez le poisson zébré en combinant l'expression de la protéine Core du VHC et l'exposition chronique à la thioacétamide (199). Les animaux ainsi traités développaient une pathologie dont la progression et les manifestations correspondaient à ce qu'on retrouve chez l'homme infecté par le VHC et qui était caractérisée par l'apparition du CHC précédée de stéatose, de fibrose et d'infiltrations lymphocytaires dans le foie.

Au moment même où les deux vecteurs devant servir de contrôles positifs étaient préparés au laboratoire, l'équipe de Jen-Leih Wu suivait exactement le même raisonnement et produisait des lignées de poissons zébrés exprimant indépendamment Core et HBx, ou co-exprimant ces protéines dans le but de créer un nouveau modèle de pathologie hépatique. L'existence de ces lignées nous évitait la tâche de les générer nous-mêmes. Une lignée exprimant la GFP avait aussi été développée comme contrôle négatif par cette équipe en utilisant le système *Tol2*-LF2.8-Tet-Off. Cette lignée pourra être utilisée comme

contrôle négatif pour nos propres expériences, rendant désuet le plasmide pBS-eGFPpA-PCKII-eGFPpA développé à cet effet.

Le travail et le matériel qu'implique le développement de lignées transgéniques nous a limité à la production de 3 lignées. Le choix de produire d'abord des lignées AF11, AUG26 et CoremutI nous permet de bien positionner le rôle de la protéine F dans la pathogénèse de l'hépatite C, et ce, peu importe les phénotypes qui seront observés sur les poissons transgéniques (**Tableau 3**). La présence de signes cliniques dans la lignée AF11 et/ou la lignée AUG26 démontrerait que la protéine F suffirait à elle seule à induire la pathogénèse.

Il est aussi possible que la pathologie n'apparaisse dans aucune des lignées produites. Du point de vue clinique, cette possibilité devient peut-être la plus intéressante puisqu'elle suggérerait l'absence de toxicité de la protéine F. L'innocuité de la protéine chez le poisson zébré pourrait être prouvée par le développement de lignées exprimant les versions optimisées des gènes AF11 et AUG26. Ces gènes optimisés ont été conçus pour assurer une expression maximale de la protéine F chez le poisson zébré et devraient amplifier ou accélérer l'apparition des signes cliniques. L'absence de pathologie dans des lignées exprimant AF11opti ou AUG26opti confirmerait l'innocuité de la protéine F et contribuerait à mieux justifier son utilisation dans une formule vaccinale. Plusieurs éléments justifieraient d'ailleurs l'inclusion de la protéine F dans un vaccin. Entre autres, la protéine est codée dans une des régions les plus conservées du génome du VHC et elle est conservée à travers tous les génotypes du virus (108). Elle génère une réponse humorale qui présente une grande réactivité croisée face à tous les génotypes (110; 113; 142) et les anticorps anti-F peuvent atteindre les mêmes titres que les anticorps anti-Core (110). De plus, notre équipe a démontré que l'immunisation de souris avec la protéine F sous forme de protéine recombinante ou de vecteur à ADN suscitait une réponse cellulaire de type Th1 et Th2, ainsi qu'une réponse humorale. Lorsque soumises à un challenge avec un virus de la vaccine recombinant portant la protéine F, les souris ainsi immunisées affichaient un certain niveau de résistance à l'infection (200).

Tableau 3. Interprétation des phénotypes possibles pour les lignées AF11, AUG26 et CoremutI.

Les « X » marquent la présence hypothétique de signes cliniques au niveau du foie, que ce soit la fibrose, la cirrhose, la stéatose, des infiltrations lymphocytaires, l'apoptose ou le CHC.

AF11	AUG26	CoremutI, II ou III	Éléments contribuant à la pathogénèse
X	X	X	Protéine F et Core ou structures d'ARN
X	X		Protéine F
X		X	Structures d'ARN
X			Protéine F
	X		Protéine F
		X	Core

4.4 Poissons fondateurs

Il faut considérer que des phénotypes intermédiaires, par exemple l'apparition d'une pathologie retardée ou possédant une pénétrance incomplète, pourraient être observés à cause des différences entre les niveaux d'expression des transgènes d'une lignée à l'autre ou du locus d'intégration. Pour cette raison, il importe de bien sélectionner les fondateurs et de maintenir, si possible, trois familles par lignée, chacune issue d'un fondateur différent et présentant des niveaux d'expression respectivement faible, moyen et élevé du transgène.

Pour y arriver, les poissons fondateurs qui ont été obtenus par microinjection seront croisés un par un avec un partenaire de type sauvage pour obtenir une première génération-fille (F1). Cinq à sept jours post-fertilisation, leur progéniture sera examinée sous stéréoscope à fluorescence et certains des embryons présentant une fluorescence spécifique au foie seront sacrifiés dans chaque famille pour mesurer le niveau d'expression du transgène par RT-PCR quantitative (qRT-PCR – *quantitative* RT-PCR). Les fondateurs donnant naissance à des embryons produisant des niveaux élevés, modérés et faibles de la protéine seront sélectionnés pour produire les lignées transgéniques sur lesquelles l'effet de la protéine F sera observé. Le système de transgénèse *Tol2*-LF2.8-Tet-Off donne généralement un rendement de 30 à 50% des fondateurs qui transmettent le transgène à leur descendance. Il faudra un deuxième cycle de croisement à partir de la première génération fille, avec des poissons de type sauvage, pour s'assurer que le transgène se transmette selon une répartition mendélienne et éliminer les effets qui pourraient être dus à des mutations insertionnelles causées par l'intégration du transgène au moment de la transgénèse. Le phénotype pourra être étudié à partir de la deuxième génération-fille (F2).

4.5 Analyse du phénotype

Les signes cliniques associés à l'infection par le VHC, soit la fibrose, la cirrhose ou la stéatose hépatique ainsi que le carcinome hépatocellulaire, pourraient tous se retrouver dans nos lignées transgéniques. Le foie des poissons transgéniques sera d'abord examiné

entier à l'état frais. Des mesures de volume et de masse ainsi que la recherche de particularités macroscopiques telles que des hémorragies, des hyperplasies ou des dysplasies seront effectuées. Un examen histologique s'ensuivra pour exposer à l'échelle cellulaire les effets du transgène. La coloration à hématoxyline-éosine (HE) permettra d'identifier tous les signes énumérés précédemment, ainsi que les infiltrations de cellules mononuclées. Puisque l'apparence histologique de la pathologie est très similaire entre le foie de l'homme et celui du poisson zébré (162), nos échantillons pourront être gradés à l'aveugle par un pathologiste expérimenté. Les niveaux sanguins d'ALT, d'AST, de bilirubine et d'albumine, ainsi que le taux de prothrombine, pourront être mesurés à partir de prélèvements effectués sur les poissons sacrifiés. L'ensemble de ces indices pourra être corrélé avec l'expression de la protéine F en localisant cette dernière par microscopie confocale et en mesurant son niveau d'expression par immunobuvardage. Puisque l'apparition des signes cliniques peut survenir à différents âges selon le transgène exprimé, des poissons seront sacrifiés à tous les trois mois à partir de trois mois et jusqu'à un an.

5. Conclusion et perspectives

Nous avons généré des poissons zébrés transgéniques à partir desquels seront établies des lignées stables exprimant la protéine F spécifiquement au foie. Ces lignées nous aideront à déterminer la part qu'occupe la protéine F dans la pathogénèse de l'hépatite C. Notre projet est le premier à placer cette protéine dans un contexte *in vivo* et qui, de surcroît, reproduit plusieurs paramètres de l'infection chronique. Cet environnement nous permettra de détecter les effets subtils que pourrait produire la protéine F à long terme et qui échappent aux études portant sur des cellules en culture. Grâce aux différentes constructions génétiques produites, nous distinguerons les effets de la protéine F de ceux provoqués par Core et les structures secondaires d'ARN. Les mutants de la protéine Core que nous avons créés pourront aussi nous informer sur le mode de production de la protéine F, un mécanisme complexe pour lequel aucun consensus n'existe à l'heure actuelle.

Suite à la stabilisation des lignées transgéniques et à l'évaluation des effets de la protéine F sur le foie du poisson zébré, il sera possible de décortiquer les mécanismes cellulaires menant aux phénotypes observés à l'aide des nombreux outils développés spécifiquement pour ce modèle. Parmi les outils accessibles, on compte notamment des micropuces spécifiques au poisson zébré et des librairies de mutants largement caractérisées. Cette étude revêt un fort intérêt clinique; dans l'éventualité où la protéine F serait responsable de la pathogénèse, une dissection du mécanisme par lequel s'opère la pathogénèse permettrait le développement de thérapies pour contrer ses effets et ainsi annuler ou retarder l'apparition des signes cliniques chez les patients. Au contraire, l'innocuité de la protéine dans notre modèle constituerait un premier pas vers l'inclusion de la protéine F dans une formule vaccinale.

Enfin, notre projet utilise le poisson zébré pour étudier une protéine exprimée par un virus humain. Il s'agit d'une recherche pionnière en virologie puisque ce modèle n'a jamais été employé auparavant dans le domaine. La modélisation de la maladie hépatique chez le poisson zébré transgénique réalisée par l'équipe du Dr Wu et qui résumait fidèlement les étapes de la maladie chez l'humain (199) nous permet de croire que nos résultats produits avec le poisson zébré reflèteront précisément le processus de pathogénèse au cours de

l'infection par le VHC chez l'humain. D'ailleurs, selon les résultats obtenus sur les cultures cellulaires, la protéine F semble se comporter de la même manière dans les hépatocytes humains et de poissons zébrés.

La caractérisation approfondie de la protéine F dans nos lignées transgéniques apportera des données précieuses qui contribueront à l'établissement du poisson zébré comme modèle pour l'étude de la fonction des gènes viraux et de la pathogenèse associée aux virus hépatotropiques humains.

6. Bibliographie

1. **World Health Organization.** Hepatitis C facts sheet. [En ligne] 2009. [Citation : 12 septembre 2009.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
2. **Frank C., Mohamed M.K., Strickland T., et al.** The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet.* 2000, Vol. 355, 9207, p. 887-891.
3. **Rustgi, V.K.** The epidemiology of hepatitis C virus infection in the United States. *J Gastroenterol.* 2007, Vol. 42, 7, p. 513-521.
4. **Canada Communicable Disease.** *Hepatitis C, prevention and control: a public health consensus.* Ottawa : Santé Canada, 1999. ISSN 1188-4169, Vol. 25S2.
5. **Zou S., Forrester L. et Giulivi A.** Hepatitis C update. *Can J Public Health.* 2003, Vol. 92, 2, p. 127-129.
6. **Lavanchy, D.** The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009, Vol. 29, Suppl. 1, p. 74-81.
7. **Maheshwari A., Ray S., et Thuluvath P.J.** Acute hepatitis C. *Lancet.* 2008, Vol. 372, 9635, p. 321-332.
8. **Thimme R., Oldach D., Chang K.M., et al.** Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001, Vol. 194, 10, p. 1395-1406.
9. **Blackard J.T., Shata M.T., Shire N.J., et Sherman K.E.** Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology.* 2008, Vol. 47, 1, p. 321-331.
10. **Alter M.J., Margolis H.S., Krawczynski K., et al.** The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The sentinel counties chronic non-A, non-B hepatitis study team. *N Engl J Med.* 1992, Vol. 327, 27, p. 1949-1950.
11. **Seeff, L.B.** Natural history of hepatitis C. *Am J Med.* 1999, Vol. 107, 6B, p. 10S-15S.
12. **Mailliard M.E., Capadano M.E., Hrnicek M.J., et al.** Outcomes of a patient-to-patient outbreak of genotype 3a hepatitis C. *Hepatology.* 2009, Vol. 50, 2, p. 361-368.

13. **Los Alamos National Laboratory.** HCV Classification. *HCV databases*. [En ligne] 2009. [Citation : 9 Novembre 2009.]
<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/classification/genotable.html>.
14. **Simmonds P., Bukh J., Combet C., et al.** Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005, Vol. 42, 4, p. 962-973.
15. **Martell M., Esteban J.I., Quer J., et al.** Hepatitis C virus circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*. 1992, Vol. 66, 5, p. 3225-3229.
16. **Brown E.A., Zhang H., Ping L.H., et al.** Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*. 1992, Vol. 20, 19, p. 5041-5045.
17. **Smith D.B., Mellor J., Jarvis L.M., et al.** Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure and typing. *J Gen Virol*. 1995, Vol. 76, 7, p. 1749-1761.
18. **Tsukiyama-Kohara K., Iizuka N., Kohara M., et al.** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*. 1992, Vol. 66, 3, p. 1476-1483.
19. **Murray C.L., Jones C.T., et Rice C.M.** Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2008, Vol. 6, 9, p. 699-708.
20. **Bartenschlager R., et Bühler S.** Hepatitis C virus. [auteur du livre] B.W.J. Mahy et M. van Regenmortel. *Encyclopedia of Virology*. 3e édition. Amsterdam : Elsevier, 2008, p. 367-374.
21. **Blackard J.T., Hiasa Y., Smeaton L., et al.** Compartmentalization of hepatitis C virus during HCV/HIV coinfection. *J Infect Dis*. 2007, Vol. 195, 12, p. 1765-1773.
22. **Dubuisson J., Hsu H.H., Cheung R.C., et al.** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol*. 1994, Vol. 68, 10, p. 6147-6160.

23. **Rosa D., Campagnoli S., Moretto C., et al.** A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, Vol. 93, 5, p. 1759-1763.
24. **Griffin S.D., Beales L.P., Clarke D.S., et al.** The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 2003, Vol. 535, 1, p. 34-38.
25. **Pavlovic D., Neville D.C., Argaud O., et al.** The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, Vol. 100, 10, p. 6104-6108.
26. **Moradpour D., Penin F., et Rice C.M.** Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol.* 2007, Vol. 5, 6, p. 453-463.
27. **Dentzer T.G., Lorenz I.C., Evans M.J., et al.** Determinants of hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol.* 2009, Vol. 83, 24, p. 12702-12713.
28. **Jirasko V., Montserret R., Appel N., et al.** Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem.* 2008, Vol. 283, 42, p. 28546-28562.
29. **Bartenschlager, R.** The NS3/A4 proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 1999, Vol. 6, 3, p. 165-181.
30. **Egger D., Wölk B., Gosert R., et al.** Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* 2002, Vol. 76, 12, p. 5974-5984.
31. **Penin F., Brass V., Appel N., et al.** Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 2004, Vol. 279, 39, p. 40835-40843.
32. **Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., et al.** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 1998, Vol. 282, 5390, p. 938-941.

33. **Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., et al.** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 2002, Vol. 21, 19, p. 5017-5025.
34. **Evans M.J., von Hahn T., Tscherne D.M., et al.** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 2007, Vol. 446, 7137, p. 801-805.
35. **Liu S., Yang W., Shen L., et al.** Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol.* 2009, Vol. 83, 4, p. 2011-2014.
36. **Ploss A., Evans M.J., Gaysinskaya V.A., et al.** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature.* 2009, Vol. 457, 7231, p. 882-886.
37. **Dubuisson J., Helle F., et Cocquerel L.** Early step of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol.* 2008, Vol. 10, 4, p. 821-827.
38. **Owen D.M., Huang H., Ye J., et al.** Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interactions with low-density lipoprotein receptor. *Virology.* 2009, Vol. 394, 1, p. 99-108.
39. **Birke A.T., et Cocquerel L.** Occludine, une clé de plus pour l'entrée du virus de l'hépatite C. *Médecine Sciences.* 2009, Vol. 25, 6, p. 549-551.
40. **Meertens L., Bertaux C., et Dragic T.** Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol.* 2006, Vol. 80, 23, p. 11571-11578.
41. **Blanchard E., Belouzard S., Goueslain L, et al.** Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 2006, Vol. 80, 14, p. 6964-6972.
42. **Otto G.A., et Puglisi J.D.** The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell.* 2004, Vol. 119, 3, p. 369-380.
43. **Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., et al.** Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, Vol. 99, 24, p. 15661-15668.

44. **Grakoui A., Shoukry N.H., Woollard D.J., et al.** HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*. 2003, Vol. 302, 5645, p. 659-662.
45. **Waggoner S.N., Hall C.H., et Hahn Y.S.** HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4⁺ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J Leukoc Biol*. 2007, Vol. 82, 6, p. 1407-1419.
46. **Helle F., Goffard A., Morel V., et al.** The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol*. 2007, Vol. 81, 15, p. 8101-8111.
47. **Siefert U., Liermann H., Racanelli V., et al.** Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest*. 2004, Vol. 114, 2, p. 250-259.
48. **Neumann-Haefelin C., Timm J., Spangenberg H.C., et al.** Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8⁺ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2008, Vol. 47, 6, p. 1824-1836.
49. **Foy E., Li K., Sumpter R. Jr., et al.** Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, Vol. 102, 8, p. 2986-2991.
50. **Li X.D., Sun L., Seth R.B., et al.** Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, Vol. 102, 49, p. 17717-17722.
51. **Li K., Foy E., Ferreon J.C., et al.** Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, Vol. 102, 8, p. 2992-2997.
52. **Manns M.P., McHutchison J.G., Gordon S.C., et al.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001, Vol. 358, 9286, p. 958-965.
53. **Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., et al.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002, Vol. 347, 13, p. 975-982.

54. **Hadziyannis S.J., Sette H. Jr., Morgan T.R., et al.** Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 2004, Vol. 140, 5, p. 346-355.
55. **Zeuzem S., Hullcrantz R., Bourlière M., et al.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol.* 2004, Vol. 40, 6, p. 993-999.
56. **Wohnsland A., Hofmann W.P., et Sarrazin C.** Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev.* 2007, Vol. 20, 1, p. 23-38.
57. **Yu M.L., et Chuang W.L.** Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009, Vol. 24, 3, p. 336-345.
58. **Lauer G.M., et Walker B.D.** Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001, Vol. 345, 1, p. 41-52.
59. **Hézode C., Forestier N., Dusheiko G., et al.** Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med.* 2009, Vol. 360, 18, p. 1839-1850.
60. **McHutchison J.G., Everson G.T., Gordon S.C., et al.** Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2009, Vol. 360, 18, p. 1827-1838.
61. **Trépanier J.B., Tanner J.E., et Alfieri C.** Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection. *Antivir Ther.* 2006, Vol. 11, 3, p. 273-287.
62. **Nishikawa F., Kakiuchi N., Funaji K., et al.** Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res.* 2003, Vol. 31, 7, p. 1935-1943.
63. **Kikuchi K., Umehara T., Fukuda K., et al.** A hepatitis C virus internal ribosome entry site domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain III. *Nucleic Acids Res.* 2005, Vol. 33, 2, p. 683-92.
64. **Juliano R.L., Alahar S., Yoo H., et al.** Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm Res.* 1999, Vol. 16, 4, p. 494-502.

65. **Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., et al.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989, Vol. 244, 4902, p. 359-362.
66. **Choo Q.L., Kuo G., Ralston R., et al.** Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, Vol. 91, 4, p. 1294-1298.
67. **Prince A.M., Brotman B., Lee D.H., et al.** Protection against chronic hepatitis C virus infection after rechallenge with homologous, but not heterologous, genotypes in a chimpanzee model. *J Infect Dis*. 2005, Vol. 192, 10, p. 1701-1709.
68. **Grebely J., Conway B., Raffa J.D., et al.** Hepatitis C virus reinfection in injection drug users. *Hepatology*. 2006, Vol. 44, 5, p. 1139-1145.
69. **Micallef J.M., Macdonald V., Jauncey M., et al.** High incidence of hepatitis C virus reinfection within a cohort of injecting drug users. *J Viral Hepat*. 2007, Vol. 14, 6, p. 413-418.
70. **Aitken C.K., Lewis J., Tracy S.L., et al.** High incidence of hepatitis C virus reinfection in a cohort of injecting drug users. *Hepatology*. 2008, Vol. 48, 6, p. 1746-1752.
71. **van de Laar T.J., Molenkamp R., van den Berg C., et al.** Frequent HCV reinfection and superinfection in a cohort of injecting drug users in Amsterdam. *J Hepatol*. 2009, Vol. 51, 4, p. 667-674.
72. **Ploss A., et Rice C.M.** Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep*. 2009, Vol. 10, 11, p. 1220-1227.
73. **Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., et al.** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005, Vol. 309, 5734, p. 623-626.
74. **Wakita T., Pietschmann T., Kato T., et al.** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005, Vol. 11, 7, p. 791-796.
75. **Zhong J., Gastaminza P., Cheng G., et al.** Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, Vol. 102, 26, p. 9294-9299.
76. **Pietschmann T., Kaul A., Koutsoudakis G., et al.** Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, Vol. 103, 19, p. 7408-7413.

77. **Ploss A., Khetani S.R., Jones C.T., et al.** Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, Vol. 107, 7, p. 3141-3145.
78. **Bukh, J.** A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology.* 2004, Vol. 39, 6, p. 1469-1475.
79. **Mercer D.F., Schiller D.E., Elliott J.F., et al.** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med.* 2001, Vol. 7, 8, p. 927-933.
80. **Guévin C., Lamarre A., et Labonté P.** Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. *Antiviral Res.* 2009, Vol. 84, 1, p. 14-22.
81. **Boulant S., Douglas M.W., Moody L., et al.** Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependant manner. *Traffic.* 2008, Vol. 9, 8, p. 1268-1282.
82. **Perlemuter G., Sabile A., Letteron P., et al.** Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.* 2002, Vol. 16, 2, p. 185-194.
83. **Hahn C.S., Cho Y.G., Kang B.S., et al.** The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology.* 2000, Vol. 276, 1, p. 127-137.
84. **Moorman J.P., Prayther D., McVay D., et al.** The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. *Virology.* 2003, Vol. 312, 2, p. 320-329.
85. **Zhu N., Khoshnan A., Schneider R., et al.** Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol.* 1998, Vol. 72, 5, p. 3691-3697.
86. **Benali-Furet N.L., Chami M., Houel L., et al.** Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene.* 2005, Vol. 24, 31, p. 4921-4933.
87. **Friedman, S.L.** Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008, Vol. 134, 6, p. 1655-1669.

88. **Marusawa H., Hijikata M., Chiba T., et al.** Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol.* 1999, Vol. 73, 6, p. 4713-4720.
89. **Disson O., Hahne M., Hibner U., et al.** Hepatocytes transgenic for the full hepatitis C virus open reading frame are resistant to fas-induced cell death. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, Vol. 973, p. 214-217.
90. **Machida K., Tsukiyama-Kohara K., Seike E., et al.** Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem.* 2001, Vol. 276, 15, p. 12140-12146.
91. **Kim Y.C., Song K.S., Yoon G., et al.** Activated ras oncogene collaborates with HBX gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2001, Vol. 20, 1, p. 16-23.
92. **Kao C.F., Chen S.Y., Chen J.Y., et al.** Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene.* 2004, Vol. 23, 14, p. 2472-2483.
93. **Otsuka M., Kato N., Lan K., et al.** Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem.* 2000, Vol. 275, 44, p. 34122-34130.
94. **Alisi A., Giambartolomei S., Cupelli F., et al.** Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene.* 2003, Vol. 22, 17, p. 2573-2580.
95. **Yamanaka T., Kodama T., et Doi T.** Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, Vol. 294, 3, p. 528-534.
96. **Kwun H.J., et Jang K.L.** Dual effects of hepatitis C virus Core protein on the transcription of cyclin-dependant kinase inhibitor p21 gene. *J Viral Hepat.* 2003, Vol. 10, 4, p. 249-255.

97. **Lee M.N., Jung E.Y., Kwun H.J., et al.** Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway. *J Gen Virol.* 2002, Vol. 83, 9, p. 2145-2151.
98. **Ray R.B., Steele R., Meyer K., et al.** Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene.* 1998, Vol. 208, 2, p. 331-336.
99. **Ray R.B., Lagging L.M., Meyer K., et al.** Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res.* 1995, Vol. 37, 3, p. 209-220.
100. **Ray R.B., Lagging L.M., Meyer K., et al.** Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol.* 1996, Vol. 70, 7, p. 4438-4443.
101. **Yoshida T., Hanada T., Tokuhisa T., et al.** Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med.* 2002, Vol. 196, 5, p. 641-653.
102. **Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., et al.** Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol.* 1997, Vol. 78, 7, p. 1527-1531.
103. **Moriya K., Fujie H., Shintani Y., et al.** The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med.* 1998, Vol. 4, 9, p. 1065-1067.
104. **Soguero C., Joo M., Chianese-Bullock K.A., et al.** Hepatitis C virus core protein leads to immune suppression and liver damage in a transgenic murine model. *J Virol.* 2002, Vol. 76, 18, p. 9345-9354.
105. **Koike K., Moriya K., Ishibashi K., et al.** Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *J Gen Virol.* 1995, Vol. 76, 12, p. 3031-3038.
106. **Ina Y., Mizokami M., Ohba K., et al.** Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol.* 1994, Vol. 38, 1, p. 50-56.
107. **Smith D.B., et Simmonds P.** Characteristics of nucleotides substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J Mol Evol.* 1997, Vol. 45, 3, p. 238-246.

108. **Walewski J.L., Keller T.R., Stump D.D., et al.** Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*. 2001, Vol. 7, 5, p. 710-721.
109. **Xu Z., Choi J., Yen T.S., et al.** Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J*. 2001, Vol. 20, 14, p. 3840-3848.
110. **Chuang W.C., et Allain J.P.** Differential reactivity of putative genotype 2 hepatitis C virus F protein between chronic and recovered infections. *J Gen Virol*. 2008, Vol. 89, 8, p. 1890-1900.
111. **Bain C., Parroche P., Lavergne J.P., et al.** Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2004, Vol. 78, 19, p. 10460-10469.
112. **Troesch M., Jalbert E., Canobio S., et al.** Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS*. 2005, Vol. 19, 8, p. 775-784.
113. **Komurian-Pradel F., Rajoharison A., Berland J.L., et al.** Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004, Vol. 40, 4, p. 900-909.
114. **Varaklioti A., Vassilaki N., Georgopoulou U., et al.** Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem*. 2002, Vol. 277, 20, p. 17713-17721.
115. **Baril M., et Brakier-Gingras L.** Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res*. 2005, Vol. 33, 5, p. 1474-1486.
116. **Yeh C.T., Lo S.Y., Dai D.I., et al.** Amino acid substitutions in codons 9-11 of hepatitis C virus core protein lead to the synthesis of a short core protein product. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000, Vol. 15, 2, p. 182-191.
117. **Vassilaki N., et Mavromara P.** Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/Core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem*. 2003, Vol. 278, 42, p. 40503-40513.

118. **Boulant S., Becchi M., Penin F., et al.** Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem.* 2003, Vol. 278, 46, p. 45785-45792.
119. **Farabaugh, P.J.** *Programmed Alternative Reading of the Genetic Code.* Austin : R. G. Landes, 1997. p. 41-67. ISBN # 0-412-13751-8.
120. **Choi J., Xu Z., et Ou J.H.** Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. *Mol Cell Biol.* 2003, Vol. 23, 5, p. 1489-1497.
121. **Vassilaki N., Kalliampakou K.I., et Mavromara P.** Differences in the expression of the hepatitis C virus core+1 open reading frame between a nuclear and a cytoplasmic expression system. *J Gen Virol.* 2008, Vol. 89, 1, p. 222-231.
122. **Vassilaki N., Boleti H., et Mavromara P.** Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus Res.* 2008, Vol. 133, 2, p. 123-135.
123. **Ratinier M., Boulant S., Combet C., et al.** Transcriptional slippage prompts recoding in alternate reading frames in the hepatitis C virus core sequence from strain HCV-1. *J Gen Virol.* 2008, Vol. 89, 7, p. 1569-1578.
124. **Vassilaki N., et Mavromara P.** The HCV ARFP/F/Core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life.* 2009, Vol. 61, 7, p. 739-752.
125. **Vassilaki N., Boleti H., et Mavromara P.** Expression studies of the core+1 protein of the hepatitis C virus 1a in mammalian cells. The influence of the core protein and proteasomes on the intracellular levels of core+1. *FEBS J.* 2007, Vol. 274, 16, p. 4057-4074.
126. **Roussel J., Pillez A., Montpellier C., et al.** Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol.* 2003, Vol. 84, 7, p. 1751-1759.
127. **Xu Z., Choi J., Lu W., et al.** Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 2003, Vol. 77, 2, p. 1578-1583.
128. **Yukse K., Chen W.L., Chien D., et al.** Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein. *J Virol.* 2009, Vol. 83, 2, p. 612-621.

129. **Ratinier M., Boulant S., Crussard S., et al.** Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins. *Virus Res.* 2009, Vol. 139, 1, p. 106-110.
130. **Ma H.C., Lin T.W., Li H., et al.** Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *J Biomed Sci.* 2008, Vol. 15, 4, p. 417-425.
131. **Tsao M.L., Chao C.H., et Yeh C.T.** Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubuline cytoskeleton organization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, Vol. 348, 1, p. 271-277.
132. **Lohmann V., Körner F., Koch J., et al.** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999, Vol. 285, 5424, p. 110-113.
133. **Blight K.J., Kolykhalov A.A., et Rice C.M.** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science.* 2000, Vol. 290, 5498, p. 1972-1974.
134. **Vassilaki N., Friebe P., Meuleman P., et al.** Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol.* 2008, Vol. 82, 23, p. 11503-11515.
135. **Wolf M., Dimitrova M., Baumert T.F., et al.** The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res.* 2008, Vol. 36, 9, p. 3054-3064.
136. **Basu A., Steele R., Ray R., et al.** Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2004, Vol. 85, 8, p. 2299-2306.
137. **Abbas T., et Dutta A.** p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009, Vol. 9, 6, p. 400-414.
138. **Wu W.B., Shao S.W., Zhao L.J., et al.** Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology.* 2007, Vol. 50, 5, p. 341-346.
139. **Fiorucci M., Boulant S., Fournillier A., et al.** Expression of the alternative reading frame protein of hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol.* 2007, Vol. 88, 4, p. 1149-1162.

140. **Huang Y.P., Cheng J., Zhang S.L., et al.** Screening of hepatocyte proteins binding to F protein of hepatitis C virus by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol.* 2005, Vol. 11, 36, p. 5659-5665.
141. **Dou J., Liu P., Wang J., et al.** Effect of hepatitis C virus core shadow protein expressed in human hepatoma cell line on human gene expression profiles. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006, Vol. 21, 12, p. 1794-1800.
142. **Gao D.Y., Zhang X.X., Hou G., et al.** Assessment of specific antibodies to F protein in serum samples from chinese hepatitis C patients treated with interferon plus ribavirin. *J Clin Microbiol.* 2008, Vol. 46, 11, p. 3746-3751.
143. **Morice Y., Ratnier M., Miladi A., et al.** Seroconversion to hepatitis C virus alternate reading frame protein during acute infection. *Hepatology.* 2009, Vol. 49, 5, p. 1449-1459.
144. **Simmonds P., Tuplin A., et Evans D.J.** Detection of genome-scale ordered RNA structure in genomes of positive-stranded RNA viruses: implications for virus evolution and host persistence. *RNA.* 2004, Vol. 10, 9, p. 1337-1351.
145. **McMullan L.K., Grakoui A., Evans M.J., et al.** Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, Vol. 104, 8, p. 2879-2884.
146. **Arias, A.M.** Drosophila melanogaster and the development of biology in the 20th century. *Methods Mol Biol.* 2008, Vol. 420, 1, p. 1-25.
147. **Silverman G.A., Luke C.J., Bhatia S.R., et al.** Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatr Res.* 2009, Vol. 65, 1, p. 10-18.
148. **Streisinger G., Walker C., Dower N., et al.** Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* 1981, Vol. 291, 5813, p. 293-296.
149. **Walker C., et Streisinger G.** Induction of mutations by gamma-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos. *Genetics.* 1983, Vol. 103, 1, p. 125-136.
150. **Grunwald D.J., et Streisinger G.** Induction of mutations in the zebrafish with ultraviolet light. *Genet Res.* 1992, Vol. 59, 2, p. 93-101.

151. **Grunwald D.J., et Streisinger G.** Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet Res.* 1992, Vol. 59, 2, p. 103-116.
152. **Stuart G.W., McMurray J.V., et Westerfield M.** Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development.* 1988, Vol. 103, 2, p. 403-412.
153. **Streisinger G., Singer F., Walker C., et al.** Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics.* 1986, Vol. 112, 2, p. 311-319.
154. **Lieschke G.J., et Currie P.D.** Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007, Vol. 8, 5, p. 353-367.
155. **Zaret, K.S.** Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet.* 2002, Vol. 3, 7, p. 499-512.
156. **Chu J., et Sadler K.C.** New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology.* 2009, Vol. 50, 5, p. 1656-1663.
157. **Her G.M., Chiang C.C., Chen W.Y., et al.** In vivo studies of liver-type fatty acid binding protein gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS Lett.* 2003, Vol. 538, 1, p. 125-133.
158. **Her G.M., Yeh Y.H., et Wu J.L.** 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. *Dev Dyn.* 2003, Vol. 227, 3, p. 347-356.
159. **Dong P.D., Munson C.A., Norton W., et al.** Fgf10 regulates hepatopancreatic ductal system patterning and differentiation. *Nat Genet.* 2007, Vol. 39, 3, p. 397-402.
160. **Hawkins W.E., Overstreet R.M., Fournie J.W., et al.** Development of aquarium fish models for environmental carcinogenesis: tumor induction in seven species. *J Appl Toxicol.* 1985, Vol. 5, 4, p. 261-264.
161. **Goessling W., North T.E., et Zon L.I.** New waves of discovery: modeling cancer in zebrafish. *J Clin Oncol.* 2007, Vol. 25, 17, p. 2473-2479.
162. **Amatruda J.F., Shepard J.L., Stern H.M., et al.** Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell.* 2002, Vol. 1, 3, p. 229-231.

163. **Stern H.M., et Zon L.I.** Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer*. 2003, Vol. 3, 7, p. 533-539.
164. **Lam S.H., Wu Y.L., Vega V.B., et al.** Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotechnol*. 2006, Vol. 24, 1, p. 73-75.
165. **Lam S.H., et Gong Z.** Modeling liver cancer using zebrafish: a comparative oncogenomics approach. *Cell Cycle*. 2006, Vol. 5, 6, p. 573-577.
166. **Hinton D.E., et Couch J.A.** Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. [auteur du livre] T. Braunbeck, D.E. Hinton et B. Streit. *Fish Ecotoxicology*. Basel : Birkhäuser Verlag, 1998, p. 141-164.
167. **Lorent K., Yeo S.Y., Oda T., et al.** Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development*. 2004, Vol. 131, 22, p. 5753-5766.
168. **Sadler K.C., Krahn K.N., Gaur N.A., et al.** Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, *uhrfl*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, Vol. 104, 5, p. 1570-1575.
169. **Inoue K., Yamashita S., Hata J., et al.** Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differ Dev*. 1990, Vol. 29, 2, p. 123-128.
170. **Zelenin A.V., Alimov A.A., Barmintzev V.A., et al.** The delivery of foreign genes into fertilized fish eggs using high-velocity microprojectiles. *FEBS Lett*. 1991, Vol. 287, 1, p. 118-120.
171. **Hong Y., Winkler C., et Scharl M.** Production of medaka fish chimeras from a stable embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, Vol. 95, 7, p. 3679-3684.
172. **Etkin L.D., et Pearman B.** Distribution, expression and germ line transmission of exogenous DNA sequences following microinjection into *Xenopus laevis* eggs. *Development*. 1987, Vol. 99, 1, p. 15-23.
173. **Westerfield M., Wegner J., Jegalian B.G., et al.** Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish. *Genes Dev*. 1992, Vol. 6, 4, p. 591-598.

174. **Culp P., Nüsslein-Volhard C., et Hopkins N.** High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, Vol. 88, 18, p. 7953-7957.
175. **Thermes V., Grabher C., Ristoratore F., et al.** I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev.* 2002, Vol. 118, 1, p. 91-98.
176. **Grabher C., et Wittbrodt J.** Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka. *Genome Biol.* 2007, Vol. 8, Suppl. 1, p. S10.1-S10.7.
177. **Grabher C., Joly J.S., et Wittbrodt J.** Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol.* 2004, Vol. 77, p. 381-401.
178. **Koga A., Inagaki H., Bessho Y., et al.** Insertion of a novel transposable element in the tyrosinase gene is responsible for an albino mutation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Mol Gen Genet.* 1995, Vol. 249, 4, p. 400-405.
179. **Koga A., Suzuki M., Inagaki H., et al.** Transposable element in fish. *Nature.* 1996, Vol. 383, p. 30.
180. **Kawakami K., Koga A., Hori H., et al.** Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene.* 1998, Vol. 225, 1, p. 17-22.
181. **Kawakami K., et Shima A.** Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene.* 1999, Vol. 240, 1, p. 239-244.
182. **Kawakami K., Shima A., et Kawakami N.** Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, Vol. 97, 21, p. 11403-11408.
183. **Kawakami K., Takeda H., Kawakami N., et al.** A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell.* 2004, Vol. 7, 1, p. 133-144.
184. **Kawakami, K.** Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element. *Methods Cell Biol.* 2004, Vol. 77, p. 201-222.

185. **Kawakami, K.** Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* 2007, Vol. 8, Suppl 1:S7, p. S7.1-S7.10.
186. **Guidotti L.G., et Chisari F.V.** Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol.* 2006, Vol. 1, p. 23-61.
187. **Heydtmann M., et Adams D.H.** Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology.* 2009, Vol. 49, 2, p. 676-688.
188. **Roingard P., et Hourieux C.** Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat.* 2008, Vol. 15, 3, p. 157-164.
189. **GenScript USA Inc.** OptimumGene, Codon Optimization. *GenScript The Biology CRO.* [En ligne] 2009. [Citation : 14 Décembre 2009.]
http://www.genscript.com/codon_opt.html.
190. **Wang Y.H., Chen Y.H., Lu J.H., et al.** Epidermis-restricted expression of zebrafish cytokeratin II is controlled by a -141/+85 minimal promoter, and cassette -141/-111 is essential for driving the tissue specificity. *Differentiation.* 2006, Vol. 74, 4, p. 186-194.
191. **Hsia C.C., Nakashima Y., et Tabor E.** Deletion mutants of the hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, Vol. 241, 3, p. 726-729.
192. **Baron U., Gossen M., et Bujard H.** Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* 1997, Vol. 25, 14, p. 2723-2729.
193. **Gossen M., et Bujard H.** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, Vol. 89, 12, p. 5547-5551.
194. **Zuker, M.** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003, Vol. 31, 13, p. 3406-3415.
195. **Sharp P.M., et Li W.H.** The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 1987, Vol. 15, 3, p. 1281-1295.

196. **Kondrychyn I., Garcia-Lecea M., Emelyanov A., et al.** Genome-wide analysis of Tol2 transposon reintegration in zebrafish. *BMC Genomics*. 2009, Vol. 10, 418, p. 13 pages.
197. **Piodi A., Chouteau P., Lerat H., et al.** Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype Core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology*. 2008, Vol. 48, 1, p. 16-27.
198. **Kim C.M., Koike K., Saito I., et al.** HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*. 1991, Vol. 351, 6324, p. 317-320.
199. **Rekha R.D., Amali A.A., Her G.M., et al.** Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology*. 2008, Vol. 243, 1-2, p. 11-22.
200. **Lamarche, S.** *Étude des propriétés immunogènes de la protéine F du virus de l'hépatite C chez la souris*. Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal. Montréal : s.n., 2007. 124 pages. Mémoire de maîtrise.

