



HAL
open science

Recrutement de CD2AP par les complexes de réplication du virus de l'hépatite C

Esther Martin de Fourchambault

► **To cite this version:**

Esther Martin de Fourchambault. Recrutement de CD2AP par les complexes de réplication du virus de l'hépatite C. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02370341

HAL Id: dumas-02370341

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02370341>

Submitted on 19 Nov 2019

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

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

Année universitaire : 2018 – 2019

Spécialité : BMC

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Spécialisation (et option éventuelle) :

Parcours CENoP

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Recrutement de CD2AP par les complexes de réplication du virus de l'hépatite C.

Par : Esther MARTIN de FOURCHAMBAULT



Tiré de Romero-Brey *et al.* 2012

Soutenu à Rennes le 11/06/2019

Devant le jury composé de :

- Jean-Marc Fraslin
- Stéphane Deschamps
- Sophie Blat

Remerciements

En préambule, je veux remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai échangé durant ce stage et qui m'ont aidé dans les expérimentations et la rédaction de ce mémoire.

Je tiens d'abord à remercier Jean Dubuisson pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je veux tout particulièrement remercier Yves Rouillé pour son encadrement tout au long de ces cinq mois. Sa force tranquille, sa patience, sa bienveillance, son engagement et son envie de transmettre ses connaissances m'ont permis de m'épanouir dans mon travail. Merci également à Nathalie Callens, pédagogue hors-pair, de m'avoir encadrée lors de la partie « biologie moléculaire » de mes expériences.

Merci aussi à Camille Ouzilou, Antoine Vermeersch et Edwin Merabet pour la meilleure colocation que cette ville ait connu, pour leur présence au quotidien et pour avoir été une vraie famille de substitution.

Je remercie chaleureusement chacun des membres de l'équipe pour leur accueil, leur sympathie, leurs conseils, et les nombreux gâteaux qu'ils ne manquaient pas d'amener à la moindre occasion. J'aimerais remercier spécialement les doctorants du laboratoire, qui m'ont aidée, soutenue, et ont rattrapé certaines maladresses.

Je remercie enfin l'équipe pédagogique d'Agrocampus Ouest et du master BMC de Rennes pour leur formation théorique et les opportunités qu'ils m'ont permis d'avoir. Merci particulièrement à Jean-Marc Fraslin de m'avoir suivi durant ma dernière année en tant que tuteur.

Résumé

Hepatitis C is a viral-induced liver disease that can evolve two ways: an acute form (generally asymptomatic) and a chronic form, more severe, that can cause liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma after a couple of decades. Today, about 71 million people worldwide are chronically infected by the hepatitis C virus (HCV), the virus responsible of this disease. Since 2014, an effective treatment based on Direct Acting Antivirals (AAD) is available, but no vaccine has been discovered yet. The disease is mainly transmitted by blood or sexual intercourse. HCV is a small, enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus, belonging to the *Flaviviridae* family. Its genome contains a single open reading frame and two untranslated regions at its 5' and 3' ends, that are required for its replication. The open reading frame is translated into a single polyprotein precursor in infected cells, that is processed by viral and cellular proteases into ten functional proteins, including three structural proteins (E1, E2, core) and seven non-structural proteins (p7, NS2-5B). HCV proteins rearrange endomembranes to replicate viral RNA into so-called membranous webs, forming replication complexes.

Preliminary results of the host team based on a proximity biotinylation screen suggested that CD2AP, a cellular protein, is recruited in HCV RNA replication complexes. CD2AP is a soluble protein, the main function of which is to act as an adapter between actin and membrane proteins. It is composed of (from N-terminal to C-terminal) three SH3 domains, a proline-rich domain, an actin-binding motif and a coiled-coil domain (allowing it to dimerize). According to the literature, CD2AP also interacts with the viral non-structural protein NS5A.

The aim of this project was to understand how CD2AP is recruited in those complexes by identifying the protein domains involved in its recruitment. First, we generated truncated mutants of CD2AP corresponding to half of the protein (N-terminal half : SH3-1/2/3 ; C-terminal half : proline-rich domain/actin binding site/coiled-coil) marked with a HA tag either at the N- or the C-terminus. These constructions were then inserted into plasmids and transfected in Huh-7 cells. The expression of the construct corresponding to the N-terminal half turned out to be very reduced. We reasoned that the absence of dimerization renders the protein unstable. In keeping with this hypothesis, the fusion of the coiled-coil domain to the C-terminus of the construct rose the expression of the protein up to a level similar to that of the other constructs.

All the constructs were expressed in Huh-7 cells containing a subgenomic replicon of HCV (minimal replication unit of the viral genome) to assess their potential recruitment in replication complexes. Cells were immunolabelled with anti-HA (showing CD2AP) and anti-NS5A (showing HCV replication complexes) antibodies. It occurred that the N-terminal half, either alone or fused to the coiled-coil domain, was still recruited, while the other half of the protein was not. Therefore CD2AP recruitment in HCV replication complexes is due to one or several SH3 domains. Then, we generated new truncated mutants,

deleted of one or two SH3 domains and checked their recruitment. The recruitment of CD2AP was quantified using two different techniques. First, double-labelled cells were observed with a fluorescence microscope and the cells where colocalization was observed were counted for each CD2AP construction. Second, the colocalisation of both proteins in confocal images was quantified using the Costes method to get Pearson coefficients.. The results of these analyses revealed that CD2AP recruitment is mainly due to SH3-1 and SH3-2 domains.

Afterwards, we looked for potential SH3 ligand motifs in the sequence of the viral genome to identify if a viral protein and which domain of this protein interacts with CD2AP and is responsible for its recruitment in replication complexes. The literature mentions two possible versions of a six residues motif, specific of CD2AP SH3 domains : PXPXPR or PXXPPR. It occurred that such a motif can be found only once in HCV replicon's sequence, upstream of NS5A domain III. The viral sequence matches both versions of the motif. We generated a new subgenomic replicon with a mutated NS5A (in order to remove this motif). The genome of this replicon was transcribed in vitro and introduced into naïve Huh-7 cells by electroporation. Then, the intracellular localization of endogenous CD2AP was analyzed by immunofluorescence. We observed that CD2AP was no longer recruited in HCV replication complexes in cells replicating the mutated replicon. These results suggest that NS5A and CD2AP directly interact together, and this interaction is probably responsible of CD2AP recruitment.

Further experimentations would be required to confirm this hypothesis, such as co-immunoprecipitations of wild-type and mutated CD2AP and NS5A. In the future, it would be interesting to study the impact of CD2AP truncation on HCV infection, as some mutants could potentially act as dominant negative constructs.

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ARN : Acide Ribo-Nucléique

CD2AP : CD2-Associated Protein

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

dNTPs : mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

EDTA : ÉthylèneDiamineTétraAcétique

FAPP2 : Four-Phosphate Adaptor Protein 2)

HCV : Hepatitis C Virus (Virus de l'hépatite C)

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HRP : Horse Radish Peroxidase

IAA : Alcool IsoAmylique

JFH1 : Japanese Fulminant Hepatitis type 1, souche clinique de HCV de génotype 2a, utilisable en culture cellulaire sans adaptation préalable.

MEM : Minimum Essential Medium

NS5A : Non-Structural protein 5A

OSBP : OxySterol-Binding Protein

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFA : ParaFormAldéhyde

PM : Poids Moléculaire

RE : Réticulum Endoplasmique

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SH3 : SRC-Homology domain 3

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TE buffer: Tampon Tris + EDTA

WT : Wild Type

Table des matières

Introduction.	1
Matériel et Méthodes	4
Résultats	8
Répartition intracellulaire de CD2AP	9
Génération de mutants de tronctions de CD2AP	9
Recrutement des constructions par les complexes de réplication.....	9
Quantification de la colocalisation de CD2AP et NS5A.....	12
Etude du motif de NS5A responsable du recrutement de CD2AP.....	14
Discussion.....	16

Introduction

L'hépatite C est une maladie d'origine virale touchant le foie et pouvant évoluer de deux façons différentes : une forme aiguë (15 à 45% des cas), le plus souvent asymptomatique et éliminée spontanément par le système immunitaire en quelques semaines, et une forme chronique, plus grave (55 à 85% des cas), pouvant aboutir après quelques décennies à une insuffisance hépatique causée par une cirrhose et/ou un hépatocarcinome. Aujourd'hui, environ 71 millions de personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite C dans le monde, parmi lesquelles 80% (soit 57 millions de personnes) l'ignorent faute de dépistage, et 399 000 personnes meurent tous les ans des suites de l'infection chronique. La maladie se transmet principalement par le sang (partage de seringues ou réutilisation de matériel médical mal stérilisé, transfusion de sang contaminé) et plus rarement lors de rapports sexuels ou de la mère au nourrisson à la naissance. Bien que le monde dans sa globalité soit touché par l'hépatite C, on observe dans certaines régions une prévalence plus importante comme en Egypte (environ 4% de la population), (Egypt Health Issue Survey, 2015), ou plus généralement au sud-est de la méditerranée et en Somalie (WHO Global Hepatitis Report, 2017). Il existe aujourd'hui un traitement basé sur des antiviraux à action directe (sofosbuvir, daclatasvir, ledipasvir), efficace dans 95% des cas, mais pas de vaccin.

Le virus de l'hépatite C (HCV), membre de la famille des *Flaviviridae*, est responsable de la maladie du même nom. C'est un petit virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive qui infecte les hépatocytes humains. L'ARN viral, d'une longueur d'environ 9,6 kb, contient un cadre de lecture unique. Il est traduit en une polyprotéine, précurseur de 10 protéines fonctionnelles : trois protéines structurales (2 protéines d'enveloppe, E1 et E2, et une protéine de capsid, Core), et sept protéines non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). La protéine p7 est nécessaire à la morphogénèse du virus dans la cellule-hôte, NS2 est une protéase, NS3 est composée d'un domaine protéase et d'un domaine hélicase, NS4A est un cofacteur de NS3, NS4B et NS5A sont nécessaires à la réplication de l'ARN viral et NS5B est une ARN-polymérase ARN-dépendante (Moradpour *et al.* 2007, figure 1). L'infection par le VHC induit des désordres métaboliques, notamment au niveau du métabolisme des lipides (Negro 2010, Miyoshi *et al.* 2011). Le virus perturbe également les membranes intracellulaires. En effet, la protéine virale NS4B induit la formation de « *membranous web* », en détournant la membrane du RE (Egger *et al.* 2002). C'est au sein de ces altérations membranaires que se forment les complexes de réplication de l'ARN viral (El-Hage et Luo 2003).

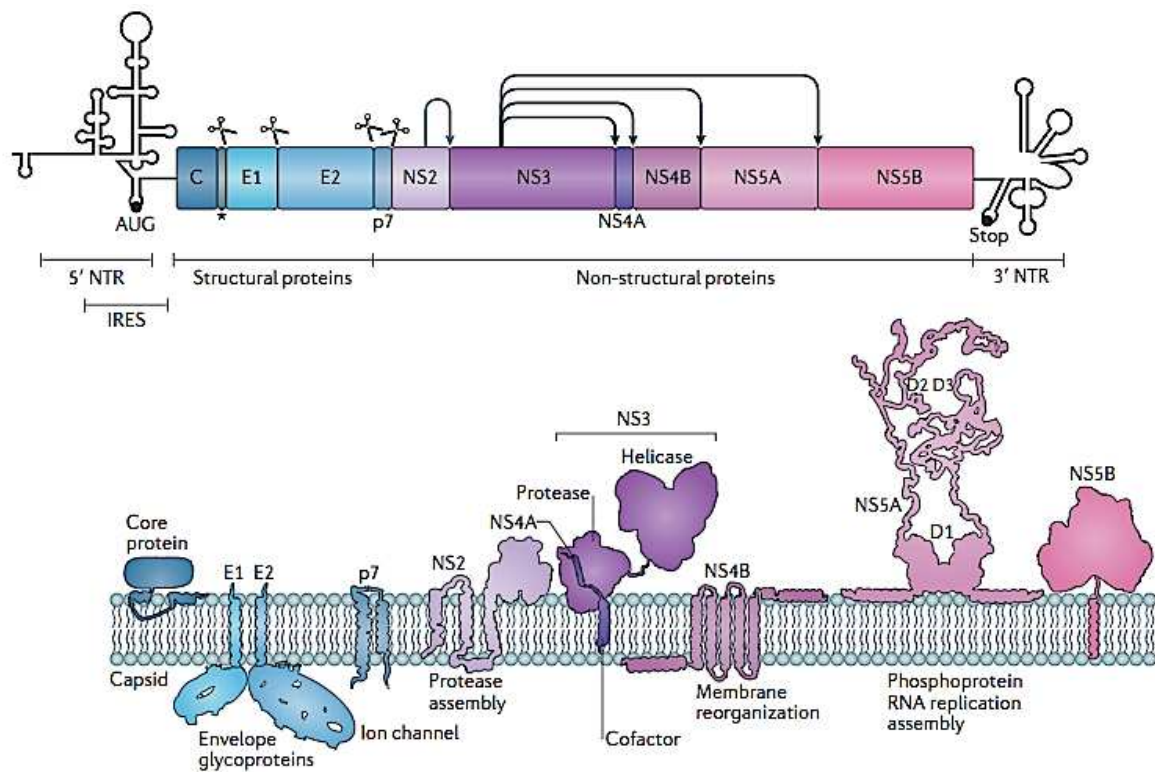


Figure 1. Organisation moléculaire du virus de l'hépatite C. Schéma du génome et détail des protéines structurales et non structurales du HCV et de leurs fonctions. Les sites de coupure des protéases cellulaires sont indiqués par des ciseaux et ceux des protéases virales par des flèches partant de la protéase vers son site de coupure. (tiré de Neufeld *et al.* 2018).

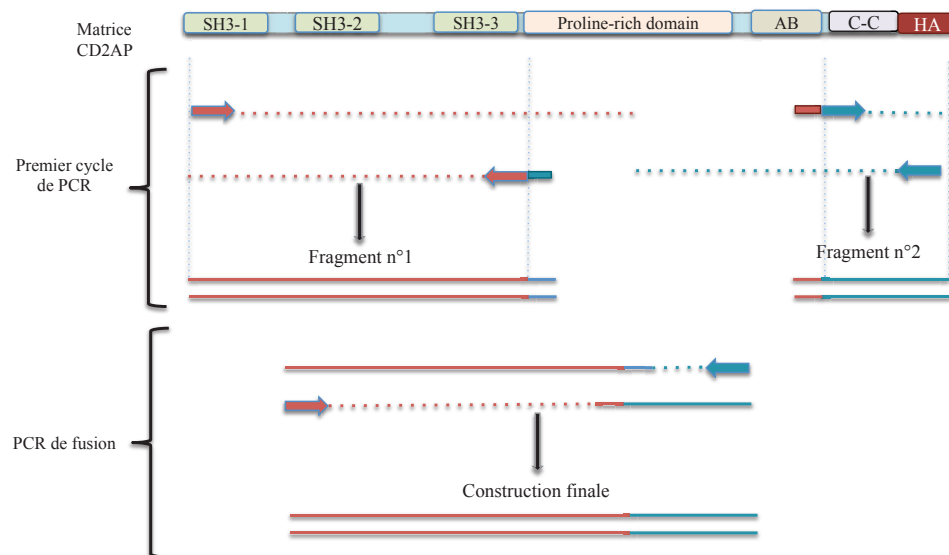


Figure 2. Principe des PCR de fusion. Dans cet exemple, les séquences codantes de la moitié N-terminale et de l'extrémité C-terminale de la protéine sont amplifiées séparément pour donner les fragments 1 et 2, puis sont fusionnées grâce aux séquences chevauchantes des amorces internes dans un cycle de PCR de fusion. On obtient finalement la séquence codante d'une protéine constituée de la moitié N-terminale de CD2AP, à laquelle on a accolé le domaine coiled-coil et le tag HA en C-terminal.

Le cycle viral est composé de trois étapes : l'entrée du virus dans la cellule-hôte, la réplication du génome viral et la morphogénèse et sécrétion de virions néoformés. Le génome viral ne codant que pour un nombre très limité de protéines, l'interaction avec de nombreuses protéines de la cellule-hôte est nécessaire à la réalisation de ces trois étapes. L'équipe d'accueil étudie les partenaires cellulaires de la réplication virale, en identifiant les protéines cellulaires interagissant avec les complexes de réplication de l'ARN du virus. Dans ce contexte, un crible protéomique basé sur de la biotinylation de proximité a été réalisé pour identifier des protéines cellulaires d'intérêt, parmi lesquelles est ressortie la protéine CD2AP (*CD2-Associated Protein*).

CD2AP est une protéine cytosolique se comportant notamment comme un adaptateur entre des protéines membranaires et l'actine (Kirsch *et al.* 1999). C'est une protéine de 639 résidus d'acides aminés composée de trois domaines SH3 (*SRC-Homology domain 3*, sites d'interaction avec d'autres protéines), d'un domaine riche en proline (domaine d'interaction avec les domaines SH3 d'autres protéines), d'un domaine peu structuré contenant un site d'interaction avec l'actine et d'un domaine *coiled-coil*, permettant sa dimérisation. Un motif d'interaction spécifique des domaines SH3-1 et SH3-2 de CD2AP a été identifié. Il s'agit d'une séquence consensus de six acides aminés, riche en prolines, qui correspondrait au motif PXPXPR (ou PXAXPR, la substitution de la deuxième proline par une alanine n'a que peu de conséquences) (Rouka *et al.* 2015) ou bien PXXPPR (Igloi *et al.* 2015).

Des résultats préliminaires ont suggéré que CD2AP était recrutée par les complexes de réplication du HCV, et il est déjà connu que CD2AP interagit avec la protéine virale NS5A (Zhang *et al.* 2018), mais il n'a jamais été démontré précisément, à notre connaissance, quel(s) motif(s) était(ent) impliqué(s) dans cette interaction.

L'objectif de ce projet est d'étudier le ou les domaine(s) protéique(s) impliqué(s) dans le recrutement de CD2AP par les complexes de réplication du HCV. Pour ce faire, une série de constructions tronquées de CD2AP ont été réalisées puis transfectées dans des cellules Huh-7 répliquant l'ARN viral. Le recrutement de ces constructions par les complexes de réplication a été étudié et quantifié par microscopie à immunofluorescence et microscopie confocale. Nous avons par ailleurs identifié un site potentiel d'interaction de NS5A avec CD2AP, un réplicon de souche JFH1 muté de manière à altérer ce site d'interaction a été généré et l'impact sur le recrutement de CD2AP a été évalué.

Matériel et Méthodes

PCR

L'ADN polymérase utilisée pour toutes les PCR est la *Q5 high fidelity DNA polymerase*, sous forme de mix 2X contenant dNTPs, tampon et enzyme. A 200 ng de matrice sont ajoutées les amorces à une concentration finale de 0,5 μM dans un volume total de 50 μL . Une dénaturation initiale est réalisée à 98°C pendant 30 secondes, puis 25 cycles s'enchaînent avec les paramètres suivants : 98°C pendant 15 sec, 56°C pendant 15 sec, 72°C pendant 1 min 30. Enfin, l'extension finale se fait à 72°C pendant deux minutes. Pour certaines constructions, une deuxième PCR est réalisée pour fusionner les deux fragments amplifiés séparément lors d'une première amplification classique. La fusion est rendue possible grâce à la présence d'une zone chevauchante dans les deux fragments (figure 2).

Les produits de PCR sont purifiés sur colonnes avec le kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel). Après migration dans un gel d'agarose à 0,8%, la bande d'intérêt est découpée et chauffée à 50°C dans 500 μL de solution NT1 pendant 10 minutes. Une fois l'agarose fondu, la solution est déposée sur colonne. L'ADN se lie à la membrane de silice de la colonne et les contaminants sont éliminés par lavage avec un tampon (NT3). Enfin, l'ADN est élué avec 30 μL de tampon Tris 10 mM (pH=8,5).

Digestion enzymatique

Les produits de PCR sont insérés dans des vecteurs d'expression plasmidiques via des sites qui sont reconnus spécifiquement par des enzymes de restriction (qui diffèrent selon les clonages). Dans un volume total de 100 μL , 3 μL de chaque enzyme sont ajoutés à 10 μL de tampon CutSmart et 5 μg de plasmide ou 30 μL d'insert (produit de PCR purifié). Le tout est ensuite incubé à 37°C pendant 2 h, puis purifié.

Construction, criblage et purification des vecteurs d'expression

Après purification, les quantités relatives d'insert et de vecteur sont estimées en gel d'agarose. L'insert et le vecteur sont incubés dans des proportions molaires de 3 pour 1 avec 1 μL de T4 DNA ligase dans un volume total de 10 μL de tampon de ligation pendant 1 h à température ambiante. 5 μL de produit de ligation sont ensuite incubés 20 min sur glace avec 50 μL de bactéries TOP TEN ou SURE2 (*E. Coli*) compétentes. Le mélange est ensuite placé pendant 45 sec à 42°C afin de créer un choc thermique et causer la transformation des bactéries. Les bactéries transformées sont étalées sur boîtes de gélose contenant 100 $\mu\text{g/mL}$

d'ampicilline et cultivées à 37°C pendant une nuit. Par la suite, une solution de plasmide est réalisée à partir d'une miniculture liquide. Pour cela, des colonies isolées sont prélevées et mises en culture dans 3 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline pendant une nuit à 37°C sous agitation. Les plasmides sont extraits à l'aide d'un kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey Nagel). Les cultures liquides sont centrifugées, le surnageant éliminé et le culot de bactéries est resuspendu. Une lyse alcaline est réalisée pendant 5 min à température ambiante, puis le pH de la solution est neutralisé. Le lysat est alors déposé sur colonne et filtré. La logique de purification est la même qu'avec le kit *NucleoSpin gel and PCR Clean-Up*. Le chromosome bactérien n'est pas retenu sur la colonne car il reste lié aux protéines qui sont précipitées et éliminées avant le dépôt du lysat sur la colonne. A partir du plasmide purifié, une digestion est réalisée avec des enzymes de restriction appropriées, afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide. Après vérification par séquençage, une préparation plus importante de plasmide est réalisée (midi-prep) à partir de 150 mL de culture liquide en utilisant le kit *NucleoBond Xtra Midi Plus* (Macherey Nagel).

Transcription in vitro de l'ARN viral

La séquence nucléotidique du réplicon (forme auto-répliquative, non infectieuse du virus) est contenue sous forme de cDNA dans un plasmide bactérien, depuis lequel il peut être transcrit in vitro à partir d'un promoteur T7. L'ADN plasmidique purifié est d'abord incubé à 4°C en présence de CsCl 0,25 M, puis soumis à trois extractions successives par une solution de 4% d'IAA (Alcool IsoAmylique) dans du chloroforme pour éliminer les protéines potentiellement liées à l'ADN. Après avoir ajouté 1/10 de solution d'acétate de sodium à 3M (pH 5,2), l'ADN est précipité avec un volume et demi d'éthanol absolu. Le culot est rincé avec une solution d'éthanol à 70%, puis l'ADN solubilisé dans du tampon TE (Tris HCl 10mM + EDTA 1mM, pH=8,0). Le plasmide est ensuite linéarisé par l'enzyme *XbaI*, puis les protéines sont de nouveau extraites, l'ADN est précipité à l'éthanol et le culot est solubilisé dans du TE de manière à obtenir une solution de concentration égale d'ADN à 1 µg/µL. L'ADN est ensuite digéré par la *Mung Bean Nuclease* (New England Biolabs). A 50 µg d'ADN sont ajoutés 35 µL d'eau et 10 µL de tampon 10X *Mung Bean Nuclease*. Le mix est préchauffé à 30°C pendant 15 min avant d'ajouter 5 µL d'enzyme. Le mix est incubé à 30°C pendant 10 min, la nucléase est inactivée par addition d'EDTA, puis les protéines sont de nouveau extraites, l'ADN précipité et re-solubilisé dans du tampon TE. De cette manière, la matrice d'ADN a été préparée afin de pouvoir synthétiser au nucléotide près l'ARN du réplicon.

Enfin, l'ADN a été transcrit en ARN en utilisant le kit *MEGAscript : High Yield transcription Kit* (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific). Sur glace et dans un volume total de 20 μL , 2 μL de chaque solution de nucléotides, d'enzyme et de tampon 10X sont ajoutés à 2 μL de la solution d'ADN préparée précédemment. Le mix est incubé à 37°C pendant 4 h, puis 1 μL de TURBO DNase est ajoutée. Le mix est de nouveau incubé à 37°C pendant 15 min pour dégrader la matrice d'ADN. L'ARN est précipité au chlorure de lithium, centrifugé, puis le surnageant est éliminé et le culot est rincé par une solution d'éthanol à 70%. L'ARN est solubilisé dans le tampon fourni dans le kit et dosé avec un spectrophotomètre.

Culture Cellulaire

Les cellules Huh-7 (dérivées d'un hépatocarcinome humain) naïves ou répliquant le génome viral (réplicon issu de la souche JFH1 de HCV) sont mises en culture dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contenant du glutaMAX (L-alanyl-L-glutamine, 4 mM) et 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), désigné comme milieu complet. Pour les cellules répliquant l'ARN viral, 50 mg/mL de généticine sont ajoutés au milieu de culture afin d'éliminer les cellules ne contenant pas le réplicon. Les cellules sont cultivées à l'étuve à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Transfection

Les cellules sont transfectées à l'aide de l'agent de transfection *TransIT®-LTI* (Mirus) avec un ratio de 0,5 μg d'ADN pour 2 μL d'agent de transfection dans un volume final de 100 μL de DMEM sans serum contenant 25 mM de tampon HEPES pH 7,5. L'agent de transfection est incubé 5 min à température ambiante dans le milieu puis le mix est ajouté à l'ADN plasmidique. Après 20 min d'incubation, le mix final est ajouté sur les cellules dans un milieu complet.

Electroporation

Les cellules sont cultivées jusqu'à obtenir une population de 4 millions de cellules. Elles sont alors trypsinées et reprises dans 10 mL de milieu Opti-MEM (*Minimum Essential Medium*). La suspension de cellules est alors centrifugée, puis le culot est resuspendu dans du milieu Opti-MEM et recentrifugé (opération répétée deux fois). Le culot est enfin repris dans 0,8 mL de milieu Opti-MEM, puis 0,4 mL de la suspension est transféré dans une cuve à électroporation de 2 mm en présence de l'ARN du réplicon. Les cellules sont électroporées à 150 volts puis la suspension de cellules est cultivée de façon classique dans du milieu complet auquel on ajoute 50 mg/mL de généticine, pour sélectionner les cellules contenant le réplicon.

Western Blot

Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits puis transfectées avec le plasmide d'intérêt (1 µg par puits). 16 h après transfection, les cellules sont lysées dans un tampon de lyse (50 mM TrisCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton X-100, 0,1% SDS et des inhibiteurs de protéases) et les surnageants sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les lysats cellulaires sont mélangés au tampon de charge Laemmli contenant du DTT (DiThioThréitol, agent réducteur) puis chauffés 10 min à 70°C pour dénaturer les protéines.

Les protéines sont séparées par électrophorèse dans un gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), composé d'un gel de concentration à 5% d'acrylamide (ratio acrylamide/bisacrylamide 37,5/1) et d'un gel de séparation à 8% d'acrylamide. La migration est effectuée à 70 volts pendant 15 min puis 200 volts pendant 1h. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h30 à 100 volts. Les sites d'interaction non-spécifiques de la membrane sont bloqués par une solution de 5% de lait écrémé, 0,1% de NP40 dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. Les constructions transfectées sont immunodétectées grâce à un anticorps monoclonal primaire de rat (anti-HA, clone 3F10) dilué au 1/1000 dans la solution de blocage, par incubation d'une nuit à 4°C sous agitation. La membrane est lavée six fois par un tampon de lavage (0,1% NP40 dans PBS), dont trois lavages longs de 5 min chacun. La membrane est ensuite incubée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de rat couplé à la HRP (*Horse Radish Peroxidase*) au 1/10 000, pendant 1 h à température ambiante sous agitation. La membrane est à nouveau lavée six fois. La révélation est réalisée à l'aide du substrat chimioluminescent *SuperSignal West Pico PLUS* (Thermo Scientific) et le signal lumineux émis est enregistré avec l'appareil Las3000 (Fuji).

Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées sur lamelles en verre de 12 mm de diamètre dans des plaques 24 puits. Les cellules sont rincées avec du PBS puis fixées avec 1 mL de solution de 3% de PFA (ParaFormaldéhyde) dans du PBS pendant 20 min à température ambiante. Elles sont perméabilisées avec une solution de 0,1% de Triton X-100 dans du PBS pendant 4 min. Les sites d'interaction non-spécifiques sont ensuite bloqués par 300 µL de solution à 5% de sérum de chèvre dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées dans 40 µL d'anticorps primaires (anticorps et dilutions variant selon les expériences) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont rincées trois fois pendant 5 min avec du PBS, puis incubées dans l'obscurité dans 40 µL d'anticorps secondaires (couplés chacun à un fluorochrome différent et

reconnaissant spécifiquement les anticorps primaires utilisés), auxquels est ajouté du 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 0,25 µg/ml), pour marquer les noyaux des cellules. De nouveau, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS, puis les lamelles sont montées sur lame dans 7 µL de milieu de montage contenant du mowiol, après un rinçage final rapide dans l'eau milliQ. Elles sont ensuite analysées en utilisant un microscope à fluorescence Axiophot 2 (Zeiss) équipé d'une caméra coolsnap ES (Photometrix) pilotée par le logiciel Metavue. Les colocalisations sont analysées par microscopie confocale, réalisée avec un microscope confocal LSM880 (Zeiss) avec un objectif à immersion à huile de grossissement 63x. Les images de chaque canal fluorescent sont enregistrées indépendamment puis superposées.

Quantification de la colocalisation

Le recrutement des différentes constructions de CD2AP dans les complexes de réplication a été quantifié par comptage au microscope à immunofluorescence. Avant le montage des cellules dans le mowiol, les échantillons sont répartis aléatoirement de manière à ce que l'opérateur ne sache pas quelle expérience il analyse et ne soit pas influencé dans ses comptages. L'identité des échantillons analysés n'est révélée qu'après la quantification. Les cellules doublement marquées pour la protéine virale NS5A (donc répliquant l'ARN viral) et pour le tag HA (donc transfectées avec un plasmide d'intérêt) sont comptées et, parmi elles, celles dans lesquelles on observait une colocalisation entre les deux marquages le sont également. A partir d'au moins deux points correspondants dans les deux canaux (les complexes de réplication se présentent sous forme de points en immunofluorescence), la cellule est considérée comme positive concernant le recrutement, ainsi les cas de colocalisation partielle ne sont pas traités séparément des autres. Un pourcentage de cellules où une colocalisation est observée parmi les cellules transfectées est ainsi calculé. La significativité des variations observées est analysée par ANOVA.

Pour certaines constructions, une analyse complémentaire a été réalisée. Des photos prises au microscope confocal de cellules transfectées puis doublement marquées pour NS5A et HA ont été analysées avec le plugin JACoP du logiciel ImageJ selon la méthode de Costes (Costes *et al.* 2004). Pour limiter le biais associé à l'expérimentateur, nous avons enregistré les images de 30 cellules transfectées choisies au hasard, quel que soit le niveau d'expression de la construction. Pour être sûr de ne pas choisir de cellules particulières, les 30 premières cellules observées ont été imagées. La quantification du recrutement des différentes constructions se base sur l'analyse des coefficients de Pearson, l'un des coefficients les plus souvent utilisés pour quantifier la colocalisation de deux protéines (Dunn *et al.* 2011), qui

quantifie la co-variance des deux signaux fluorescents. La significativité des variations observées est analysée par ANOVA.

Résultats

Le but de cette étude est d'étudier le recrutement de CD2AP par les complexes de réplication du HCV. Pour cela, nous avons cherché à déterminer les domaines de CD2AP et de NS5A nécessaires et suffisants à ce recrutement en générant une série de mutants de délétions dans CD2AP.

Localisation intracellulaire de CD2AP

Afin de confirmer les résultats du crible, nous avons dans un premier temps immunomarcqué des cellules Huh-7 naïves ou répliquant le génome viral avec des anticorps anti-CD2AP et anti-NS5A (figure 3A). On observe un changement de la distribution intracellulaire de CD2AP dans les cellules contenant le réplicon. La protéine endogène colocalise avec les complexes de réplication du HCV alors qu'elle est principalement répartie dans le cytoplasme et partiellement recrutée à la membrane de la cellule en l'absence de réplication virale. Les mêmes localisations de CD2AP sont observées dans les cellules transfectées avec les constructions n°1 et 2, qui correspondent à des constructions de la protéine de pleine longueur (figure 3B).

Génération de mutants de troncation de CD2AP

CD2AP est composée de trois types de domaines pouvant interagir avec d'autres protéines : les trois domaines SH3, le domaine riche en prolines et un site d'interaction avec l'actine. Dans un premier temps, des troncations correspondant à environ la moitié de la protéine ont été réalisées pour avoir une première approximation des domaines engagés dans le recrutement de CD2AP. Ces constructions ont été taguées en C-terminal ou en N-terminal avec le tag HA, afin de déterminer si le positionnement du tag influence l'expression ou le recrutement de la protéine. Aucune différence importante d'expression ou de recrutement n'a été constatée (figure 4), le choix a alors été fait de poursuivre avec des constructions taguées en C-terminal. Par ailleurs, les constructions correspondant à la moitié N-terminale étaient exprimées très faiblement (voir figure 4, les constructions HA-SH3 et SH3-HA). Nous avons émis l'hypothèse que la délétion du domaine *coiled-coil*, permettant la dimérisation de la protéine, diminuait drastiquement la stabilité de ces constructions. Pour cette raison, une construction correspondant à la moitié N-terminale fusionnée au domaine *coiled coil* a été réalisée. Conformément à notre hypothèse, cette construction s'est avérée être bien mieux

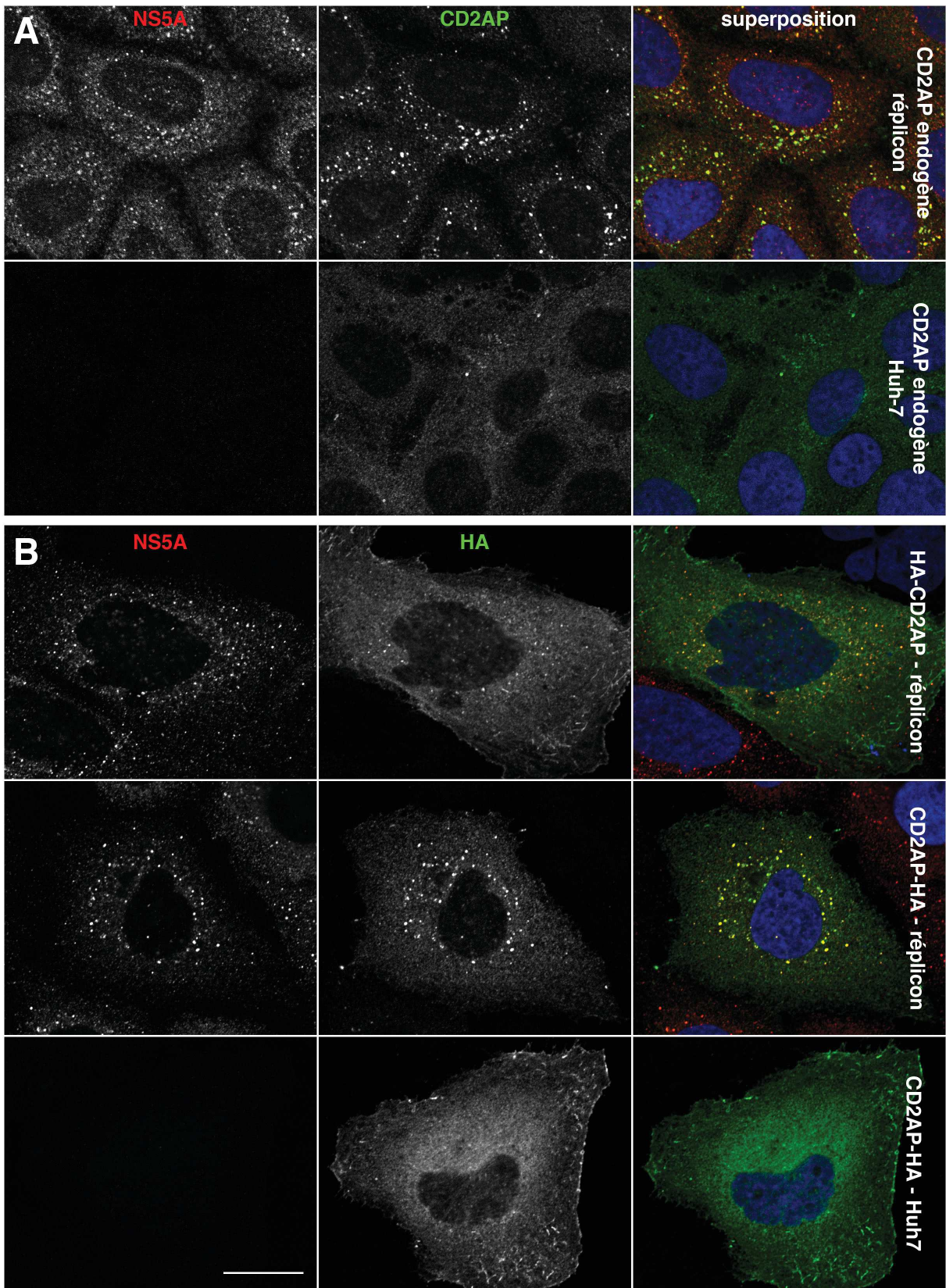


Figure 3. Localisation intracellulaire de CD2AP. (A) Des cellules Huh-7 naïves ou contenant le réplicon ont été immunomarquées avec des anticorps anti-CD2AP et anti-NS5A. (B) D'autres cellules ont été d'abord transfectées avec un plasmide codant CD2AP taguée en N-terminal ou C-terminal avant d'être immunomarquées avec des anticorps anti-NS5A et anti-HA. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les signaux fluorescents individuels sont montrés en noir et blanc pour améliorer leur visibilité et sont superposés dans les images de droite. Barre d'échelle : 20 μ m.

Tableau 1. Récapitulatif des constructions réalisées et de leur recrutement dans les complexes de réplication du HCV.

Nom et séquence (n°)	Structure	Recrutement
CD2AP WT		+++
1) HA-CD2AP		+++
2) CD2AP-HA		+++
3) HA-ProRich : 331-669		-
4) ProRich-HA : 331-669		-
5) HA-SH3 : 1-330		+++
6) SH3-HA : 1-330		+++
7) SH3-CC-HA : 1-330 + 577-639		+++
8) ΔSH3-1 : 60-669		+
9) ΔSH3-2 : 1-107 + 168-669		++
10) ΔSH3-3 : 1-268 + 331-669		+++
11) ΔSH3-1/2 : 168-669		-
12) ΔSH3-1/3 : 60-268 + 331-669		+
13) ΔSH3-2/3 : 1-59 + 331-669		+

exprimée (figure 4). Par conséquent, l'étude du recrutement de la moitié N-terminale de CD2AP a été menée avec cette construction (construction n°7, SH3-CC-HA). L'ensemble des constructions générées est recensé dans le tableau 1.

Recrutement des constructions par les complexes de réplication

D'après des expériences d'immunofluorescence analysées au microscope confocal (résultats non présentés faute de place), les constructions 3 et 4 ne sont pas recrutées par les complexes de réplication du HCV, tandis que les constructions 5, 6 et 7 le sont. Ceci indique que le(s) domaine(s) important(s) pour le recrutement de CD2AP se situe(nt) dans la moitié N-terminale de la protéine, qui contient les 3 domaines SH3. Des mutants de CD2AP, tronqués d'un ou deux domaines SH3, ont alors été générés afin de déterminer le rôle potentiel de chacun dans le recrutement de la protéine (tableau 1). Une première analyse qualitative a suggérée qu'aucun changement significatif n'est observé en délétant le troisième domaine SH3, tandis que la délétion d'un des deux premiers semble avoir un impact sur le recrutement, sans pour autant l'annuler totalement. En délétant simultanément les deux premiers domaines SH3, la protéine n'est plus recrutée.

Quantification de la colocalisation de CD2AP et NS5A

Ces résultats étant nuancés, la quantification du recrutement des différents mutants de CD2AP par les complexes de réplication du HCV s'est avérée nécessaire. Dans un premier temps, la quantification s'est opérée par comptage des cellules dans lesquelles le recrutement de CD2AP par les complexes de réplication viraux était observé (pour plus de détail, voir Matériel et Méthodes – Quantification de la colocalisation). On observe une diminution très significative (***) du recrutement lorsque le premier domaine SH3 est délété, ou lorsque deux domaines SH3 sont délétés simultanément. L'impact de l'absence du deuxième domaine SH3 est aussi significatif (*), mais est plus réduit. Enfin, la délétion du troisième domaine SH3 seul n'a pas d'impact significatif sur le recrutement de la protéine (figure 5A). L'écart des pourcentages de recrutement moyen entre les délétions de chacun des trois domaines SH3 (respectivement 56,5%, 65,1% et 69,9%) étant faible, nous avons décidé de compléter la quantification par une méthode automatique d'analyse d'images. Des cellules transfectées avec ces trois variants, ainsi que les constructions CD2AP-HA (utilisée en tant que contrôle positif du recrutement de la protéine) et ProRich-HA (utilisée en tant que contrôle négatif du recrutement de la protéine) ont été doublement marquées par immunofluorescence afin de détecter NS5A et le tag HA, marqueur de la protéine transfectée. Les images de ces cellules (30 pour chaque construction) prises au microscope confocal ont ensuite été analysées via le

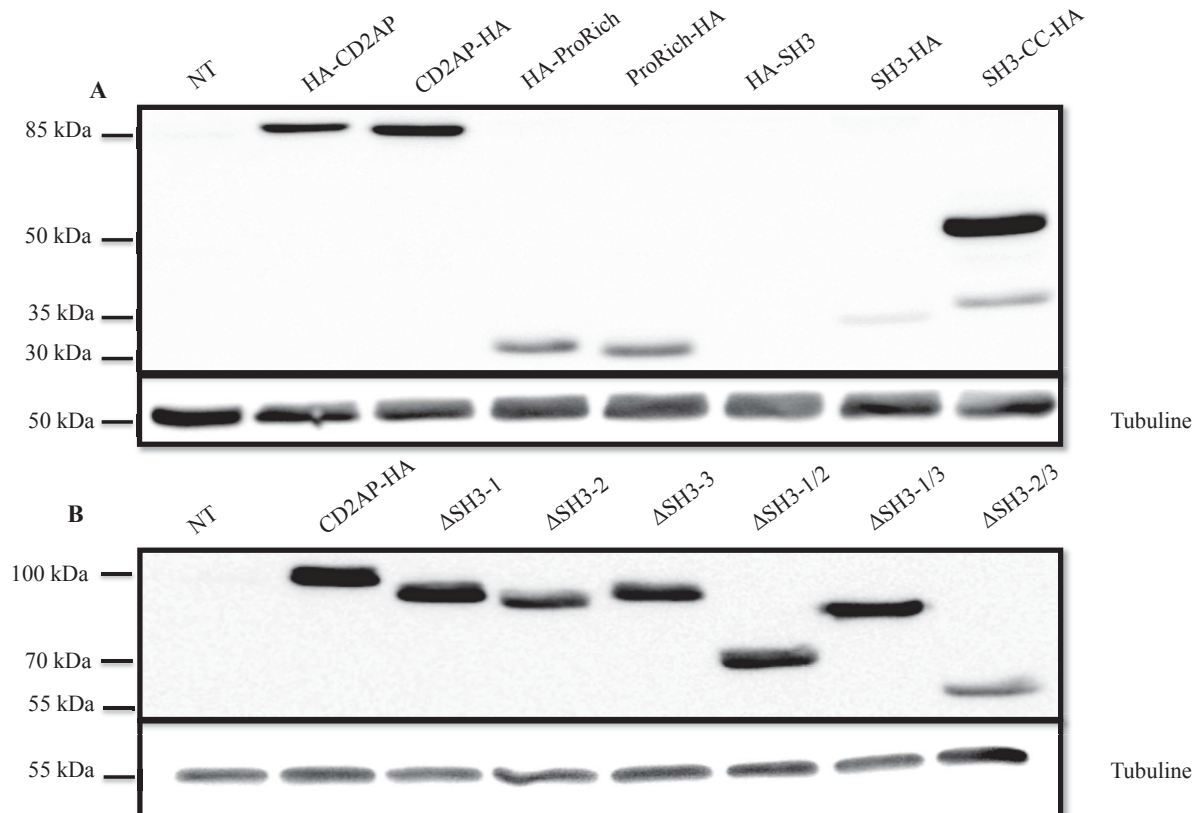


Figure 4. Expression comparée des constructions. Des cellules Huh-7 naïves ont été transfectées avec les constructions indiquées (CD2AP pleine longueur, moitié ProRich, moitié SH3 (A), CD2AP délété d'un ou deux domaines SH3 (B)) puis lysées à 16 h post-transfection. Les différentes constructions sont révélées avec un anticorps anti-HA. La tubuline est utilisée comme contrôle de la quantité de lysat déposé.

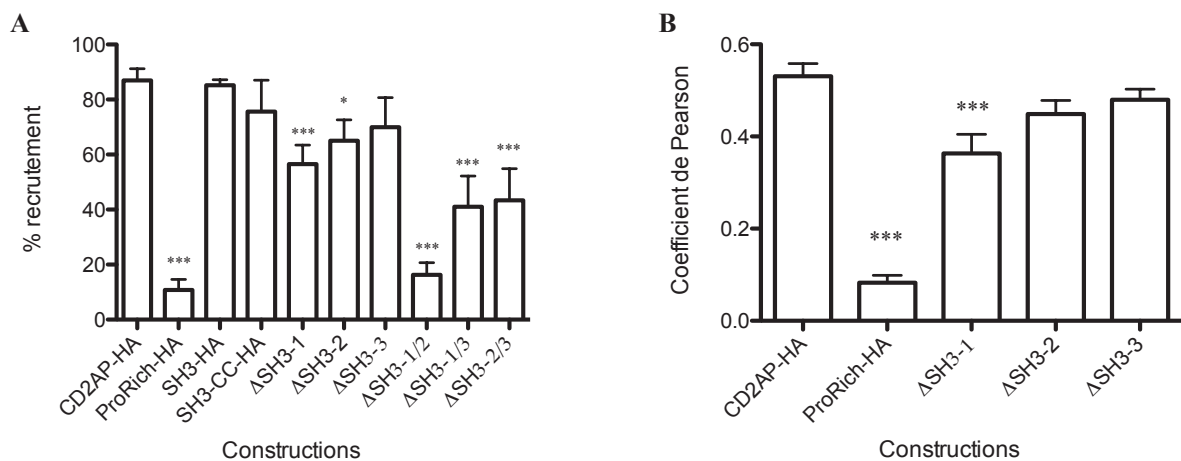


Figure 5. Quantification du recrutement des mutants de CD2AP par les complexes de réplication du HCV. (A) Quantification par analyse de la variation des pourcentages de cellules dans lesquelles une colocalisation est observée entre NS5A et le tag HA. Les résultats représentent les moyennes et les écarts-type de 5 expériences indépendantes (B) Quantification par analyse d'image (ImageJ) des coefficients de Pearson selon la méthode de Costes (Costes *et al.* 2004). CD2AP-HA est utilisé comme contrôle positif du recrutement de la protéine. 30 cellules transfectées ont été analysées par construction.

logiciel ImageJ (pour plus de détail, voir Matériel et Méthodes – Quantification de la colocalisation). Selon cette autre méthode de quantification, il existe bien une différence significative (***) de recrutement entre les constructions CD2AP-HA et Δ SH3-1, mais pas entre CD2AP-HA et Δ SH3-2 et Δ SH3-3 (figure 5B). L'ensemble de ces résultats indique que les domaines SH3-1 et 2 sont essentiels au recrutement de CD2AP dans les complexes de réplication du HCV, le domaine SH3-1 ayant apparemment un rôle plus important dans ce processus.

Etude du motif de NS5A responsable du recrutement de CD2AP

Il a récemment été montré que la protéine virale NS5A interagit avec CD2AP (Zhang *et al.* 2018), mais le(s) motif(s) structurel(s) impliqué(s) dans cette interaction est/sont encore mal connu(s). NS5A est composée d'une hélice amphipatique et de trois domaines fonctionnels (figure 6). Nous avons remarqué la présence dans la séquence de NS5A d'une séquence correspondant au motif consensus d'interaction avec les domaines SH3 de CD2AP (Igloi *et al.* 2015 ; Rouka *et al.* 2015), entre les domaines II et III de la protéine (résidus 351 à 356). La séquence du réplicon a été mutée de manière à modifier ce motif (figure 6), en suivant les mutations déjà réalisées par Igloi *et al.* (2015). Des cellules Huh-7 naïves ont été électroporées avec l'ARN de ce réplicon muté, puis les cellules répliquant l'ARN viral de manière stable ont été sélectionnées par ajout de généticine dans le milieu de culture. Ces cellules ont ensuite été immunomarquées avec des anticorps spécifiques de NS5A et de CD2AP (la protéine endogène), et la colocalisation de ces deux marquages a été analysée au microscope confocal. On n'observe pas de colocalisation dans les cellules répliquant l'ARN muté, où la répartition intracellulaire de CD2AP est similaire à sa répartition dans des cellules Huh-7 contrôles (figure 7). Ce résultat indique que le motif PXXPPR de NS5A est essentiel au recrutement de CD2AP et suggère que le recrutement est effectué par une interaction directe entre CD2AP et NS5A, une des protéines virales des complexes de réplication du HCV.

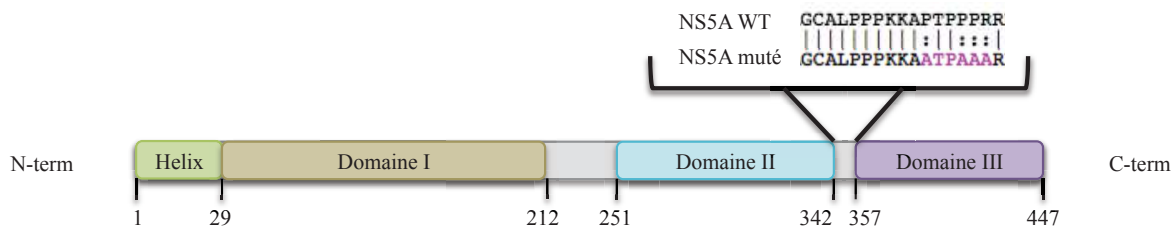


Figure 6. Représentation schématique de NS5A. De N-terminal à C-terminal : hélice amphipatique (résidus 1 à 29), domaine I (résidus 30 à 212), domaine II (résidus 251 à 342), domaine III (résidus 357 à 447). Protéine totale : 447 résidus (d'après Badillo *et al.* 2017). Le site d'interaction présumé avec les domaines SH3-1 et SH3-2 de CD2AP a été modifié pour 4 résidus sur 6, en suivant les mutations réalisées par Igloi *et al.* en 2015.

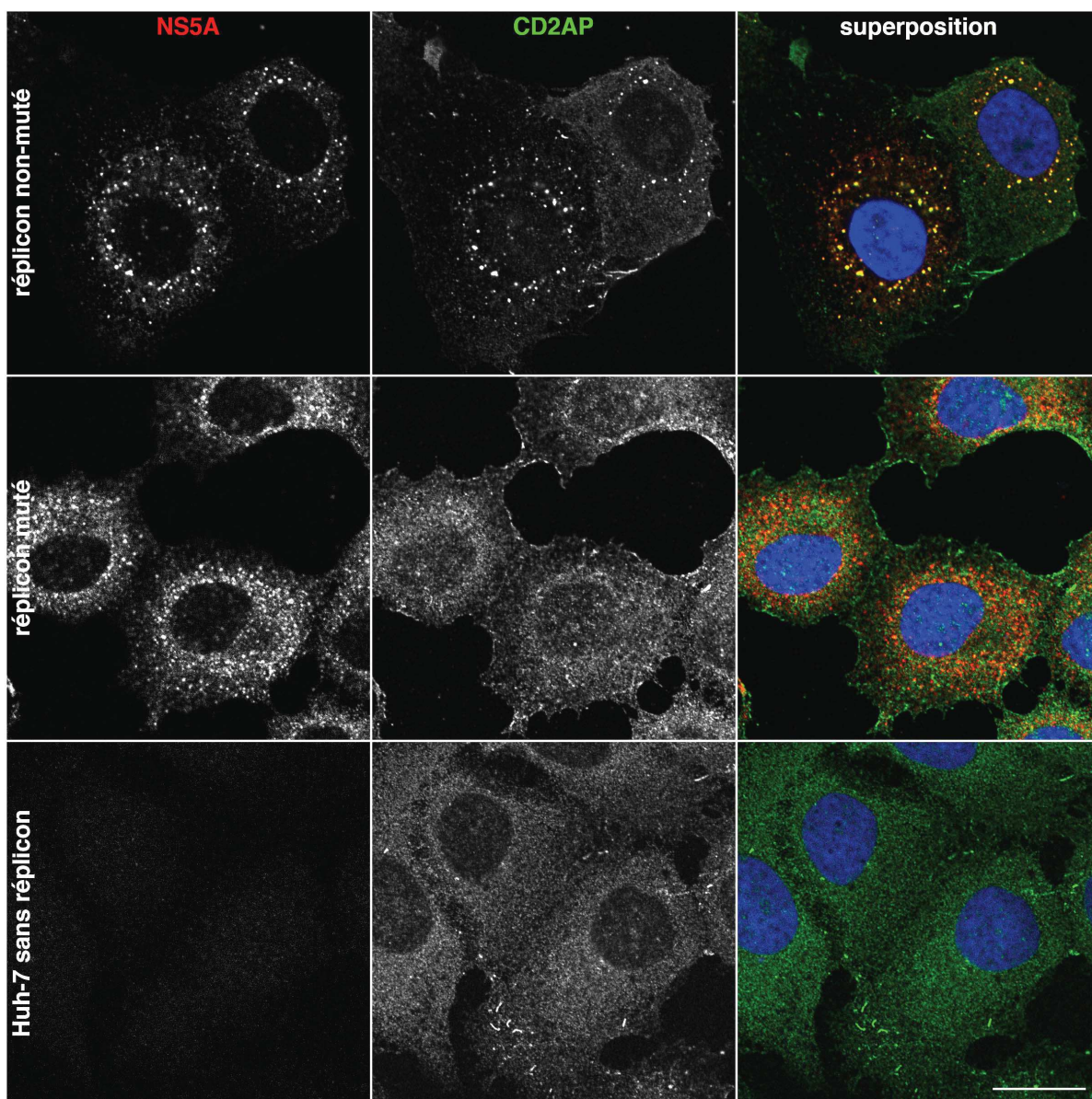


Figure 7. Effet de la mutation de NS5A sur la répartition intracellulaire de CD2AP. Des cellules Huh-7 naïves ou contenant un réplicon muté ou non-muté de la souche JFH1 de HCV ont été immunomarcuées avec des anticorps anti-CD2AP et anti-NS5A. Les noyaux sont marqués au DAPI.

Discussion

L'objectif principal de cette étude était de caractériser le recrutement de CD2AP par les complexes de réplication du virus de l'hépatite C en identifiant les domaines protéiques directement impliqués dans ledit recrutement. Dans cette optique, des plasmides contenant des gènes codant des versions tronquées de CD2AP ont été générés (pour un récapitulatif des constructions étudiées, voir tableau 1), puis transfectés dans des cellules Huh-7 répliquant le génome viral. L'analyse de l'expression des transgènes a été réalisée par western blot. Sur ces figures (figure 5A et 5B), les constructions apparaissent plus grandes que la taille à laquelle elles sont attendues, et cet écart n'est pas toujours proportionnel entre les différentes constructions. Les raisons de ces décalages nous sont inconnues, cependant un retard de migration similaire a déjà été observé concernant la protéine de pleine longueur (Zhang *et al.* 2018 ; Kuusela *et al.* 2016). En outre, toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage. Il est possible que ce retard de migration traduise la présence d'une modification post-traductionnelle dont nous n'avons pas connaissance. Au vu de la migration des différentes constructions, cette modification post-traductionnelle potentielle se situerait peut-être au niveau du domaine SH3-2. En effet, c'est pour la construction ne conservant que le deuxième domaine SH3 que le décalage s'avère le plus important, bien qu'un décalage plus léger persiste pour les constructions délétées dudit domaine.


Nous avons utilisé deux méthodes de quantification différentes pour conclure quant au recrutement des troncations de CD2AP. Les deux approches ont des avantages et défauts différents. La première technique consiste en un comptage au microscope à immunofluorescence des cellules ou une colocalisation au moins partielle est observée entre NS5A et CD2AP. Cette méthode a l'avantage d'être peu sensible au bruit de fond et aux variations d'expression des transgènes d'une cellule à l'autre, mais elle ne permet pas de différencier les cas de colocalisations partielles et totales et introduit des biais liés à l'opérateur (erreurs de comptage, critères d'évaluations moins strictes et reproductibles qu'une méthode automatique). La deuxième technique de quantification repose sur l'analyse automatique d'images par le logiciel ImageJ, en utilisant la méthode de Costes (Costes *et al.* 2004) pour calculer les coefficients de Pearson de chaque image. Cette méthode est complémentaire de la première, en cela qu'elle permet de prendre en compte les cas de colocalisation partielle (les coefficients de Pearson traduisant la covariance de l'intensité des pixels de chaque marquage) et restreint les biais inhérents à l'opérateur à la prise des photos servant de support à l'analyse. En revanche, le traitement automatique des images est sensible au bruit de fond et à la variation des niveaux d'expression des transgènes selon les cellules

considérées, et la méthode de Costes ne permet pas de choisir le seuillage utilisé lors de l'analyse, ce qui peut parfois donner des résultats aberrants lorsque ce seuil est trop haut. Dans ce cas, l'image n'a pas été prise en compte. Malgré ces différences importantes, les résultats obtenus avec ces deux méthodes ne se contredisent pas, la seule différence notable réside dans la significativité (jugée faible avec la méthode 1 et inexistante avec la méthode 2) de l'écart entre les colocalisations observées avec CD2AP-HA et Δ SH3-2. Idéalement, il aurait été intéressant que les images utilisées dans la méthode n°2 aient été acquises elles aussi automatiquement plutôt que par un être humain afin de faire disparaître les biais liés à l'opérateur. Cela s'est avéré peu pratique à cause de la trop faible proportion de cellules transfectées.

La quantification du recrutement des différentes constructions par les complexes de réplication du virus suggère que ce sont les domaines SH3-1 et SH3-2 qui sont responsables du recrutement de la protéine à proximité de ces structures. En effet, la délétion simultanée de ces deux domaines diminue le pourcentage de cellules présentant une colocalisation au moins partielle des deux marqueurs de 87% (CD2AP-HA) à 16,25% (Δ SH3-1/2). Par ailleurs, les expériences de mutagenèse dirigée de NS5A ont révélé que le recrutement de CD2AP était rendu possible par un motif PXPXPR/PXXPPR situé entre les domaines II et III de la protéine virale. Lorsque ce motif de six résidus est muté, CD2AP n'est plus recrutée à proximité des complexes de réplication du HCV, mais conserve une localisation intracellulaire similaire à celle qui est observée dans les cellules naïves. Ces résultats suggèrent que le recrutement de CD2AP se fait par interaction directe entre NS5A et CD2AP, contrairement à d'autres protéines cellulaires qui sont recrutées dans les complexes de réplication sans interagir avec une protéine virale, comme FAPP2 (Khan *et al.* 2014) ou OSBP (Wang *et al.* 2014). Cela paraît cohérent avec les dernières avancées, qui montrent que NS5A et CD2AP interagissent. Il serait intéressant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation avec nos différentes constructions afin de confirmer cette hypothèse.

Nos résultats complètent et nuancent les travaux de Zhang *et al.* qui déclarent que l'interaction entre NS5A et CD2AP dépend du domaine III de NS5A d'une part, et de tous les domaines SH3 de CD2AP d'autre part, un seul d'entre eux étant supposé suffisant pour que l'interaction ait lieu. Cependant, les techniques utilisées pour étudier ce phénomène étaient différentes, puisque nous nous sommes intéressés au recrutement de CD2AP et pas directement à l'interaction entre NS5A et CD2AP. Cela peut en partie expliquer les différences de résultats observés, et des expériences de co-immunoprécipitation auraient été intéressantes à réaliser afin de compléter notre étude.

Enfin, nous avons pour hypothèse qu'un mutant tronqué de CD2AP (la construction SH3-CC-HA) pouvait potentiellement avoir un effet de dominant négatif par inhibition compétitive du recrutement de la protéine endogène. CD2AP est une protéine ayant principalement un rôle d'adaptateur dans les interactions protéine-protéine, la délétion d'un ou plusieurs domaines d'interaction avec d'autres protéines (domaines SH3, domaine riche en prolines, site d'interaction avec l'actine) pourrait perturber ces interactions et potentiellement impacter l'une ou l'autre des étapes du cycle viral. La construction SH3-CC-HA étant constituée des trois domaines SH3 et du domaine Coiled-Coil, elle conserve la capacité de recrutement de CD2AP à proximité des complexes de réplication sans interagir avec les partenaires du domaine riche en prolines, ce dernier étant délété. Lors de l'observation au microscope à immunofluorescence de cellules contenant le réplicon et transfectées avec les différentes troncations des CD2AP, aucun effet d'aucune des constructions sur la réplication virale n'a été remarqué. Des cellules Huh-7 naïves ont alors été transfectées avec la construction SH3-CC-HA puis infectées par HCV. Là encore, aucun effet n'a été remarqué sur les titres infectieux des surnageants des cellules infectées. Ces expériences n'offrent que des résultats préliminaires incomplets et il aurait été intéressant de tester l'effet d'autres constructions sur l'infection, car les autres domaines de CD2AP peuvent avoir une importance dans le cycle viral. D'après Zhang *et al.*, l'utilisation de shRNA anti-CD2AP n'a pas d'impact direct ni sur l'entrée du virus, ni sur la réplication et la traduction de son ARN, mais diminuerait les titres intracellulaires et du surnageant des cellules infectées par HCV. Ces résultats suggèrent par déduction un effet de l'absence de CD2AP sur l'assemblage des particules virales néoformées. Il serait intéressant de compléter ces travaux en identifiant clairement le rôle de CD2AP dans l'infection par le HCV et les potentiels partenaires cellulaires de CD2AP ayant eux aussi un rôle dans l'infection.

	Diplôme : Ingénieur Agronome Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire Spécialisation / option : CENoP Enseignant référent : Jean-Marc Fraslin	
Auteur : Esther Martin de Fourchambault Date de naissance : 30/04/1997	Organisme d'accueil : CIIL Adresse : 1 rue du Professeur Calmette, 59000 Lille	
Nb pages : 18 Annexe(s) : 0	Maître de stage : Yves Rouillé	
Année de soutenance : 2019		
Titre français : Recrutement de CD2AP par les complexes de réplication du virus de l'hépatite C. Titre anglais : CD2AP recruitment in Hepatitis C Virus replication complexes		
Résumé : Le virus de l'hépatite C est un petit virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive. Il infecte les hépatocytes humains et se réplique au sein de complexes de réplication cytoplasmiques. D'après des résultats préliminaires, CD2AP, une protéine soluble composée de trois domaines SH3, un domaine riche en prolines, un motif d'interaction avec l'actine et un domaine coiled-coil, est recrutée au sein de ces complexes. Afin d'étudier le mécanisme de recrutement, des troncations de CD2AP ont été réalisées puis transfectées dans des cellules répliquant le génome viral. L'étude des cellules transfectées au microscope confocal a révélé que les domaines SH3-1 et SH3-2 sont responsables du recrutement de CD2AP. D'après la littérature, le motif PXPXPR est spécifique de l'interaction avec les domaines SH3 de CD2AP, or ce motif est retrouvé une fois dans la séquence des protéines virales, en amont du domaine III de NS5A. Un réplicon (unité minimale de réplication du génome viral) muté pour ce motif a été généré. La protéine CD2AP endogène n'est plus recrutée lorsque ce motif est muté, ce qui suggère que son recrutement s'effectue par interaction directe avec NS5A. Des expériences de co-immunoprécipitation seraient nécessaires pour confirmer notre hypothèse.		
Abstract : Hepatitis C virus (HCV) is a small, enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus. It infects human hepatocytes and its genome is replicated within cytoplasmic replication complexes. According to preliminary results, CD2AP, a soluble protein composed of three SH3 domains, a proline-rich domain, an actin-binding motif and a coiled-coil domain, is recruited by these complexes. In order to determine the mechanism of CD2AP recruitment, truncated CD2AP mutants were generated and expressed into Huh-7 cells replicating HCV RNA. Confocal microscopy studies revealed that SH3-1 and SH3-2 domains were responsible of CD2AP recruitment. PXPXPR motifs have been reported to specifically interact with CD2AP SH3 domains. One such motif was found in HCV genome, just upstream of the third domain of NS5A viral protein. A mutated replicon (minimal replication unit of the viral genome) was generated to test the importance of this motif. The endogenous CD2AP protein was not recruited anymore by replication complexes of the mutated replicon, suggesting that CD2AP recruitment is caused by direct interaction with NS5A. Co-immunoprecipitation experiments would be necessary to confirm our hypothesis.		
Mots-clés : Virus de l'Hépatite C, NS5A, CD2AP, complexes de réplication Key Words: Hepatitis C Virus, NS5A, CD2AP, replication complexes		