

***ETUDE DE LA CAPACITE DU HEV A INDUIRE LA PRODUCTION D'IFN-I
PAR LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOIDES***

I- INTRODUCTION

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, ces cellules sont la source principale d'IFN-I, un composant clé de la réponse antivirale de l'hôte. Certains virus sont capables de stimuler directement les pDCs en les infectant alors que d'autres sont capables de stimuler indirectement les pDCs sans les infecter, mais par contact entre une cellule infectée et les pDCs. Cependant, aucune étude n'a encore été publiée sur la stimulation des pDCs par le HEV. L'objectif de ce projet est de déterminer la capacité du HEV à stimuler la production d'IFN-I par les pDCs et de caractériser les mécanismes impliqués dans cette induction potentielle. Dans un premier temps, nous avons recherché des lignées cellulaires dans lesquelles le HEV pourrait se répliquer sans induire la production d'IFN-I et ceci dans le but de réaliser des co-cultures pDCs/cellules infectées. Dans un second temps, la lignée sélectionnée a été infectée et mise en co-culture avec des pDCs afin d'étudier la production d'IFN-I par les pDCs en réponse au HEV.

II- STRATEGIE EXPERIMENTALE

Afin d'étudier la production d'IFN-I par les pDCs en réponse au HEV, deux stratégies complémentaires peuvent être mises en œuvre : la première consiste en la co-culture des pDCs avec des cellules infectées par le HEV et la seconde constitue en la culture des pDCs en présence de virus libres. Cette seconde stratégie permet de définir si le HEV peut infecter directement les pDCs ou s'il y a besoin d'un contact entre la cellule infectée et les pDCs pour induire la production d'IFN-I par ces dernières.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'évaluer si le contact entre les pDCs et les cellules infectées par le HEV pouvait induire une production d'IFN-I. Pour cela, des modèles cellulaires appropriés permissifs à l'infection par le HEV et ne produisant pas d'IFN-I ont été recherchés (étape 1, Figure 41). En effet, une production d'IFN-I par les cellules infectées lors des expériences de co-culture avec les pDCs ne permettrait pas d'analyser spécifiquement la production d'IFN-I par les pDCs.

Ensuite, les pDCs ont été co-cultivées avec les cellules infectées sélectionnées et la production d'IFN-I a été mesurée par ELISA (pour *enzyme-linked immunosorbent assay*) et RT-PCRq (étape 2, Figure 41).

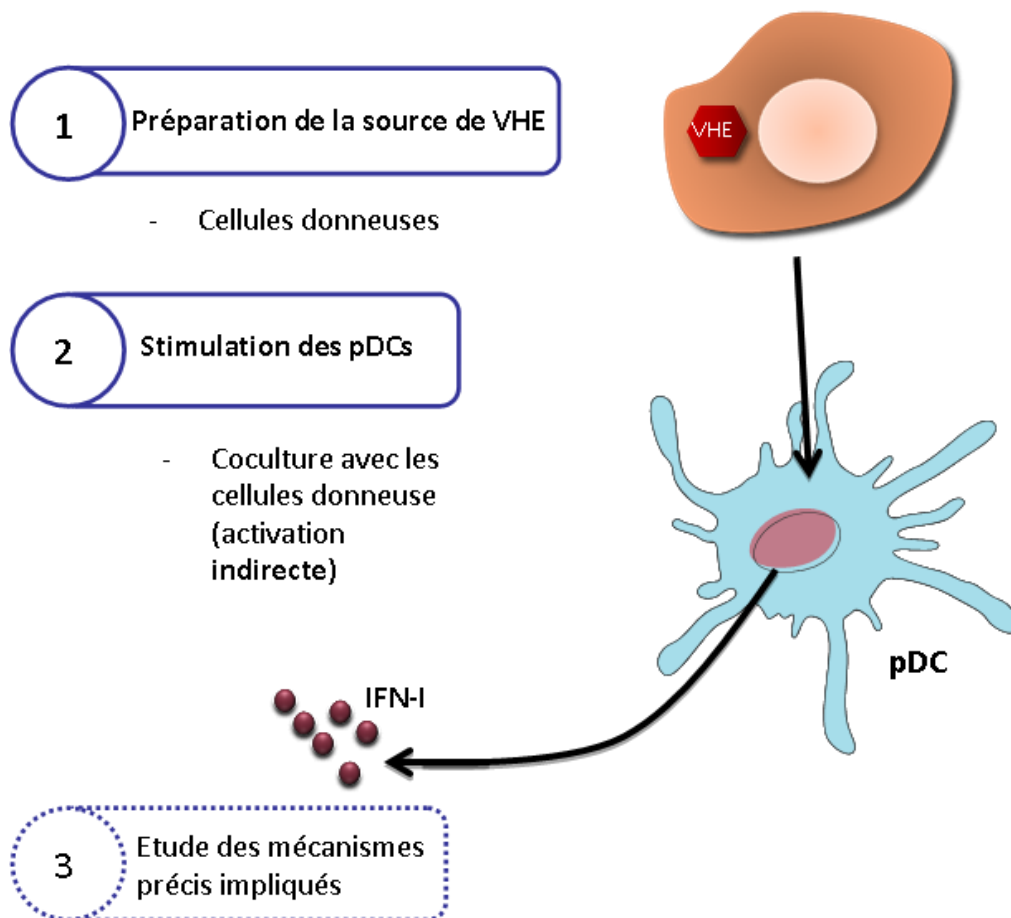


Figure 41. Schéma de la stratégie expérimentale mise en place.

III- MATERIELS ET METHODES

A- Cellules

Les cellules HepG2/C3A sont un sous clone des cellules HepG2 isolées à partir d'un carcinome hépatocellulaire sélectionné pour sa forte capacité d'inhibition de contact et sa capacité à produire différents marqueurs d'hépatocytes tels que l'albumine. Les cellules HepaRG, isolées à partir d'une tumeur d'Edmonson de grade 1 développé consécutivement à une hépatite C chronique, présentent de nombreuses caractéristiques des hépatocytes primaires humains. Elles sont capables de se différencier en cellules hépatocytaires et

biliaires, ce qui en fait un modèle très pertinent pour l'étude des virus infectant le foie comme le HEV.

Les cellules d'origine hépatocytaires humaines HepG2/C3A ont été cultivées dans du milieu MEM supplémenté avec 10% de SVF, P/S, 1% pyruvate et 1% NEAA. Les cellules hépatocytaires humaines HepaRG (BIOPREDIC international ; Saint Grégoire, France) ont été cultivées dans du milieu de croissance William's E (Thermo Fisher scientific ; Waltham, MA, États-Unis) supplémenté avec 5µg/ml d'insuline (Sigma ; Saint-Louis, MO, États-Unis), 5x10⁻⁵M d'hydrocortisone hemisuccinate (VWR international ; Radnor, PA ; États-Unis), P/S et 10% SVF. Pour permettre leur différenciation, les cellules ont ensuite été cultivées dans un milieu de différenciation (Sigma ; Saint-Louis, MO, États-Unis).

Les cellules A549-D3 (un sous clone de cellules A549 sélectionné car il permet une réplication plus efficace du HEV) ont été données par le Pr. Reimar Johne (Département de la sécurité biologique, Institut fédéral d'évaluation des risques, Berlin,, Allemagne) ¹⁸⁷. Ces cellules sont cultivées dans un milieu MEM supplémenté par 10% de SVF, P/S, 1% Gentamicine, et 1% NEAA. Les cellules A549-N5, chroniquement infectées par un HEV de génotype 3, ont également été données par le Pr. Reimar Johne ¹⁰⁹. Elles sont cultivées dans du milieu contenant 5% de SVF au lieu de 10%.

B- Anticorps et réactifs

L'anticorps monoclonal de souris anti-ISG15 provient de Santa Cruz Biotechnology (clone F-9 ; Dallas, TX, États-Unis) et a été utilisé au 1/200^{ème}. L'anticorps monoclonal de souris anti-ORF2 (MAB8002) provient de chez Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne) et a été utilisé au 1/500^{ème}.

Le poly(I:C), qui est un ARNdb synthétique, provient de Sigma-Aldrich (réf : P0913 ; Saint-Louis, MO, États-Unis). Le poly(I:C) a été transfecté avec le réactif JetPRIME dans des cellules HepG2/C3A, A549-D3 et HepaRG en suivant les instructions du fabricant.

L'IFN-β et l'IFN-α humains utilisés pour activer la voie JAK-STAT proviennent de PBL (Piscataway, NJ, États-Unis). Les cellules HepaRG ont été stimulées avec 200 et 500UI/ml d'IFN-β et les cellules A549-D3 avec 1000UI/ml d'IFN-β. La stimulation a été effectuée en retirant le milieu de culture et ajoutant du nouveau milieu dans lequel l'IFN-β est dilué. La

stimulation a été effectuée pendant 8h ou 18h pour étudier l'expression des ISGs. A la fin de la stimulation, les cellules sont récoltées pour l'extraction des ARNs.

C- Infections virales

1- Infections par le HEV

Un système de culture du HEV en cellules HepaRG produisant de forts titres viraux a été mis en place dans le laboratoire par Virginie Doceul (non publié). Brièvement, des cellules HepaRG cultivées pendant 2 semaines en milieu de croissance puis 2 semaines en milieu de différenciation ont été infectées avec un extrait de fèces d'un patient infecté avec un HEV de génotype 3f (FR-humHEV-3f ; numéro GenBank : JN906974) ⁵⁷⁷. La moitié du surnageant (environ 1ml) a été prélevée tous les 2 à 3 jours et remplacée par du milieu frais. L'extraction de l'ARN de ces surnageants a permis de suivre la réplication virale par RT-PCRq dans le temps. Des titres élevés (de l'ordre de 10^8 copies du génome du HEV/ml de surnageant) ont été obtenus après 70 jours de culture. A partir de ce premier passage, du surnageant de cellules infectées récolté 91 jours après l'infection a été utilisé pour infecter de nouvelles cellules HepaRG différenciées à une MI (multiplicité d'infection) de 25-30, ceci correspondant à un deuxième passage du virus. La réplication virale a été suivie comme précédemment. Des surnageants récoltés à J99 et J109 ont ensuite été utilisés pour infecter respectivement des cellules HepG2/C3A ou de nouvelles cellules HepaRG différenciées à une MI de 2 (Figure 42). Les MIs sont ici exprimées en nombre de génome équivalent (GE)/cellule et non en nombre de particules infectieuses/cellule.

Les infections de cellules HepaRG et HepG2/C3A ont été réalisées selon le protocole suivant : Le surnageant contenant du virus a été dilué dans du milieu de croissance afin d'infecter les cellules à une MI de 2 (sous un volume d'1ml). La même expérience a été réalisée avec du surnageant de cellules HepaRG non infectées prélevé dans les mêmes conditions comme contrôle négatif (non infecté). Ce contrôle permet de s'affranchir de l'effet que le surnageant de culture de cellules HepaRG pourrait avoir sur les cellules HepG2/C3A. De même, 1ml de suspension virale ou de surnageant contrôle provenant de cellules non infectées a été déposé sur les cellules HepaRG différenciées. Le surnageant a été retiré 24h plus tard et 3 lavages au PBS ont été réalisés afin d'éliminer toute trace d'inoculum, ensuite

2ml de milieu frais ont été ajoutés sur les cellules. Tous les deux à trois jours, 1ml de milieu a été prélevé et 1ml de milieu de croissance frais a été ajouté afin de pouvoir suivre la répllication virale au cours du temps.

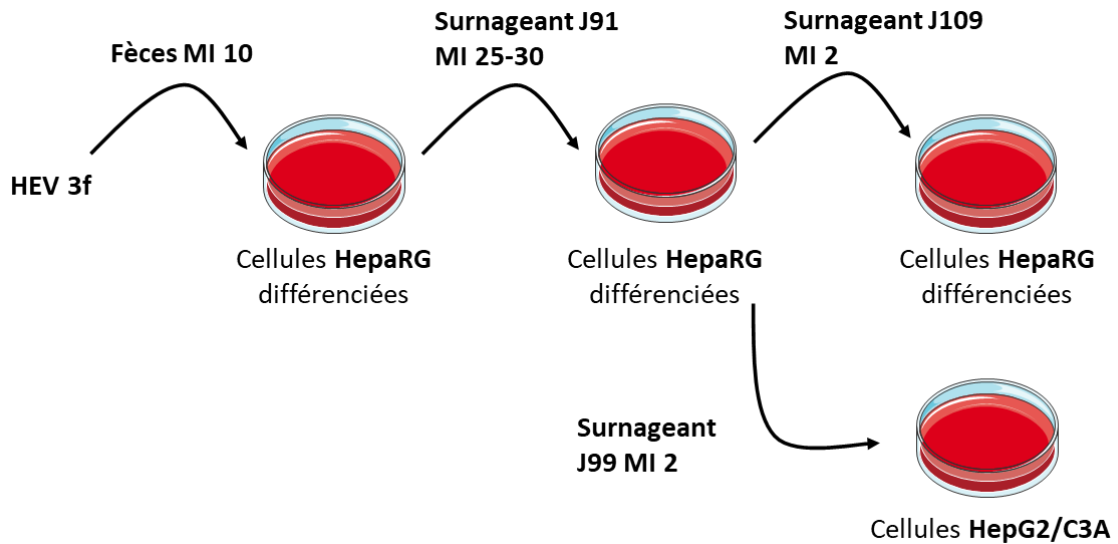


Figure 42. Protocole de la mise en place des systèmes de culture du HEV en cellules HepaRG ou en cellules HepG2/C3A.

2- Infections avec le BTV-8

La souche sauvage de BTV de sérotype 8 (BTV8) provient de la collection du laboratoire nationale de référence (Laboratoire de santé animale, ANSES, Maisons-Alfort ; isolée dans les Ardennes en 2006). L'infection des cellules avec le BTV8 a été réalisée suivant le protocole suivant : des cellules HepaRG ont été infectées à une MI de 0.01 ou 0.05 (ici la MI est exprimée en TCID50) dans 1ml de milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C sous faible agitation pendant 2h avant que le milieu soit changé pour 2ml de milieu de croissance avec sérum. Les cellules ont ensuite été récoltées 24h plus tard et l'ARN total a été extrait.

D- Co-culture avec les cellules dendritiques plasmacytoïdes

La culture des pDCs et la co-culture avec les cellules HepaRG infectées ont été réalisées par Laura Sinigaglia, de l'équipe de Nolwenn Jouvenet à l'Institut Pasteur. Brièvement, le sang de

donneurs adultes sains a été fourni par l'Etablissement français du sang et les PBMCs ont été isolées avec le kit Ficoll-Paque (GE Healthcare ; Little Chalfont, Royaume-Uni). Les pDCs ont été isolées des PBMCs en utilisant le kit MicroBead CD304 (Miltenyi Biotec ; Bergisch Gladbach, Allemagne) suivi d'une deuxième étape d'enrichissement avec le kit pDC isolation II (Miltenyi Biotec ; Bergisch Gladbach, Allemagne). La pureté des pDCs isolées a ensuite été évaluée par cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-CD303 et anti-CD123. La fraction négative a été collectée et constitue la fraction de PBMCs déplétées des pDCs. Les PBMCs, ainsi que la fraction de PBMCs déplétée de pDCs, ont été utilisées à 1×10^5 cellules/conditions. Les pDCs isolées ont été utilisées à 2.5×10^4 cellules/condition, avec une pureté de >94%. Les pDCs isolées, les PBMCs ou les PBMCs déplétées des pDCs ont été mises en co-cultures avec les cellules HepaRG pendant 24h. Les cellules ont ensuite été récoltées, l'ARN total a été extrait pour analyse en RT-PCRq et les surnageants ont été récoltés pour analyse de la production d'IFN- α par ELISA.

E- Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq)

1- Extraction de l'ARN du HEV et quantification par RT-PCRq

L'ARN viral présent dans 200 μ l de surnageant a été extrait en utilisant le kit QIAamp viral RNA (Qiagen ; Hilden, Allemagne) et l'ARN viral présent dans les culots cellulaires a été extrait en utilisant le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Une RT-PCR TaqMan a été réalisée en utilisant le kit RT-PCR Quanti'Tech Probe (Qiagen ; Hilden, Allemagne) en utilisant 2 μ l d'ARN et avec les amorces décrites dans l'annexe 1 (ORF2-3 HEV) et une sonde Taqman HEV (TaqMan MGB probes, Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis ; séquence : TGATTCTCAGCCCTTCGC). Un appareil LightCycler480 (Roche Molecular Biochemicals) a été utilisé pour l'analyse. La transcription inverse a été effectuée en chauffant les échantillons pendant 20 minutes à 50°C, suivi d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes. L'ADN a ensuite été amplifié par 45 cycles à 95°C pendant 10 secondes et 58°C pendant 45 secondes. L'extension finale a été réalisée en refroidissant à 40°C pendant 30 secondes. Les données ont été analysées après le calcul des Ct (*Cycle threshold*). Une courbe standard a été obtenue en fonction des valeurs de Ct et du logarithme du nombre de copies de l'ARN standard. L'ARN standard a été obtenu

après transcription *in vitro* d'un plasmide pCDNA3.1 ORF2-3 HEV, comme décrit précédemment ⁸³.

2- Extraction des ARN cellulaires totaux et mesure de l'expression de gènes cellulaires par RT-PCRq

Pour les cellules HepaRG, HepG2/C3A et A549, l'ARN total a été extrait des culots cellulaires en utilisant le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne). La transcription inverse (RT) et La PCR en temps réel ont été réalisés comme indiqués dans le chapitre 1 (II-E-)

Pour les pDCs, l'extraction des ARN a été réalisée grâce au kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel ; Düren, Allemagne). La synthèse de l'ADNc a été réalisée avec la transcriptase inverse RevertAid H Minus (Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis). La PCRq a été réalisée sur un appareil de PCR en temps réel (ABI PRISM 7900HT) en utilisant le kit SYBR Green Master Mix (Roche, Bâle, Suisse).

F- Dosage de l'IFN- α par ELISA

L'analyse par ELISA de la production d'IFN- α dans les surnageants des co-cultures pDCs-cellules infectées a été effectuée à l'Institut Pasteur par Laura Sinigaglia en utilisant le kit ELISA Verikine Huma IFN α Multi-Subtype (PBL assay science ; Piscataway, NJ, États-Unis).

G- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant des tests t de Student avec correction de Welsh. Les valeurs-p ont été considérées comme significatives quand $p < 0.05$.

IV- RESULTATS

A- Préparation de la source de HEV

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de l'IFN-I et de différents ISGs dans des cellules HepG2/C3A, HepaRG et A549 infectées par le HEV. En effet, afin de pouvoir étudier la production d'IFN- α par les pDCs lors des expériences de co-cultures, les cellules infectées ne doivent pas produire d'IFN- α . Nous avons alors testé les deux lignées hépatocytaires HepG2/C3A et HepaRG ainsi que la lignée constitutivement infectée par le HEV A549-N5.

1- *Etude de la production d'IFN-I dans des cellules HepG2/C3A suite à une infection par le HEV*

Des cellules HepG2/C3A ont été infectées à une MI de 2 avec du surnageant de cellules HepaRG prélevé au 99^{ème} jour post-infection. Le surnageant de culture a ensuite été prélevé tous les 2/3 jours pour analyse de la réplication virale par RT-PCRq (Figure 43A). Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection et analysés pour la présence d'ARN viral et d'ARN codant pour l'IFN- α (Figures 43B et C). Comme le montrent les figures 43A et B, les cellules HepG2/C3A permettent bien la réplication du HEV au cours du temps. Cependant, la réplication du virus dans ces cellules, après un pic de l'ordre de 10^5 GE/ml dans le surnageant ou 10^3 copies de HEV/ μ g d'ARN total dans les culots cellulaires, décroît à partir de 7 jours post-infection.

Les résultats présentés dans la figure 43C indiquent que les cellules HepG2/C3A n'induisent pas la synthèse des ARNm codant pour l'IFN- α en réponse à l'infection par le HEV. Nous avons souhaité vérifier que les cellules HepG2/C3A sont bien capables de produire de l'IFN- α en réponse à d'autres stimuli ou si elles présenteraient un défaut dans la voie de signalisation conduisant à la synthèse d'IFN-I. Pour cela, nous avons stimulé les cellules avec du poly(I:C) et analysé par RT-PCRq la présence d'ARNm codant pour l'IFN- α . Comme le montre la figure 43D, les cellules HepG2/C3A induisant bien la synthèse des ARNm codant

pour l'IFN- α en réponse au poly(I:C). Les cellules HepG2/C3A infectées par le HEV ne produisent pas d'IFN- α et semblent pouvoir être utilisées pour la co-culture avec les pDCs.

2- Etude de la production d'IFN-I dans les cellules HepaRG suite à une infection par le HEV

De la même manière que pour les cellules HepG2/C3A, des cellules HepaRG différenciées ont été infectées avec un surnageant prélevé au 109^{ème} jour post-infection d'un deuxième passage du virus dans les cellules HepaRG. Du surnageant a ensuite été prélevé tous les 2/3 jours pour analyse de la réplication virale par RT-PCRq (Figure 44A). Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection et analysés pour la présence d'ARN codant pour l'IFN- α , - β , ISG15, ISG56 et MxA (Figure 44 B à F). Comme le montre la figure 44A, les cellules HepaRG permettent un bon niveau de réplication du HEV au cours du temps. En effet, le nombre de génome équivalent/ml de surnageant augmente constamment, jusqu'à atteindre un titre de 10^5 GE/ml au bout de 21 jours de culture.

Les résultats des figures 44 C à F ne montrent pas de différence dans l'expression des gènes codant pour l'IFN- α , l'IFN- β , l'ISG15, l'ISG56 ou MxA entre les cellules infectées et les cellules témoin au cours du temps, suggérant que l'infection des cellules HepaRG par le HEV n'induit pas la synthèse d'IFN-I et d'ISGs.

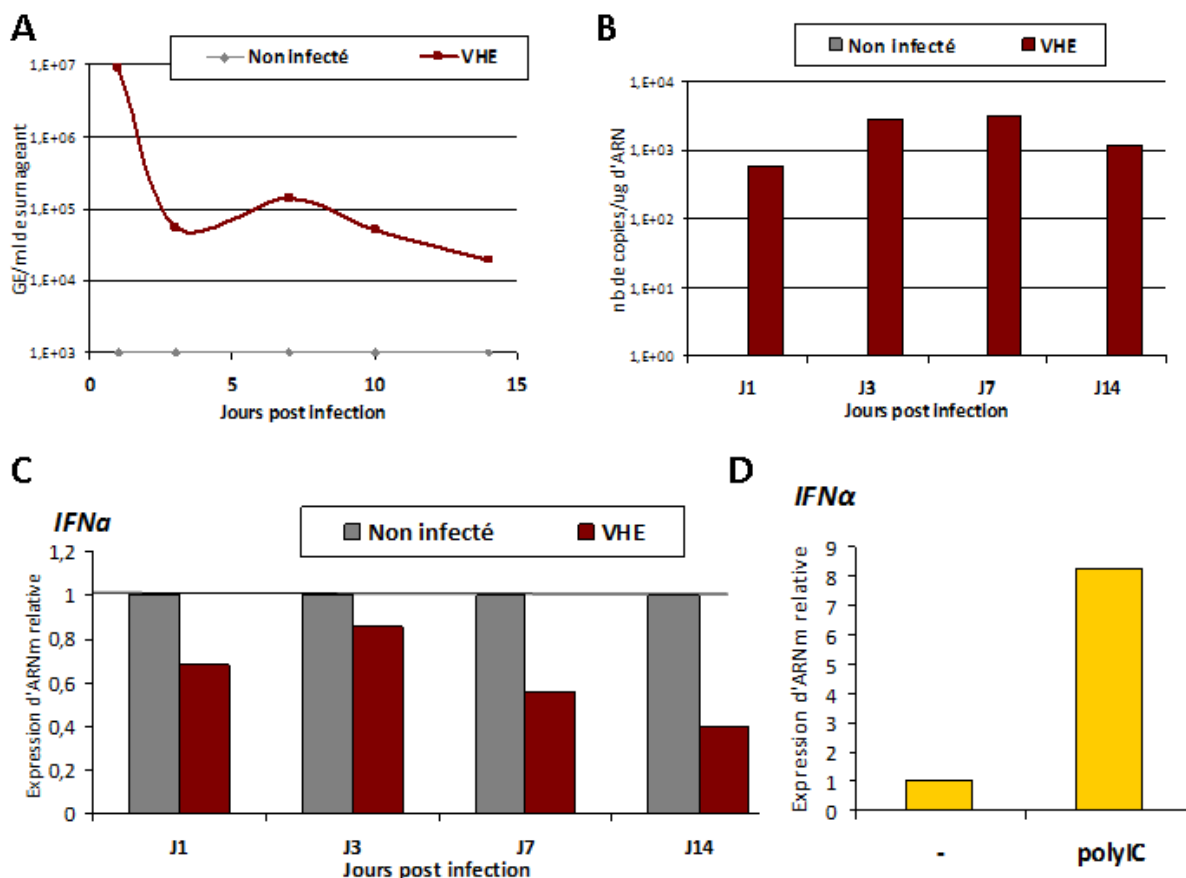


Figure 43. Les cellules HepG2/C3A peuvent être infectées par le HEV mais la présence du virus n'affecte pas le niveau d'expression de l'IFN- α .

Des cellules HepG2/C3A ont été infectées à une MI de 2 avec du surnageant provenant de cellules HepaRG infectées. **(A)** Tous les 2/3 jours post-infection, le surnageant des cellules est prélevé et la production d'ARN viral (en génoème équivalent(GE)/ml de surnageant) est mesurée par RT-PCRq. **(B et C)** Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection (à J1, 3, 7 et 14). Après extraction de l'ARN, le niveau d'expression de l'ARN viral dans les culots (B) ainsi que des ARN codant pour l'IFN- α (C) ont été mesurés par RT-PCRq. La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne et les résultats ont été normalisés pour chaque jour en fonction du contrôle non infecté. **(D)** Les cellules HepG2/C3A ont été stimulées pendant 18h par transfection du poly(I:C) (4 μ g/ml). Les ARN totaux ont ensuite été extraits et des expériences de RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer les niveaux d'expression des ARN codant pour l'IFN- α . La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne. L'expérience a été répétée deux fois de manière indépendante.

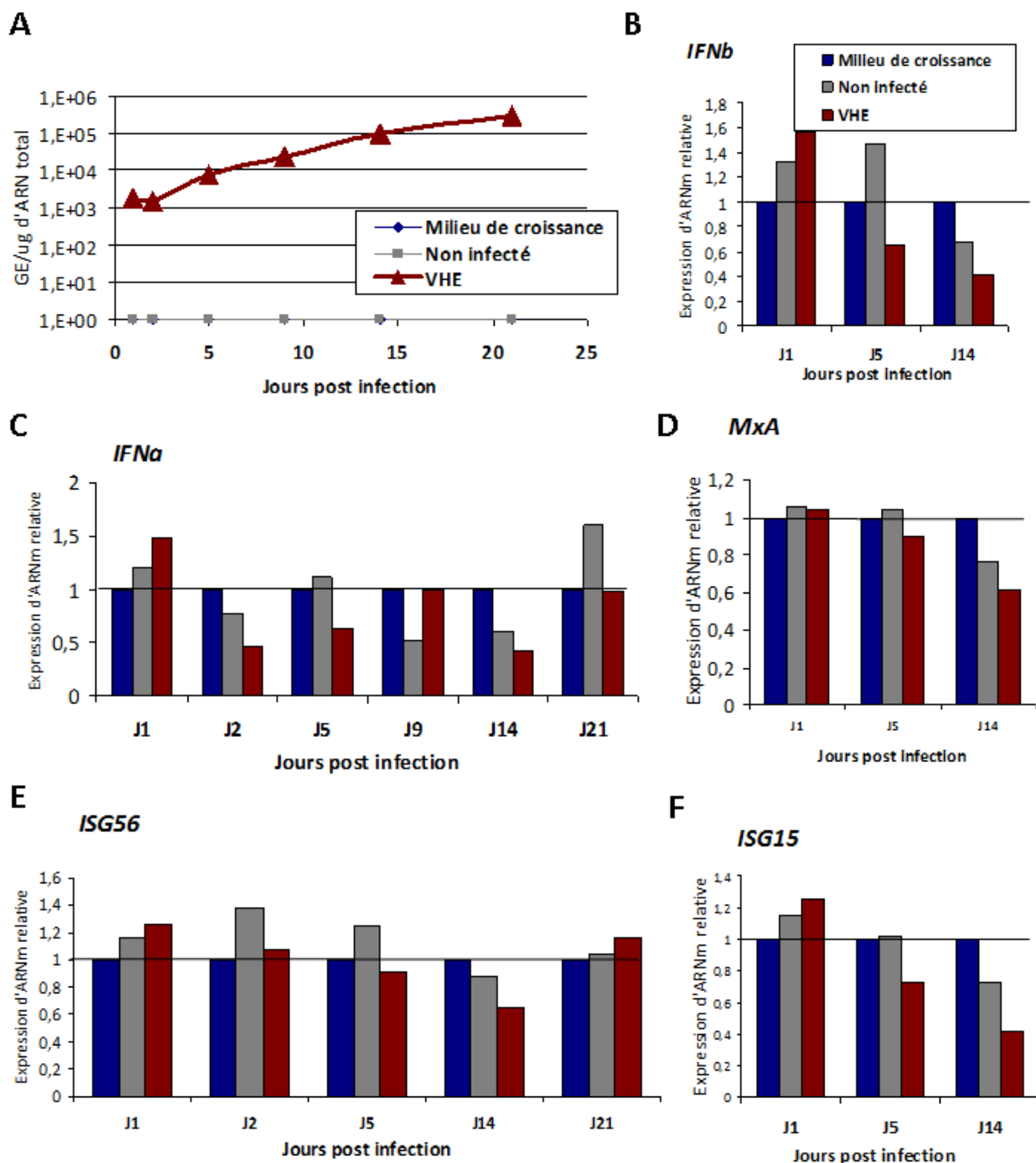


Figure 44. Les cellules HepaRG peuvent être infectées par le HEV mais le virus n'affecte pas le niveau d'expression de l'IFN- α - β , MxA, ISG56 et ISG15.

Des cellules HepaRG ont été infectées à une MI de 2 avec du surnageant provenant de cellules HepaRG infectées. Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection (à J1, 3, 5, 9, 14 et 21). Après extraction des ARN totaux, la production d'ARN viral (en GE/ μ g d'ARN total) (A) et le niveau d'expression des ARN codant pour l'IFN- β (B), IFN- α (C), MxA (D), l'ISG56 (E) et l'ISG15 (F) a été mesuré par RT-PCRq. La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne et les résultats ont été normalisés sur chaque jour en fonction du contrôle « milieu de croissance » (bleu).

Afin de vérifier si l'absence de réponse des cellules HepaRG est spécifique de l'infection par le HEV, différents stimuli ont été utilisés : une stimulation au poly(I:C) à 1µg/ml pendant 18h, une infection avec le BTV8 à une MI de 0.01 pendant 18h ou des stimulations avec 200UI/ml ou 500UI/ml d'IFN-β ou 500UI/ml d'IFN-α pendant 18h (Figure 45). L'expression des ARN codant pour l'IFN-α et l'ISG56 a été analysée par RT-PCRq. Les résultats présentés figure 45A montrent que la stimulation au poly(I:C) induit l'expression de l'IFN-α, confirmant l'intégrité de la voie d'induction de l'IFN-I dans les cellules HepaRG. Cependant, cette induction de l'expression des ARNm codant pour l'IFN-α n'est pas observée après infection avec le BTV8. Une forte induction de l'ISG56 a été observée après infection par le BTV8, ou stimulation par le poly(I:C) ou l'IFN-α/β (Figure 45B), confirmant que la voie de réponse à l'IFN-I est également fonctionnelle. De plus, une induction de l'expression de l'ISG56 est également observée après infection par le BTV8, suggérant que malgré l'absence d'expression des ARNm codant l'IFN-I, une activation de l'expression des ISGs peut être observée pour d'autres virus. Dans le cas du HEV, nous n'avons observé ni une synthèse d'IFN-I, ni une synthèse des différents ISGs testés, suggérant que le HEV ne serait soit pas détecté par les PRRs cellulaires, soit qu'il utiliserait un mécanisme pour bloquer le signal IFN-I comme suggéré dans le premier chapitre. Les cellules HepaRG semblent être un très bon modèle pour la co-culture avec les pDCs. En effet, elles permettent la réplication du HEV au cours du temps et n'expriment pas les ARNm codant pour l'IFN-I.

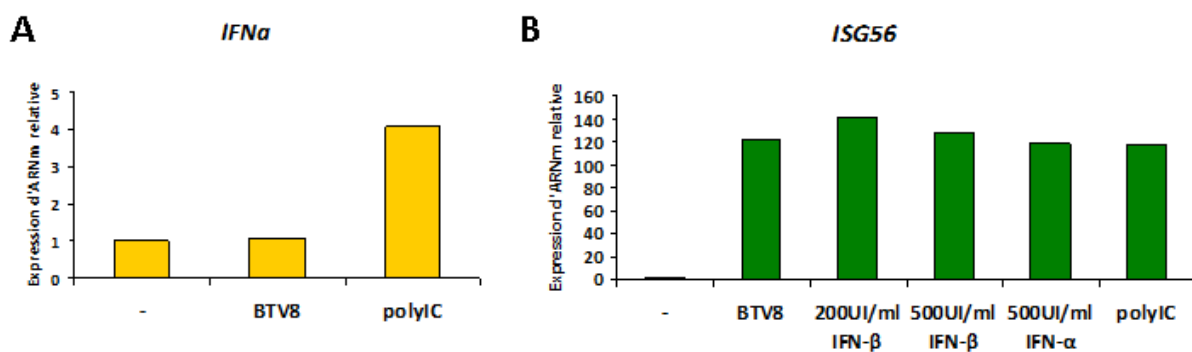


Figure 45. Evaluation de l'intégrité des voies d'induction (A) et de réponse (B) à l'IFN-I dans les cellules HepaRG.

Des cellules HepaRG ont été stimulées pendant 18h avec le poly(I:C) (1µg/ml), 200UI ou 500UI/ml d'IFN-β, 500UI/ml d'IFN-α ou infectées avec le BTV8 à une MI de 0,01. Les ARN totaux ont ensuite été extraits et des expériences de RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer les niveaux d'expression des ARN codant pour l'IFN-α (A) et l'ISG56 (B). La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne. Les résultats de l'infection par le BTV8 et des stimulations par l'IFN-β sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

3- Réponse des cellules A549 à une infection par le HEV

α- La lignée A549-N5

La lignée A549-N5 a été générée après infection de cellules d'origine pulmonaire A549 avec du virus isolé à partir du sérum d'un patient atteint d'une hépatite chronique (HEV-3) développée suite à une transplantation de rein et sous thérapie immunosuppressive. Ce virus présente la particularité d'avoir une insertion de 186 nucléotides dans la région HVR, dérivée de duplications de deux parties de l'ORF1. Le virus a ensuite été passé plusieurs fois sur ces cellules. Les cellules A549-N5 qui nous ont été données correspondent au 36^{ème} passage des cellules.

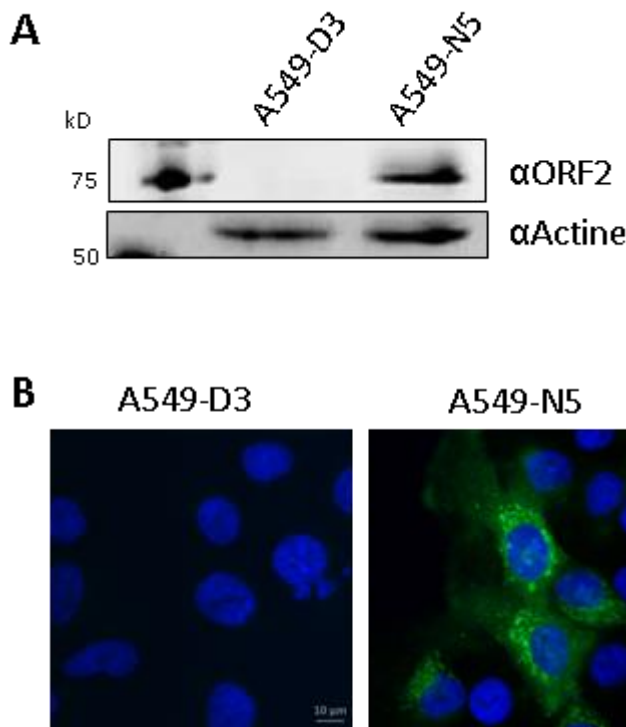


Figure 46. Caractérisation de la réplication virale dans la lignée A549-N5.

(A) Analyse par immunoblot de lysats de cellules A549-D3 et A549-N5. Les expressions de l'ORF2 (75KDa) et de l'actine (42KDa) ont été analysées. **(B)** Etude de l'expression de l'ORF2 par microscopie à fluorescence. Après fixation, les cellules A549-D3 et A549-N5 ont été incubées avec un anticorps anti-ORF2 de souris, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire conjugué à une molécule DyLight 488 (vert). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630).

Les cellules ont été mises en culture et l'analyse du surnageant a permis de montrer que le titre viral restait stable au cours des passages successifs des cellules avec des titres allant de 10^7 à 10^8 GE/ml de surnageant. De plus, contrairement aux cellules HepaRG pour lesquelles l'analyse de l'expression de l'ORF2 par immunoblot ou IF est difficile à mettre en place, du fait d'un bruit de fond important et probablement d'un faible nombre de cellules infectées, l'expression de l'ORF2 dans les cellules A549-N5 peut être observée à la fois par immunoblot

(Figure 46A) et par IF (Figure 46B). L'analyse par IF a permis de montrer qu'environ 50% des cellules sont infectées dans la lignée A549-N5. Les cellules A549-D3, un sous clone de cellules A549 non infectées, ont été utilisées comme contrôle négatif.

b- Etude de la production d'IFN-I dans les cellules A549-N5

Afin de déterminer si les cellules A549-N5 pourraient être utilisées pour la co-culture avec les pDCs, nous avons analysé la production d'IFN-I et des ISGs dans ces cellules infectées par le HEV. Pour cela, nous avons extrait l'ARN des cellules A549-N5 et de cellules A549-D3 non infectées, qui ont servi de contrôle négatif dans nos expériences. Nous avons également stimulé les cellules A549-D3 avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 8h ou 4 μ g/ml de poly(I:C) pendant 24h, afin de pouvoir comparer l'activation des cellules A549 après infection par le HEV avec l'activation des cellules suite à d'autres stimuli. Comme le montrent les figures 47A et B, le niveau d'expression des ARNm codant pour l'IFN- α et l'IFN- β n'est pas modifié entre des cellules A549-D3 non infectées et des cellules A549-N5 infectées par le HEV. Au contraire, dans les cellules A549-D3 stimulées avec le poly(I:C), une induction de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- α d'environ 100 fois le niveau basal d'expression des ARNm sans stimulation et une induction de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- β d'environ 1800 fois le niveau basal est observé. Cependant, une faible augmentation de la quantité des ARN codant pour certains ISGs dans les cellules infectées A549-N5 est observée (Figures 47C et D), mais le niveau d'expression reste très faible en comparaison avec celui observé après stimulation avec le poly(I:C). Pour confirmer la production de certains ISGs pendant l'infection par le HEV, nous avons ensuite comparé l'expression de certaines protéines codées par les ISGs par immunoblot entre les cellules A549-N5 et A549-D3. Comme le montre la figure 47E, les cellules A549-N5 présentent un niveau d'expression de deux ISGs, STAT1 et STAT2, plus élevé que les cellules A549-D3, confirmant ainsi les résultats de PCRq. De plus, une ISGylation des protéines dans les cellules A549-N5 est observée, suggérant qu'une réponse IFN-I a bien été mise en place dans ces cellules. Les cellules A549-N5 semblent donc produire des IFN-I en quantité indétectable par qPCR ou dans les conditions de l'expérience. Il est également possible que ces cellules induisent une autre voie de signalisation indépendante de la synthèse d'IFN-I pour activer l'expression des ISGs.

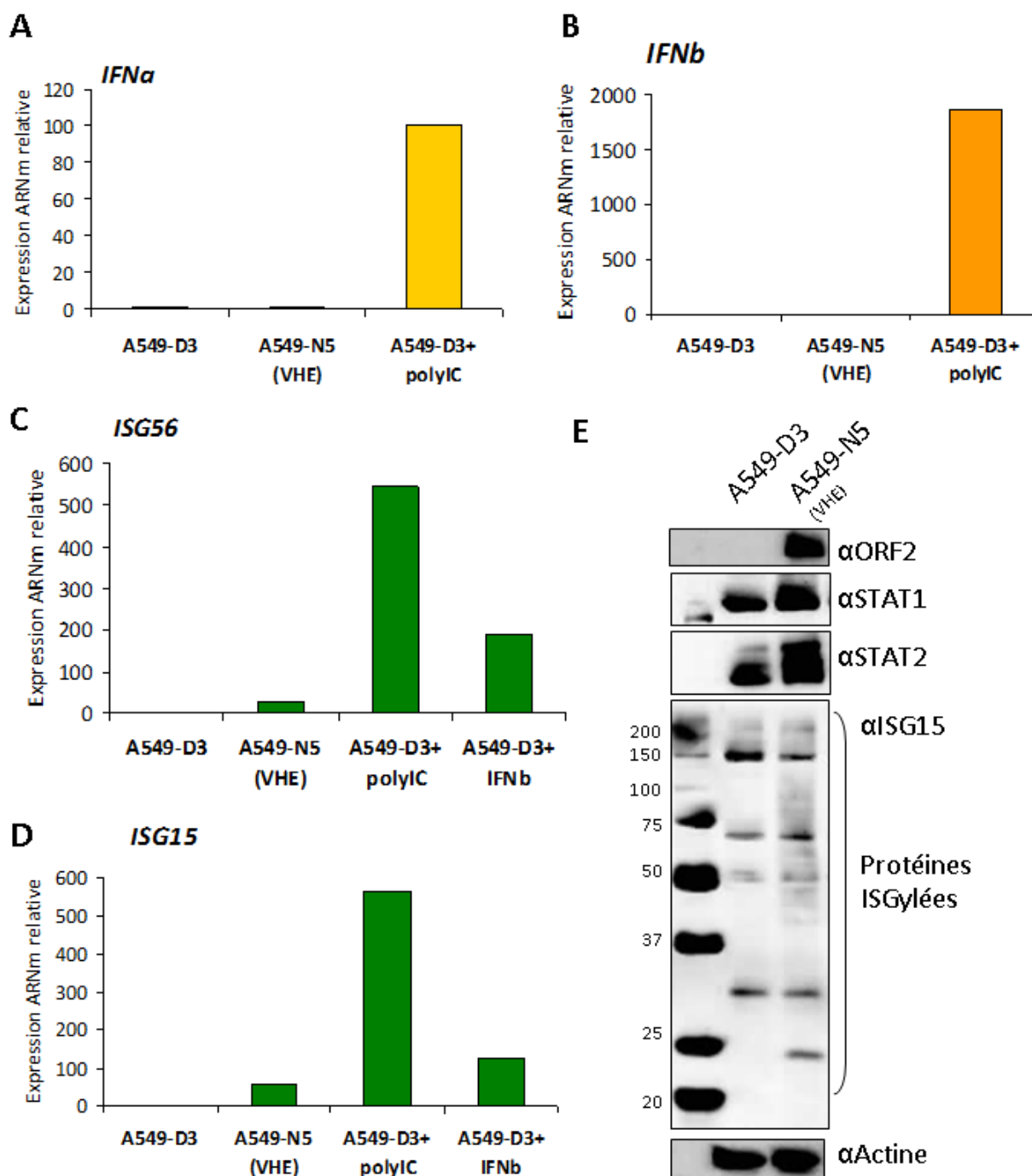


Figure 47. Le HEV n'affecte pas le niveau d'expression des ARN codant pour l'IFN-I dans les cellules A549-N5 mais est capable d'augmenter le niveau d'expression de certains ISGs. (A à D) L'expression des ARN codants pour l'IFN- α , IFN- β , ISG56 et ISG15 a été analysé par RT-PCRq dans des cellules A549-N5, des cellules contrôle A549-D3 et des cellules A549-D3 stimulées soit avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 8h soit avec 4 μ g/ml de poly(I:C) pendant 24h. (E) La production de certaines protéines codées par les ISGs (STAT1 et STAT2) et l'induction de l'ISGylation des protéines ont été analysées par immunoblot dans les cellules A549-N5 en comparaison des cellules contrôle A549-D3.

B- Etude de la stimulation des pDCs par co-culture avec des cellules HepaRG infectées par le HEV

Toutes les expériences décrites ci-dessus ont permis de sélectionner différentes lignées cellulaires qui peuvent être utilisées pour la co-culture avec les pDCs. Les cellules HepG2/C3A sont de bonnes candidates du fait de leur origine hépatocytaires et de l'absence d'augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- α après infection par le HEV. Cependant, la réplication du virus y est peu efficace. Les cellules A549-N5 présentent l'intérêt d'être déjà infectées en produisant de forts titres viraux et avec un nombre de cellules infectées important (de l'ordre de 50%). Cependant, ces cellules étant d'origine pulmonaire, elles ne représentent pas un modèle très pertinent pour étudier l'infection par le HEV. De plus, une augmentation de l'expression des ARNm codant pour différents ISGs a pu être observée dans ces cellules, suggérant qu'une réponse immunitaire est quand même mise en place et qu'il est possible que de l'IFN-I soit produit, mais à un niveau non détectable par PCRq. Les cellules HepaRG, au contraire, semblent être un bon modèle pour étudier la stimulation des pDCs par les cellules infectées. En effet, ce sont des cellules proches de cellules hépatocytaires primaires, et représentent donc bien les cellules cibles du HEV. De plus, ces cellules présentent un titre viral élevé, qui ne diminue pas au cours du temps, et elles ne présentent pas un niveau d'expression détectable des gènes codant pour l'IFN-I et des ISGs après infection. Nous avons donc choisi ces cellules pour la co-culture avec les pDCs.

Les cellules HepaRG infectées à une MI de 100 avec du HEV provenant de surnageant de cellules HepaRG infectées au 6^{ème} passage ont été mises en co-culture avec les PBMCs totales, les pDCs ou les PBMCs déplétées des pDCs pendant 24h. Les ARN totaux des cellules ont ensuite été extraits et des analyses par RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer le titre viral (Figure 49A) et la quantité relative des ARNm codant pour l'IFN- α 1 et l'IFN- α 2 (Figure 48B). En parallèle, le surnageant des cellules a été analysé par ELISA pour déterminer la quantité d'IFN-I sécrété par les pDCs (Figure 48C).

Tout d'abord, comme le montre la figure 48A, les cellules mises en contact avec les pDCs étaient bien infectées. Les résultats des figures 48B et C montrent que les pDCs sont activées par le HEV. En effet, on observe une augmentation de la synthèse des ARNm codant pour les IFN- α 1 et - α 2 ainsi qu'une production d'IFN-I dans le surnageant des co-cultures pDCs-

HepaRG infectées alors que cette augmentation n'est pas ou peu observée dans les co-cultures HepaRG infectées-PBMC et HepaRG infectées-PBMC déplétés des pDCs.

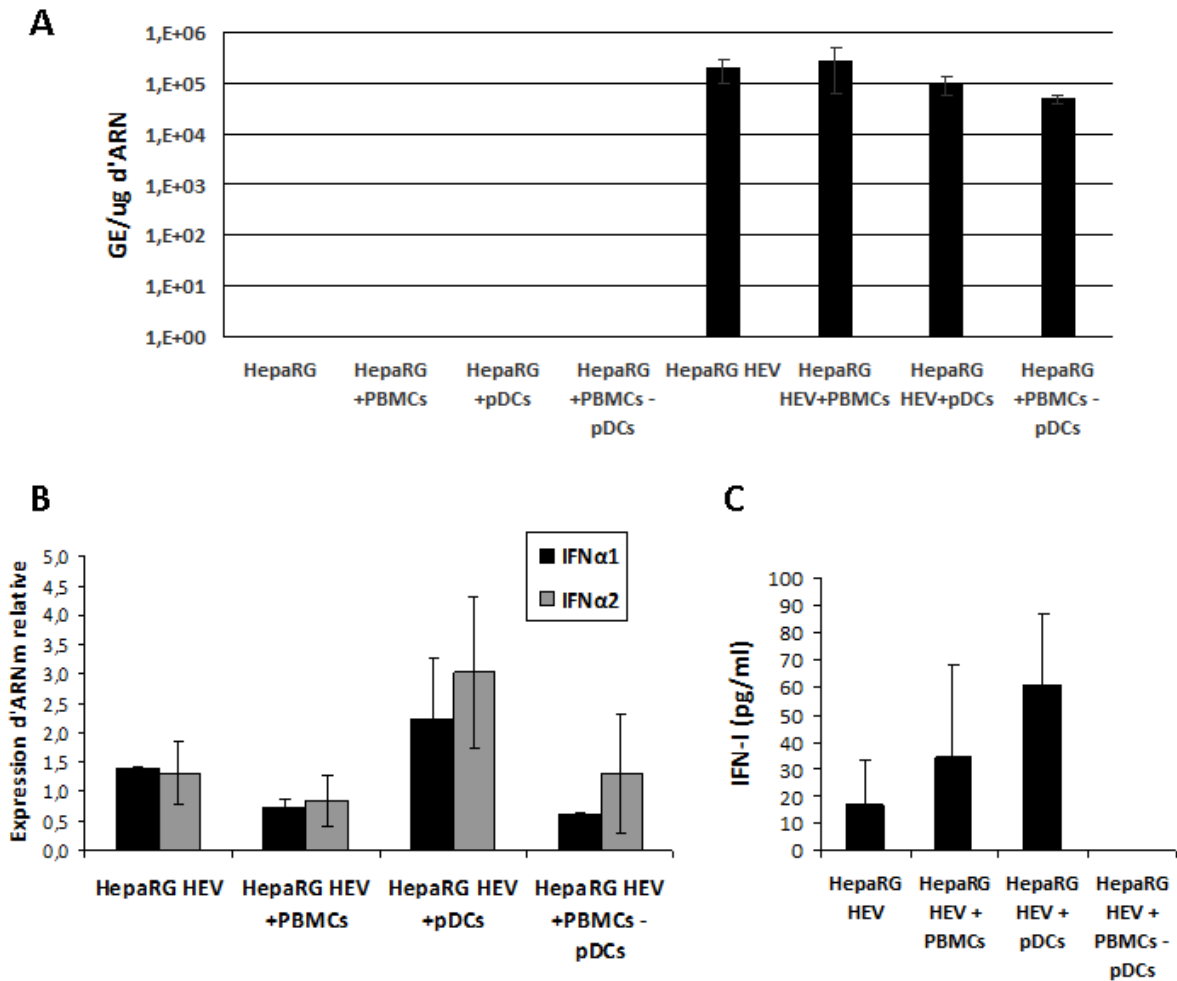


Figure 48. Co-culture des cellules HepaRG infectées avec les PBMCs, les pDCs ou les PBMCs déplétées des pDCs.

Après 24h de co-culture, l'ARN total des cellules HepaRG mises en co-culture avec les pDCs, PBMCs ou PBMCs déplétées des pDCs a été extrait et des analyses par RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer le titre viral (A) (en GE/μg d'ARN total) ainsi que la quantité d'ARN codant pour les IFN-α1 et IFN-α2 (B). (C) Analyse de la sécrétion d'IFN-I dans le surnageant de culture par ELISA.

V- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Parce que les pDCs jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative en produisant de grandes quantités d'IFN-I en réponse à une infection virale, un des objectifs de ce projet de thèse a consisté en l'étude de la production d'IFN-I en réponse au HEV par les

pDCs. La première étape a été de trouver une lignée cellulaire qui soit permissive au HEV mais qui ne produise pas d'IFN- α en réponse à l'infection. En effet, une production d'IFN- α par les cellules infectées ne permettrait pas de conclure sur la production d'IFN- α par les pDCs lors de nos expériences de co-culture. Nous avons donc infecté différentes lignées cellulaires et étudié leur capacité à synthétiser de l'IFN- α en réponse au HEV. Ces expériences nous ont permis de sélectionner la lignée cellulaire la plus adaptée, qui permette la réplication du HEV et qui ne produise pas d'IFN- α . La deuxième étape a été de mettre la lignée sélectionnée en co-culture avec les pDCs et d'étudier la production d'IFN- α par les pDCs.

Nous avons sélectionné les cellules HepaRG pour la co-culture avec les pDCs et étudié la production d'IFN-I par les pDCs en réponse au HEV. Cependant, nous n'avons observé qu'une faible induction des ARNm codant pour l'IFN- α , d'environ 3 fois la quantité d'ARNm basale mais également une faible production d'IFN-I dans le surnageant des cellules (de l'ordre de 60pg/ml) dans la condition de stimulation des pDCs avec des cellules HepaRG infectées (Figure 48). Les pDCs induisent donc bien la production d'IFN-I, mais de manière faible en comparaison par exemple au YFV qui induit une synthèse des ARNm codant pour l'IFN- α dans les PBMCs totales d'environ 1500 fois le niveau basal et une production dans le surnageant de l'ordre de 300pg/ml ⁴⁰⁵. Cependant, ces résultats restent encore à confirmer car nous n'avons pu réaliser à ce jour qu'une seule expérience.

La synthèse d'IFN-I n'est pas observé dans les co-cultures HepaRG infectées-PBMC du fait du faible pourcentage de pDCs au sein des PBMC (<0.4%). Comme 10^5 cellules ont été déposées sur les cellules HepaRG dans la condition de co-culture avec les PBMC totales, cela représente au maximum 400 pDCs contre 2.5×10^4 pDCs dans la condition de co-culture avec les pDCs seules. Il est donc normal que la production d'IFN-I soit différente entre les deux conditions.

Les cellules HepaRG utilisées pour la co-culture avec les pDCs présentent un titre viral élevé, de l'ordre de 10^5 GE/ μ g d'ARN. Cependant, l'étude par IF en utilisant des anticorps anti-ORF2 (résultats non montrés ici) des cellules HepaRG infectées suggèrent que peu de cellules sont infectées. Cette faible proportion de cellules infectées pourrait expliquer la faible induction

d'IFN-I par les pDCs. Cependant, il a été montré dans le cas du virus Foamy que seulement 20 cellules infectées suffisent à induire la production d'IFN-I par les pDCs ⁴¹⁹, suggérant que la faible proportion de cellules HepaRG infectées ne serait peut-être pas la cause de la faible production d'IFN-I.

Enfin, il est également possible que les pDCs ne puissent être stimulées qu'en étant infectées directement par le HEV. En effet, il est possible que la production de particules virales dans le surnageant pendant les 24h de contact avec les pDCs ne soit pas suffisante pour induire une activation des pDCs. Au contraire, en utilisant du surnageant prélevé de cellules HepaRG infectées ayant un titre de HEV élevé pour stimuler les pDCs, ce surnageant contiendrait peut-être plus de particules virales et permettrait donc une meilleure stimulation des pDCs que le surnageant des cellules après seulement 24h de culture.

La faible induction de la réponse IFN-I observée après co-culture de cellules infectées par le HEV avec les pDCs ne semble cependant pas spécifique des pDCs. En effet, après infection des lignées hépatocytaires HepaRG et HepG2/C3A avec du HEV-3 provenant de surnageant de culture de cellules HepaRG infectées, nous n'avons pas observé de synthèse des ARNm codant pour l'IFN- α , l'IFN- β et pour les différents ISGs testés (MxA, ISG56 et ISG15) (Figures 43 et 44). De même, nous n'avons pas observé d'induction de différents types d'IFN-I en réponse au HEV dans les cellules A549-N5 mais nous avons quand même observé une synthèse faible d'ISG56 et d'ISG15 dans ces cellules (Figure 47).

Une explication à l'absence de synthèse d'IFN-I observée dans nos expériences serait la sensibilité de la méthode utilisée. Il est possible que l'induction de l'IFN-I soit difficile à détecter par PCRq. D'autres méthodes de détection, telle que la quantification de l'IFN-I dans le surnageant par test ELISA, devraient alors être utilisées afin de confirmer les résultats obtenus par PCRq. Il est également possible que les temps après infection analysés lors de cette étude ne soient pas appropriés pour détecter une potentielle synthèse d'IFN-I. De plus, nous avons étudié l'expression de quelques ISGs seulement dans nos expériences. Il est donc possible que le HEV induise la synthèse d'ISGs différents que ceux testés.

La faible réponse des cellules à l'infection par le HEV pourrait aussi s'expliquer par une faible reconnaissance du HEV par les PRRs cellulaires ou par l'inhibition des voies de synthèse et de réponse à l'IFN-I par le HEV.

Les résultats obtenus dans les pDCs, les cellules HepaRG, HepG2/C3A et A549-N5 sont en accord avec des résultats publiés qui ont montré une faible induction des réponses immunitaires en réponse au HEV. Notamment, il a été rapporté une faible induction de l'expression de l'IFN-I en réponse au HEV-1 dans des cellules humaines A549 par PCRq⁵³⁷, mais aucune sécrétion d'IFN-I n'a pu être mise en évidence par ELISA dans le surnageant des cellules infectées. Récemment, dans une autre étude, aucun IFN-I n'a été détecté par ELISA dans le surnageant de culture de cellules HepG2 et d'hépatocytes primaires humains après infection par le HEV-3⁵³⁸.

D'autres études ont rapporté une induction faible des ISGs après infection par le HEV. Il a récemment été montré une induction de l'ISG15 à J1 et J5 post-infection dans des cellules Huh7-S10-3 transfectées avec un clone infectieux d'un HEV-3 (Kernow-C1)⁵⁴³. Cependant, l'étude de l'expression de l'ISG15 aux même temps post-infection dans les cellules HepaRG dans nos expériences n'a pas montré d'augmentation de l'expression de l'ISG15 (Figure 44). Au contraire, dans les cellules A549-N5, une augmentation de l'expression de l'ISG15 a été observée par RT-PCRq et l'ISGylation des protéines a pu être observée par immunoblot. Cela suggère que les ISGs induits seraient dépendant du type cellulaire infecté.

Chez le chimpanzé, il a été observé une augmentation de l'expression d'ISG15, OAS1, Mx1, STAT1 et IRF7 après infection avec le HEV-1⁵⁴². Cependant, cette induction est faible en comparaison de l'induction des ISGs observés après infection avec le HCV. De plus, de nombreux ISGs induits en réponse au HCV ne sont pas induits après infection avec le HEV. La réponse atténuée des cellules au HEV, la virémie plus courte et la séroconversion plus précoce suggère que le HEV serait plus susceptible aux effets des ISGs et pourrait expliquer l'absence de signes cliniques observés lors de la plupart des infections par le HEV.

Dans des cellules Huh7.5, A549 et HepaRG transfectées avec un clone infectieux du HEV-3 (Kernow-C1), il a été rapporté que RIG-I était un des ISGs les plus exprimés et que cette protéine était capable d'inhiber la réplication du HEV⁵⁴⁶. Il a été montré que RIG-I induit la synthèse d'ISGs, mais que cette induction est indépendante d'une production d'IFN-I et qu'elle impliquerait que partiellement la phosphorylation de STAT1 et la voie JAK-STAT. Il

semblerait donc que RIG-I induise l'expression de deux types d'ISGs : certains seraient induits par la voie dépendante de la phosphorylation de STAT1 alors que d'autres seraient induits par une autre voie inconnue, indépendante de la voie JAK-STAT. Il a été rapporté que le complexe NF- κ B peut s'associer directement au promoteur ISRE ⁵⁷⁸. Une hypothèse serait que la deuxième voie activée par RIG-I, indépendante de la voie JAK-STAT, impliquerait l'activation de la voie NF- κ B et ainsi la liaison de NF- κ B au promoteur ISRE.

Il semble donc que l'induction d'IFN-I après infection par le HEV soit faible ou modérée et il est possible que l'induction des ISGs passe par une voie indépendante de l'IFN-I. Cette hypothèse reste cependant à confirmer.

Une autre hypothèse pouvant expliquer qu'aucun ou peu d'IFN-I n'ait été détecté dans cette étude en réponse au HEV, pourrait être que le virus bloque les voies de signalisation de l'IFN-I dans les différentes lignées étudiées et notamment dans les pDCs. De nombreux virus sont capables d'inhiber les voies de synthèse et de réponse à l'IFN-I (voir introduction A-III-A-). Parmi eux, certains virus sont capables de bloquer l'activation des pDCs. C'est notamment le cas du HBV et du HCV. Il a été montré que la production d'IFN- α par les pDCs en réponse au HCV est faible en comparaison de la production observée en réponse aux virus Influenza et HSV-1 ⁵⁷⁹. En effet, le HCV inhibe la production d'IFN- α dans les pDCs. D'un côté, la glycoprotéine d'enveloppe E2 se lie aux immunorécepteurs de type lectine-C BDAC-2 (pour blood DC antigen 2) et DCIR (pour DC-immunoreceptor) présents à la surface des pDCs. Ces récepteurs sont des immunomodulateurs et leur activation induit une inhibition de la production des IFN-I et des cytokines pro-inflammatoires induites par TLR7 et TLR9. La liaison de la glycoprotéine d'enveloppe E2 avec BDAC-2 et DCIR va ainsi entraîner leur activation et donc l'inhibition de la production d'IFN-I ⁵⁸⁰. D'un autre côté, la protéine Core du HCV induit une diminution de l'expression de l'IRF7 ⁵⁸¹. Chez des patients atteints d'une hépatite B chronique, il a été montré un déficit de production d'IFN- α par les pDCs ^{582,583} dû à une diminution de l'expression des TLR7 et TLR9 ^{584,585}. La protéine C du paramyxovirus est également capable d'inhiber la voie de signalisation dépendante de TLR7 et TLR9 dans les pDCs en inhibant la phosphorylation de l'IRF7 ⁵⁸⁶. Différents virus sont donc capables de bloquer l'induction d'IFN-I par les pDCs. Il est donc possible que le HEV ait une activité inhibitrice similaire.

Perspectives

Afin de déterminer si la faible production d'IFN-I par les pDCs est due à une faible reconnaissance du HEV ou à une inhibition par le HEV des voies de signalisation conduisant à la synthèse d'IFN- α dans les pDCs, différentes expériences pourront être réalisées. Dans un premier temps, afin de vérifier si le faible nombre de cellules HepaRG infectées est responsable de la faible induction observée, nous pourrions utiliser des cellules A549-N5 pour stimuler les pDCs. En effet, même si ce n'est pas le meilleur modèle pour étudier l'infection par le HEV du fait de leur origine pulmonaire, cette lignée présente environ 50% des cellules infectées. Si le même phénomène est observé, nous pourrions éliminer l'hypothèse du faible nombre de cellules infectées.

Dans la stratégie expérimentale initiale, nous avons prévu de comparer l'effet du contact des cellules infectées avec les pDCs (stimulation indirecte) avec l'infection des pDCs par du HEV libre provenant d'un surnageant de culture (stimulation directe) sur la production d'IFN- α par les pDCs. La mise en contact des pDCs avec du surnageant de cellules infectées nous permettrait de déterminer si la production d'IFN-I observée vient du contact cellule infectée-pDC ou vient de l'infection directe des cellules avec le surnageant infecté (Figure 49).

Afin d'étudier quelle(s) voie(s) de signalisation est(sont) activée(s) dans les pDCs, nous utiliserons la lignée Gen2.2 qui présente tous les marqueurs des pDCs. Des lignées de cellules Gen2.2 dans lesquelles l'expression de TLR7, RIG-I et MDA5 est réduite grâce à la transduction de lentivirus codant pour des shRNA appropriés sont déjà disponibles dans le laboratoire de Nolwenn Jouvenet (institut Pasteur). Des siRNAs dirigés contre différents composants des voies de signalisation des pDCs pourront également être utilisés⁵⁸⁷.

Afin de déterminer si certaines voies sont inhibées par le HEV dans les pDCs, nous pourrions étudier le niveau d'expression des récepteurs RIG-I, TLR7 et TLR9 ou des facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Nous pourrions également étudier l'état de phosphorylation des facteurs de transcription.

De plus, il serait intéressant de pouvoir comparer l'effet de la stimulation des pDCs humaines avec l'effet de la stimulation de pDCs porcines. En effet, il est possible que les pDCs porcines ne produisent pas la même quantité d'IFN-I que des pDCs humaines en réponse au HEV. Il a notamment été montré une synthèse d'IFN-I *in vivo* chez le porc après infection par le HEV⁵³⁶. Si une synthèse plus importante d'IFN-I est observée dans les pDCs porcines, cela pourrait expliquer l'absence de symptômes cliniques chez le porc par rapport

aux symptômes tels que l'hépatite aiguë ou chronique observée chez l'homme. En effet, en produisant plus d'IFN-I, le système immunitaire porcin pourrait être capable d'éliminer plus facilement le HEV. Aucune étude n'a encore été publiée comparant l'effet de la stimulation par le même virus de pDCs porcines et de pDCs humaines. Les pDCs porcines, comme les pDCs humaines, sont les cellules produisant le plus d'IFN- α . Elles expriment fortement le facteur de transcription IRF7 et sont activées en réponse à des ligands de TLR7 et TLR9⁵⁸⁸, ce qui suggère que des voies de signalisations similaires sont activées dans les pDCs porcines et humaines. Les mêmes expériences pourraient donc être réalisées en parallèle dans les deux types de pDCs afin de pouvoir comparer leur activation en réponse au HEV.

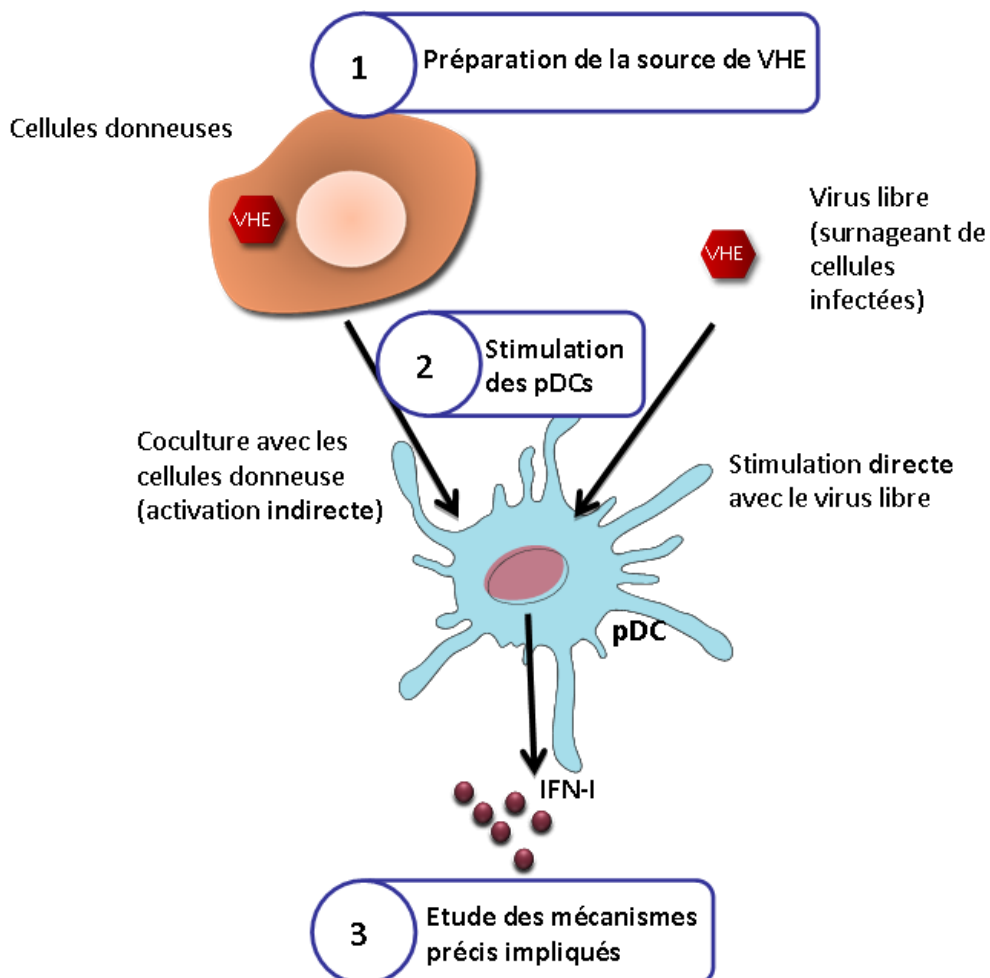


Figure 49. Perspectives sur l'étude de l'activation des pDCs par le HEV.