

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
La dengue: vue générale	2
Epidémiologie et symptomatologie	2
Mécanismes physiopathologiques des formes graves de la dengue	4
Lutte anti-dengue	7
Etat actuel des connaissances	8
Contexte du travail	9
Affinité de mAb4E11 pour les quatre sérotypes des virus de la dengue	10
Exploration du domaine E3.DV1 par mutagenèse en alanine	10
Présentation du projet	11
MATERIELS ET METHODES	13
Souches, plasmides et tampons	13
Constructions génétiques	13
Production et purification des protéines	14
Tests protéiques	14
ELISA indirect	15
Détermination des constantes d'équilibre par ELISA	15
Analyse des structures	16
RESULTATS	18
Production des domaines E3.X	18
Intégrité des domaines E3.X parentaux	18
Intégrité des domaines E3.X mutants	19
Transposition de l'épitope du sérotype1 vers le sérotype 4 des virus de la dengue	19
Absence de reconnaissance entre Fab4E11 et d'autres flavivirus	21
Transposition de l'épitope du sérotype1 dans les domaines E3 d'autres flavivirus	21
DISCUSSION	24
Structure de l'épitope de mAb4E11	24
Complétude de l'épitope	26
Bases moléculaires de la reconnaissance croisée des quatre virus de la dengue	26
Contre-spécificité pour les autres flavivirus	27
Corrélation avec la neutralisation	28
Mécanisme de neutralisation et comparaison avec d'autres flavivirus	29
Conclusion	30
PERSPECTIVES	31
REFERENCES	33

INTRODUCTION

La dengue: vue générale

La dengue, dite grippe tropicale, est une arbovirose humaine sévissant en zone urbaine dans les régions tropicales et sub-tropicales. La désignation "virus de la dengue" fait référence non pas à un seul membre de la famille des Flaviviridae, genre flavivirus, mais à quatre virus issus d'un ancêtre commun, proches génétiquement et responsables du même tableau clinique, mais suffisamment éloignés antigéniquement pour être distingués par sérologie. Les virus sont transmis à l'homme par des moustiques du genre *Stegomyia*. L'homme est le principal, voire le seul hôte vertébré avéré des virus de la dengue, bien que certains primates non humains puissent être infectés de façon asymptomatique expérimentalement (Rothman, 2003).

Epidémiologie et symptomatologie

Le terme dengue dérive du swahili « ka dinga pepo », signifiant littéralement « une sorte de crise de crampe soudaine ». La maladie, décrite depuis 1779, ne se déclare que dans un faible nombre de cas, l'infection étant le plus souvent asymptomatique et toujours auto-limitante. La dengue se manifeste par un syndrome grippal indifférencié de sévérité variable; une fièvre apparaît après deux à sept jours d'incubation, souvent accompagnée de maux de tête, de nausées, de vomissements, de douleurs myo-articulaires et d'une éruption cutanée ressemblant à celle de la rougeole. Au bout de trois ou quatre jours, les symptômes s'intensifient avant de régresser rapidement en une semaine; des hémorragies conjonctivales, une epistaxis ou des ecchymoses peuvent venir compliquer le tableau clinique. La guérison s'accompagne d'une convalescence d'une quinzaine de jours.

Depuis le milieu du XX^{ème} siècle, la situation épidémiologique de la dengue a radicalement changé; longtemps limitée à l'Asie du sud-est, la dengue s'est, en l'espace de cinquante ans, propagée à presque l'ensemble de la ceinture tropicale et sub-tropicale (Figure 1). La dengue s'est ainsi étendue à l'Océan indien, au Pacifique sud (32.800 cas à Tahiti et Moorea, Polynésie française, en 2001) et surtout en Amérique latine où le nombre de cas annuellement reportés a été multiplié par 60 entre 1989 et 1993 comparativement à la période précédente (1984-1988) (Source OMS).

On attribue cette propagation à l'extension de l'aire géographique du principal vecteur, *Stegomyia aegypti*. Probablement initiée lors de la seconde guerre mondiale par les mouvements de troupes et de matériel, celle-ci s'est poursuivie ces dernières décennies par les échanges internationaux accrus, et s'est trouvée facilitée par l'échec des tentatives

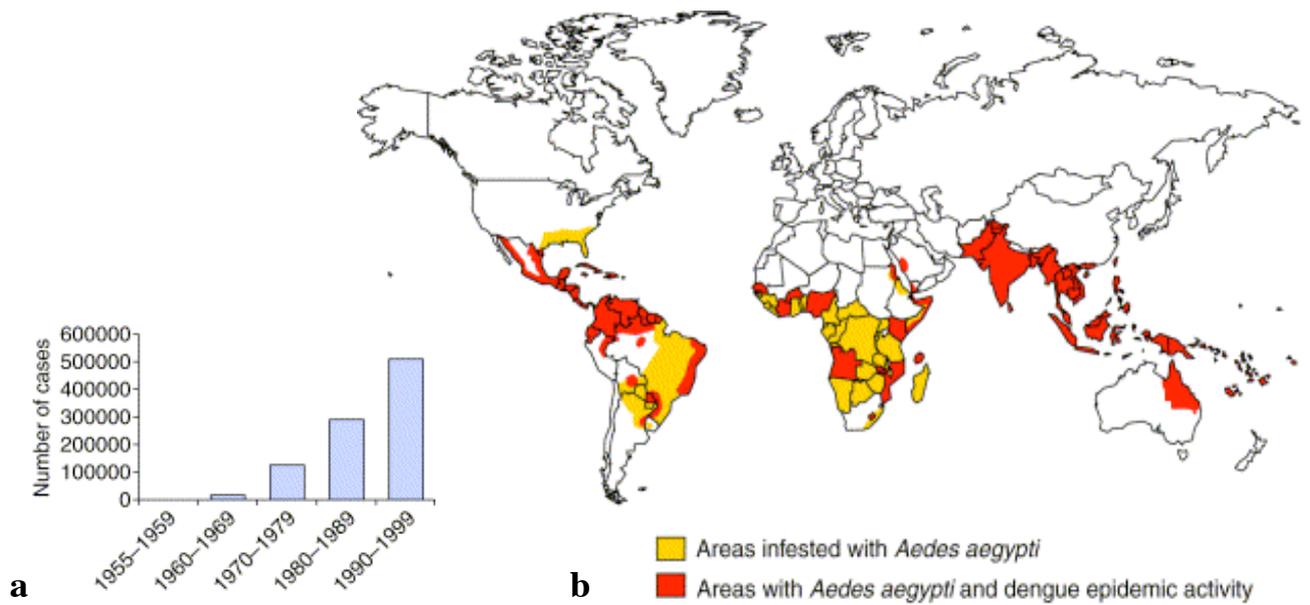


Figure 1 : Epidémiologie de la dengue. (a) Incidence annuelle moyenne des cas de DHF reportés à l’OMS entre 1955 et 1999. (b) Répartitions géographiques du vecteur *Aedes aegypti* et de la maladie (source OMS, 2002).

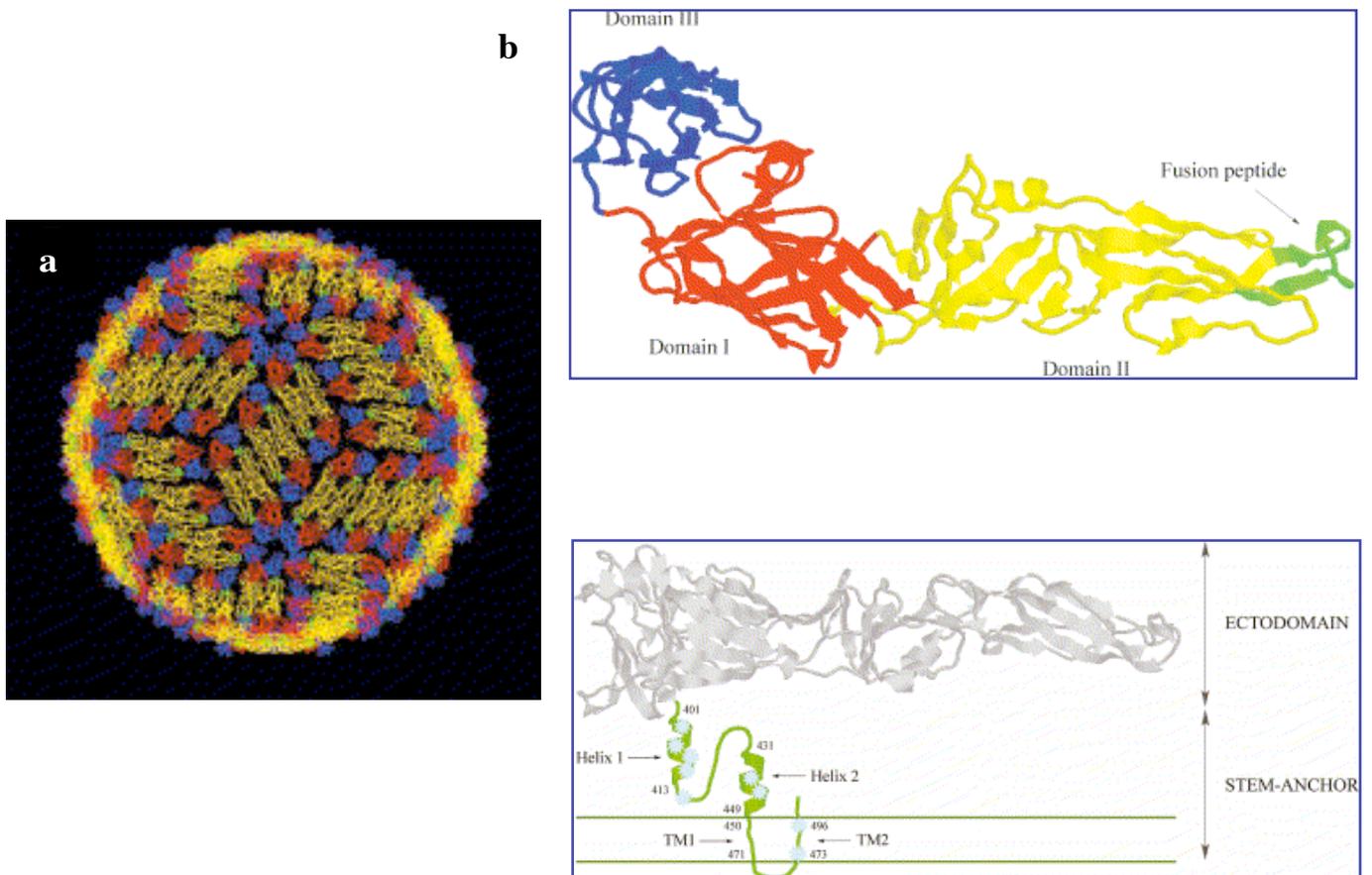


Figure 2 : (a) Structure du virus mature et organisation de gpE à sa surface. Les dimères de gpE se disposent tangentiellement à la surface de la particule virale. Les domaines III sont localisés aux axes de symétrie d'ordre 3 et 5 du virion (Figure reproduite de Kuhn et al., 2002). (b) Représentations schématiques des domaines de repliement de gpE; les domaines I, II et III sont ectoplasmiques (Figures reproduites de Hurrelbrink et McMinn, 2003).

d'éradication et de contrôle des populations de moustiques mises en place dans les années 1970 en Amérique du sud pour lutter contre la fièvre jaune et le paludisme, ainsi que par l'urbanisation croissante accompagnée de conditions d'hygiène et de stockage de l'eau insuffisantes (Gubler, 2002 ; Monath, 1994).

Cette extension a permis la propagation des quatre sérotypes viraux. Parallèlement, de nouvelles formes cliniques de la maladie sont apparues: la fièvre hémorragique de dengue (DHF), décrite en 1953 à Manille, et le syndrome de choc (DSS). Alors que la dengue « classique » précédemment décrite ne met pas en jeu le pronostic vital, la DHF est une complication potentiellement mortelle. Lors de DHF, la fièvre persiste, et des hémorragies multiples, notamment gastro-intestinales, cutanées et cérébrales surviennent souvent, accompagnées d'une hépatomégalie et, sur le plan cytologique, d'une leucopénie et d'une thrombocytopenie. Chez les enfants de moins de quinze ans essentiellement un état de choc hypovolémique peut s'installer (syndrome de choc), résultant in fine en un collapsus cardiovasculaire et à la mort si une thérapie de soutien par perfusion n'est pas mise en place rapidement.

La propagation des quatre virus à de nouvelles zones, couplée à la survenue toujours plus fréquente de formes sévères de la maladie, font de la dengue, autrefois sporadique, une pandémie mondiale et la plus importante arbovirose humaine: 2,5 milliards de personnes sont exposées, 250 000 à 500 000 cas de DHF sont reportés chaque année à l'OMS (soit une augmentation d'un facteur cinq en l'espace de vingt ans), et une estimation porte à 100 millions le nombre total d'infections par an (Figure 1). A côté du taux de létalité qui peut-être élevé dans les cas de DHF mal pris en charge (jusqu'à 20%), ce qui est souvent le cas dans les pays touchés, la dengue a un impact économique important: en unités de « disability-adjusted life years » (DALYs) calculées par la Banque Mondiale, la dengue a autant de poids dans certaines régions que le SIDA ou la tuberculose (Clarke, 2002).

Mécanismes physiopathologiques des formes graves de la dengue

La pathogenèse de la DHF reste mal caractérisée. Le modèle prévalent à l'heure actuelle, mais encore controversé, pour expliquer le développement d'une forme grave de la maladie est la facilitation de l'infection par les anticorps (Antibody-Dependant Enhancement, ADE). Le mécanisme sous-jacent implique la facilitation de l'infection de monocytes/macrophages exprimant les récepteurs au fragment constant des immunoglobulines (FcR) par des virus complexés à des IgG non-neutralisantes, ou présentes à des concentrations sous-

neutralisantes. Décrit pour d'autres virus, le modèle de l'ADE est étayé dans le cas des virus de la dengue par plusieurs études épidémiologiques pro- et rétrospectives et par des expériences *in vitro*. Les cas de DHF surviennent en effet 40 fois plus fréquemment chez des personnes immunisées contre un sérotype et secondairement infectées par un sérotype différent que lors de primo-infection (Halstead, 2003). L'ADE a également été mis en évidence en modèle animal: la virémie est significativement plus élevée chez des singes auxquels un sérum immun anti-dengue a préalablement été administré que chez des animaux n'en ayant pas reçu. Cette observation est à mettre en perspective de statistiques obtenues chez l'homme, montrant une corrélation forte entre la sévérité du tableau clinique et le niveau de virémie lors d'une seconde infection hétérotypique. Ces données ont pu être reproduites en culture de macrophages *in vitro*, en observant une réplication virale augmentée en présence d'un sérum immun dilué (Figure 3; Halstead et al., 2003; Halstead, 2003).

Le modèle de l'ADE pour la dengue est pertinent à l'échelle moléculaire du fait de la proximité antigénique des quatre sérotypes: tandis que l'infection par un sérotype confère une immunité homotypique à vie, celle-ci protège contre une infection hétérotypique efficacement pendant une période de deux mois, partiellement pendant neuf mois, puis plus du tout après un an, d'après une étude de Sabin en 1952. Ces observations s'expliquent par la communauté antigénique des quatre sérotypes: des épitopes partagés seraient à l'origine d'un sérum polyclonal permettant une neutralisation croisée passagère et devenant facilitant à des concentrations sous-neutralisantes. Ceci se produit lors d'infections séquentielles espacées par des sérotypes différents chez l'enfant et l'adulte, mais également chez le nourrisson du fait de la présence d'anticorps maternels (Figure 4), ce cas de figure représentant la plus forte preuve de la validité du modèle (Halstead, 2003).

Le tropisme cellulaire des virus est mal défini, mais le système des phagocytes mononucléés semble être une des principales cibles des virus *in vivo* (Rothman, 2003). L'infection facilitée de cellules du système des phagocytes mononucléés et d'autres cellules exprimant les FcR, par opsonisation ou par simple concentration des virus à la surface des cellules, conduirait à une plus grande quantité de cellules présentatrices d'antigènes infectées (CPA).

Pourtant, le lien entre l'infection, même facilitée, de cellules mononucléées et les changements pathophysiologiques conduisant aux hémorragies reste à établir. Un relarguage accru de cytokines (Interféron γ , tumor necrosis factors α et β , interleukine 2 etc.) par les lymphocytes activés suite au plus grand nombre de CPA exprimant les antigènes viraux,

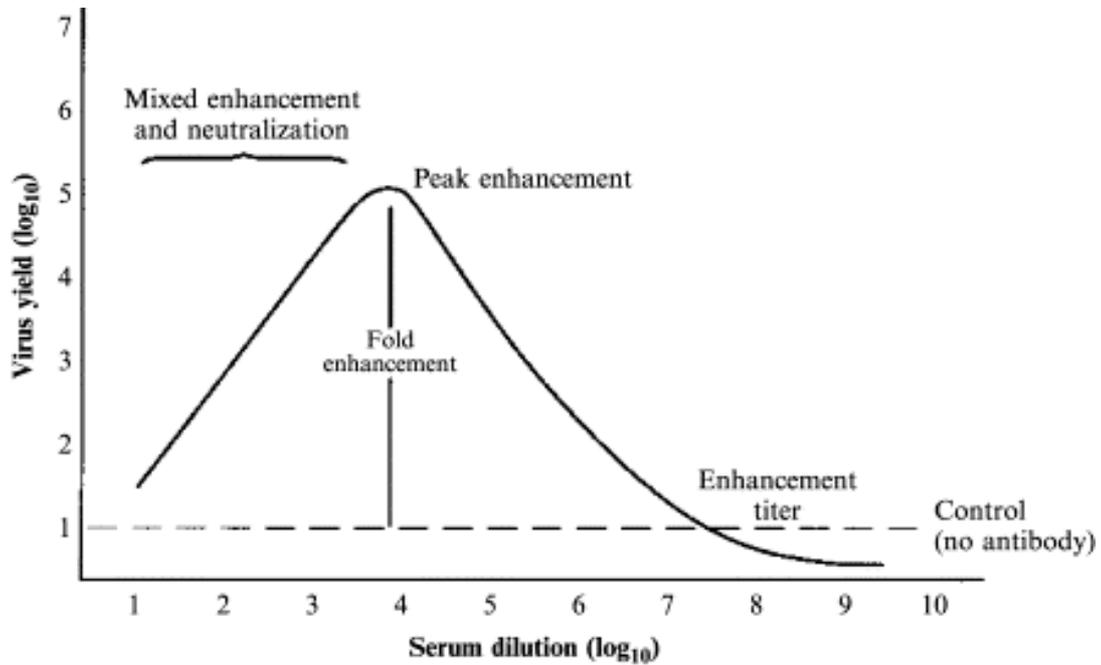


Figure 3 : Illustration du phénomène de facilitation de l'infection dépendant des anticorps (ADE) *in vitro*. Le diagramme définit les différents paramètres de l'ADE. Le test est réalisé en ajoutant le virus et différentes dilutions d'un sérum en culture de phagocytes mononucléés. Pour de faibles dilutions du sérum, une faible, voire aucune répllication virale n'est observée; pour une plus forte dilution, une répllication virale augmentée est observée (au pic de facilitation); pour de plus fortes dilutions, l'effet de facilitation est progressivement perdu (Figure reproduite de Halstead, 2003).

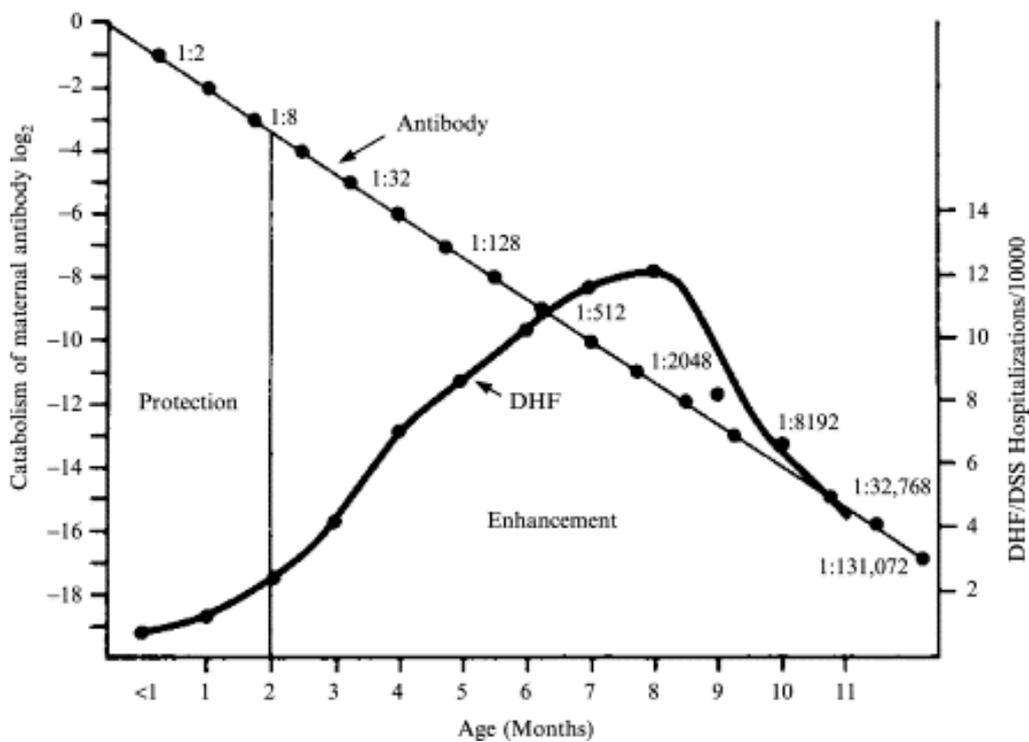


Figure 4 : illustration du phénomène d'ADE *in vivo*. Distribution du nombre de cas d'hospitalisation d'enfants atteints de DHF/DSS en fonction de leur âge ; les anticorps maternels acquis à la naissance sont protecteurs tant que présents à un titre élevé ; après dégradation en dessous du titre protecteur, ils sont à l'origine, du phénomène d'ADE, ces anticorps facilitant disparaissant après un an (Figure reproduite de Halstead, 2003).

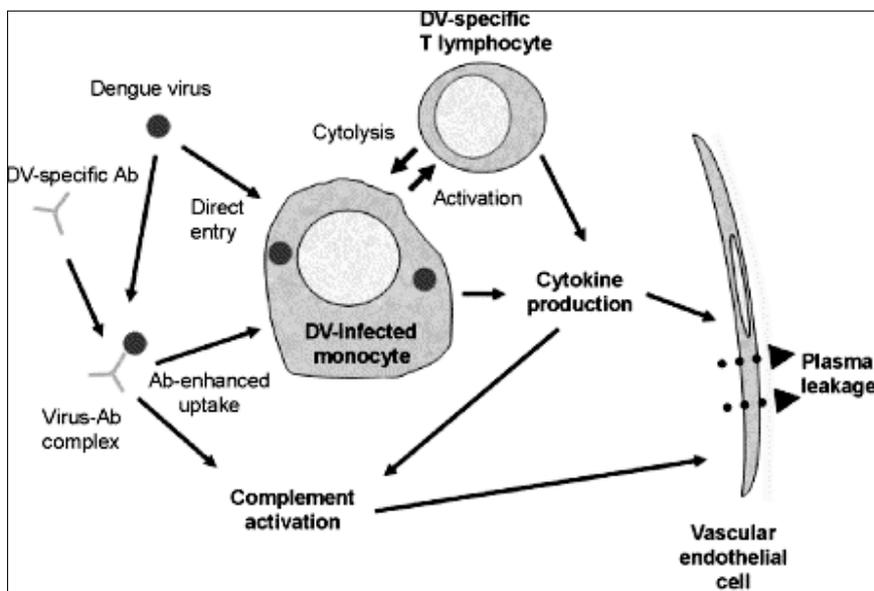


Figure 5 : Modèle d'immunopathogénèse des fuites plasmatiques lors de DHF. Celles-ci seraient causées par l'effet de cytokines telles que l'interféron (INF) ou le Tumor Necrosis Factor (TNF), massivement relarguées suite à une réplication virale facilitée par l'ADE, et par l'activation du complément sur les cellules endothéliales (d'après Rothman, 2003).

pourrait constituer un processus immunopathologique à l'origine de la perméabilité vasculaire conduisant aux hémorragies (Figure 5; Rothman, 2003). De la même façon, le "péché originel" des lymphocytes T, dans lequel des lymphocytes T mémoires cross-réactifs contre un pathogène domine la réponse à un pathogène proche antigéniquement, serait responsable d'une clairance inefficace du virus, tout en provoquant des dommages immunopathologiques (Mongkolsapaya et al., 2003). Enfin, l'activation du complément par les complexes virion-anticorps peut également affecter la perméabilité vasculaire. Pourtant, les facteurs qui déterminent le développement d'une forme grave de la maladie ou, a contrario, la clairance asymptomatique du virus lors d'une seconde infection hétérotypique, restent mal connus. Si des facteurs génétiques (gènes HLA, allèle de DC-SIGN résistant) ont été identifiés, aucun facteur de virulence viral n'a pu être mis évidence (Rothman, 2003).

Lutte anti-dengue

La lutte anti-vectorielle s'étant révélée irréalisable à grande échelle et à long terme, la prophylaxie de la dengue passe par la vaccination préventive, qui n'est pas encore disponible aujourd'hui. Un vaccin anti-dengue doit, entre autres contraintes, conférer une immunité forte et durable contre les quatre sérotypes simultanément. En cas d'échec d'induction d'une immunité multivalente, le vaccin lui-même pourrait en effet être à l'origine de la facilitation de l'infection par un virus sauvage. Plusieurs projets vaccinaux sont en cours (Halstead et Deen, 2002). Parallèlement, le décodage de l'immunologie des quatre sérotypes, afin de

comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la protection versus de la facilitation de l'infection, constitue un enjeu majeur pour le développement d'un vaccin sûr et efficace contre cette maladie.

Etat actuel des connaissances

Dans l'optique de comprendre la réponse immunitaire à médiation humorale contre les virus de la dengue, de nombreux travaux ont porté sur la glycoprotéine d'enveloppe E (gpE), cette protéine structurale étant la principale cible des anticorps neutralisants chez les flavivirus et la seule accessible à la surface du virion (Figure 2) (Kuhn et al, 2002). La protéine gpE est essentielle lors des étapes précoces du cycle viral, puisqu'elle médie l'attachement aux récepteurs cellulaires, participe par suite au tropisme viral, et est responsable de la fusion des enveloppes virale et cellulaire (Mukhopadhyay et al., 2005).

La première détermination de la structure atomique d'une gpE de type II a permis la convergence d'un nombre considérable de données concernant les propriétés antigéniques et biologiques de cette protéine en un modèle de travail sur la relation entre structure et fonction (Rey et al., 1995). Constituée majoritairement de feuilletts β , gpE se compose de quatre domaines de repliement: trois domaines ectoplasmiques, notés E1, E2 et E3 par la suite et exposés à la surface du virus, et un domaine transmembranaire en C-terminal (Figure 2). Les domaines conservent leur structure lors du processus de fusion des membranes virale et cellulaire, mais subissent des changements d'orientation relative, permettant l'insertion du peptide fusogène dans la membrane cellulaire et le rapprochement des membranes virale et cellulaire (Mukhopadhyay et al., 2005).

Les trois domaines structuraux E1, E2, et E3 correspondent très bien aux trois domaines antigéniques A, C et B respectivement définis dans les années 1980 en utilisant des ensembles d'anticorps monoclonaux (mAb). D'où la convergence de l'ensemble de données: dans le modèle entre structure et fonction de gpE, les mAb neutralisants dirigés contre les domaines E1 et E2 agiraient en prévenant le changement de conformation et la trimérisation de gpE et par suite la fusion des enveloppes virale et cellulaire; un second mécanisme de neutralisation par les anticorps pourrait faire intervenir des interactions avec le domaine E3, lequel comporterait les sites de liaison aux récepteurs (Roehrig, 2003). Les arguments en faveur d'un rôle du domaine E3 dans l'interaction virus/cellule chez les Flavivirus sont multiples. Certains sont d'ordre structural, notamment la légère protrusion formée à la surface du virus par E3, et donc son accessibilité, ou encore sa structure en IgG-like (feuilletts béta) retrouvée dans de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire. D'autres découlent

d'observations fonctionnelles: les mAbs au plus fort pouvoir neutralisant sont dirigés contre ce domaine (Crill et Roehrig, 2001); les mutations responsables du changement de tropisme, affectant l'entre virale, et responsables de modifications de la virulence (Roehrig, 2003) y sont localisées; et enfin un domaine E3 recombinant inhibe l'adsorption du virus du Nil occidental en culture cellulaire (Chu et al., 2005).

Pour l'heure, la majorité des épitopes neutralisants étudiés ont été localisés au niveau du domaine E3 par différentes approches (isolement et séquençage de mutants d'échappement à la neutralisation, immunoblotting de fragments de protéine, utilisation de mimotopes) (Roehrig, 2003). Si la région de localisation de ces épitopes a pu être identifiée par ces approches, aucune d'entre elles n'a permis de les cartographier précisément ou complètement. En outre, la plupart des mAb neutralisants étudiés sont dirigés contre le sérotype 2 (Roehrig, 2003). Pourtant, dans le cadre d'un vaccin tétravalent, il est nécessaire d'identifier les épitopes neutralisants à la surface des quatre sérotypes. La topographie antigénique des gpE des quatre sérotypes est encore loin d'être suffisamment aboutie pour servir de fondement à la conception de vaccins efficaces et sûrs.

Contexte du travail

L'anticorps monoclonal 4E11 (noté mAb4E11 par la suite), obtenu par immunisation de souris *Swiss*, est spécifique du complexe des virus de la dengue, ne reconnaissant pas d'autres membres du genre flavivirus, à savoir les virus de la fièvre jaune (YFV), de l'encéphalite japonaise (JEV) et du Nil occidental (WNV) (Mégret et al., 1992). Il neutralise les quatre sérotypes des virus de la dengue *in vitro* avec des efficacités variables, dans l'ordre sérotype 1 > sérotype 2 > sérotype 3 > sérotype 4, et protège la souris contre le sérotype 1 (Thullier et al., 1999). Son épitope a été localisé par immunoblotting dans la région formée par l'intervalle des résidus [298-397] (Mégret et al., 1992). Une région candidate [306-314] a par la suite été identifiée par phage display et confirmée par utilisation de peptides synthétiques (Thullier et al., 2001).

Le programme de recherche développé par le laboratoire est d'établir la cartographie énergétique de l'interaction entre le paratope et l'épitope de mAb4E11, c'est-à-dire d'identifier les résidus responsables de l'énergie d'interaction. Par la suite, le terme épitope fera toujours référence, sauf précision, à l'épitope énergétique de mAb4E11. La compréhension des déterminants moléculaires de l'interaction entre mAb4E11 et le domaine E3 et celle du mécanisme de neutralisation des virus de la dengue par cet anticorps pourraient être mises à

profit pour la conception et l'amélioration de vaccins, mais aussi pour améliorer le diagnostic des infections à flavivirus.

Les résultats du présent mémoire s'appuient sur des résultats qui ont été obtenus dans mon laboratoire d'accueil avant mon arrivée et qui ne sont pas publiés. L'ensemble constitue un même projet de cartographie de l'épitope de l'anticorps mAb4E11 à la surface de la glycoprotéine E des virus de la dengue. A ce titre, il est nécessaire de résumer ces résultats antérieurs dès ce stade du mémoire et de les mettre en perspective de ceux obtenus par mon travail dans la discussion.

Affinité de mAb4E11 pour les quatre sérotypes

Les constantes de dissociation K_D entre le fragment Fab4E11-H6 et les domaines E3.DVi-H6 ($i = 1, \dots, 4$) des quatre sérotypes DV1 à DV4 des virus de la dengue ont été déterminées par ELISA de compétition (Matériels et méthodes) (Tableau I). L'affinité de Fab4E11-H6 pour les domaines E3.DVi-H6 décroît dans l'ordre $DV1 > DV2 > DV3 > DV4$ et celle pour E3.DV1-H6 est 50 000 fois plus forte que celle pour E3.DV4-H6.

Exploration du domaine E3.DV1 par mutagenèse en alanine

Un peptide synthétique, correspondant aux résidus 306-314 du domaine E3.DV1, constitue un mimotope de l'épitope de mAb4E11 (Thullier et al., 2001). Pour analyser les contributions énergétiques de ces différents résidus à l'épitope du mAb4E11, ceux-ci ont été changés en alanine par mutagenèse dirigée dans les domaines E3.DV1-H6 recombinants pour réduire leur chaîne latérale au groupement méthyl. Les K_D entre les domaines E3.DV1-H6 mutants et Fab4E11-H6 ont été mesurées par ELISA de compétition. Les K_D et les énergies libres de dissociation sont résumées dans le Tableau II. Ces résultats sur le domaine E3.DV1-H6 ont montré que les résidus 307-312 constituaient la majeure partie de l'épitope énergétique de mAb4E11.

Des résultats de mutagenèse sur le fragment Fab4E11-H6 indiquaient que l'épitope comprenait d'autres résidus que les précédents. Une exploration du paratope de Fab4E11 par mutagenèse en alanine avait mis en évidence un rôle énergétique majeur des résidus H-Trp96 et H-Glu97 du segment D de la chaîne lourde et suggéré que l'épitope contenait des charges positives pour lier H-Glu97 et une poche hydrophobe pour loger H-Trp96. Les résidus Lys307 et Lys310 de E3.DV1-H6 apportaient probablement les charges positives, et Leu308 était un résidu hydrophobe. L'analyse de l'environnement de Leu308 dans la structure cristallographique de la gpE de sérotype 2 du virus de la dengue (Modis et al., 2003)

a montré l'existence d'un groupement de résidus hydrophobes comprenant Leu387, Leu389 et Trp391 sur un brin- β parallèle. Des mutations en alanine des résidus 386-391 ont montré que les résidus Leu387, Leu389 et Trp391 contribuaient à l'énergie d'interaction entre le paratope et l'épitope de mAb4E11, démontrant la nature discontinue de l'épitope (Tableau II).

Présentation du projet

L'objectif du travail présenté consistait à vérifier la complétude de l'épitope préalablement défini dans le domaine E3.DV1 du virus de la dengue. S'il était complet, son introduction partielle ou complète dans le domaine E3.DV4 du sérotype 4 améliorerait-elle l'affinité du Fab4E11 pour ce domaine? si tel était le cas, une telle transposition confirmerait la cartographie établie et permettrait de comprendre les bases moléculaires pour la reconnaissance croisée des sérotypes 1 et 4 des virus de la dengue, et celles pour les différences d'affinité et de neutralisation entre ces deux sérotypes (Tableau I). De la même façon, l'introduction de l'épitope dans les domaines E3 d'autres flavivirus, si elle s'accompagnait d'une reconnaissance de ces domaines mutants par Fab4E11, devrait permettre de comprendre les déterminants de la spécificité de mAb4E11 pour les virus de la dengue à l'exclusion des autres flavivirus.

Pour ce faire, j'ai progressivement substitué les résidus du domaine E3.DV1 appartenant à l'épitope du mAb4E11 aux résidus correspondants des domaines E3.DV4, E3.JEV et E3.WNV par mutagenèse dirigée. J'ai exprimé les domaines E3.X mutants dans *Escherichia coli* et mesuré la constante de dissociation K_D entre le Fab4E11 et les domaines E3.X mutants par un ELISA de compétition. Les K_D m'ont permis de caractériser énergétiquement l'effet des mutations introduites.

La transposition de l'épitope de mAb4E11 du sérotype 1 de la dengue vers le sérotype 4 a diminué la valeur du K_D pour le ramener au niveau de celui du sérotype 1, suggérant la complétude de l'épitope et expliquant les différences d'affinité de Fab4E11 pour ces deux sérotypes. Les transpositions réalisées dans les virus de l'encéphalite japonaise et du Nil occidental ont confirmé ce résultat, fourni des explications concernant la spécificité de mAb4E11 pour le complexe de la dengue, et montré qu'il est possible de transférer un épitope discontinu et conformationnel dans un contexte structural différent. Cette approche originale a ainsi permis de définir un motif structural, constituant une signature antigénique du complexe des virus de la dengue, transposable dans d'autres flavivirus.

Sérotype	K_D (nM)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)	Ratio K_D
1	0.082 ± 0.005	13.76 ± 0.04	0	1
2	0.43 ± 0.04	12.79 ± 0.05	0.97 ± 0.06	5.3
3	7.9 ± 1.0	11.07 ± 0.07	2.69 ± 0.08	95.6
4	4 100 ± 700	7.36 ± 0.10	6.39 ± 0.11	50 000

Tableau I: Constantes de dissociation à 25°C en solution mesurées par ELISA de compétition et énergies libres associées pour la dissociation entre le Fab4E11-H6 et les domaines E3.DVi-H6. Chaque valeur de K_D est la moyenne obtenue pour au moins trois mesures indépendantes. Ratio K_D désigne le rapport K_D (E3.DVi-H6) / K_D (E3.DV1-H6).

Mutation	K_D (nM)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)
wt	0.13 ± 0.01	13.56 ± 0.05	0 ± 0.07
K307A	80 ± 10	9.69 ± 0.09	3.9 ± 0.1
L308A	4.1 ± 0.2	11.44 ± 0.02	2.1 ± 0.1
E309A	0.6 ± 0.2	12.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1
K310A	540 ± 210	8.5 ± 0.2	5.1 ± 0.2
E311A	0.32 ± 0.07	13.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1
V312A	0.6 ± 0.05	12.69 ± 0.05	0.97 ± 0.07
L387A	0.35 ± 0.05	12.91 ± 0.09	0.6 ± 0.1
L389A	2.5 ± 0.2	11.73 ± 0.04	1.83 ± 0.07
W391A	0.78 ± 0.09	12.43 ± 0.07	1.13 ± 0.08

Tableau II: Mutations en alanine de E3.DV1-H6 ayant un effet significatif ($\Delta\Delta G > 0.5$ kcal.mol⁻¹) sur l'énergie libre d'interaction entre le Fab4E11-H6 et le domaine E3.DV1-H6.

Plasmide	Protéine clonée	Virus d'origine	Souche	N° accès GENBANK
pLB11	E3(296-400)-H6	DV1	FGA/89	AF226687
pLB12	E3(296-400)-H6	DV2	Jamaica/N.1409	M20558
pLB13	E3(296-400)-H6	DV3	PaH881/88	AF349753
pLB14	E3(296-400)-H6	DV4	ThD4-0113-76	AY618949 *
pVP4	E3(294-398)-H6	YFV	17D	X03700
pVP5	E3(299-406)-H6	WNV	IS98-ST1	AY033389
pVP6	E3(298-405)-H6	JEV	SA14	U14163 *

Tableau III: Résumé des plasmides et souches virales utilisés. * les séquences nucléotidiques des souches utilisées (ThD4-0113-76 pour DV4 et SA14 pour JEV) diffèrent des séquences publiées dans GENBANK, mais leur séquence protéique est identique à celle publiée. H6 désigne la queue hexahistidine.

MATERIELS ET METHODES

Souches, plasmides et tampons

Les souches virales de dengue utilisées sont issues de la collection de l'Institut Pasteur. Les plasmides pPE1, pLB11 et pLB14 proviennent de la collection du laboratoire (Tableau III). Le plasmide pPE1 code pour un hybride, Fab4E11-H6, entre le fragment Fab de mAb4E11 et une hexahistidine, selon le format $V_L-C_L::V_H-C_H-H6$ où « - » et « :: » désignent des liaisons covalentes et non covalentes respectivement.

Les souches *Escherichia coli* HB2151, RZ1032 (Kunkel et al., 1987) et BL21(DE3) (Sambrook et al., 2001), le bactériophage helper M13KO7 (Sambrook et al., 2001), le plasmide pET20b+ (Novagen) ont été décrits. Le milieu de culture SB a été décrit (Sambrook et al., 2000); l'ampicilline a été utilisée à une concentration de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le tampon A contenait 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl; le tampon B, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl. La polymixine B sulfate et le dithionitrobenzoate (DTNB) ont été fournis par SIGMA, l'albumine de sérum bovin (BSA) par Roche et la résine NiNTA par Qiagen.

Constructions génétiques

Par la suite, les résidus des domaines E3 seront numérotés en fonction de leur position dans la gpE de chaque flavivirus. Les plasmides pVP4, pVP5 et pVP6 codaient pour les hybrides E3.YFV-H6, E3.WNV-H6 et E3.JEV-H6 entre le domaine E3 des virus YFV, WNV et JEV respectivement, et une hexahistidine. Ils ont été construits de la façon suivante. Le segment d'ADN codant pour les résidus 299 à 399 de E3.WNV a été amplifié par PCR nichée à l'aide de deux paires d'oligonucléotides à partir d'un clone plasmidique. La première paire introduisait un site de restriction NcoI en 5', un site XhoI en 3' et les sept résidus 400 à 406. La seconde amplifiait le premier produit d'amplification. De la même façon, le segment d'ADN codant pour les résidus 298 à 398 de E3.JEV a été amplifié par PCR nichée à l'aide d'oligonucléotides introduisant les sites de restriction NcoI en 5', XhoI en 3', et ajoutant les résidus 399 à 405. Le choix des codons pour les résidus ajoutés s'est fait d'après les séquences publiées (Tableau III) et l'usage des codons dans *E. coli*. Pour E3.YFV, un site de restriction NcoI présent dans le segment d'ADN codant pour E3.YFV a été supprimé au moyen d'une PCR de chevauchement. Les oligonucléotides externes ont apporté les sites de restriction NcoI en 5' et XhoI en 3'. Les produits d'amplification des trois domaines E3.X ont ensuite été digérés par NcoI et XhoI puis ligaturés entre les sites correspondants du plasmide pET20b+

pour donner pVP5, pVP6 et pVP4. Les oligonucléotides utilisés pour les clonages sont répertoriés dans le Tableau IV.

Les mutations et transpositions d'épitope ont été effectuées dans pLB14, pVP4, pVP5 et pVP6 à l'aide d'oligonucléotides comme amorces mutagènes (Tableau V) et les ADN simple brin des plasmides comme matrices (Kunkel et al., 1987). Toutes les constructions génétiques ont été vérifiées par séquençage des régions codantes et de 100 bases en 5' et en 3'.

Production et purification des protéines

Le fragment Fab4E11-H6 a été produit dans la souche HB2151 d'*E. coli* et purifié comme décrit (Bedouelle et al., soumis). Les domaines E3.X-H6 ont été produits à partir des plasmides correspondants dans la souche BL21(DE3). Les bactéries ont été cultivées dans du milieu SB avec ampicilline à 24°C jusqu'à $A_{600nm} = 1.5-2$ puis l'expression du gène recombinant a été induite avec 0.5 mM d'IPTG. Les étapes suivantes ont été effectuées dans du tampon A à 4°C. Les cultures bactériennes ont été centrifugées, les culots bactériens resuspendus dans 1 mg.mL⁻¹ de polymixine B, 5 mM imidazole (25 mL par litre de culture) sous agitation pendant 1 heure, puis la suspension bactérienne centrifugée à 15.000 g pendant 10 minutes. Le surnageant (extrait périplasmique) a été traité avec 1 µg.mL⁻¹ de DNase I, filtré à travers des pores 0,22 µm et chargé sur colonne de résine NiNTA (0.6 mL de résine par litre de culture). Les protéines fixées ont été lavées avec de l'imidazole 5 mM (20 volumes de résine) puis éluées par un gradient discontinu de 20 mM, 40 mM, 100 mM et 1 M imidazole. Les fractions protéiques ont été analysées par gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes; la concentration d'acrylamide:bisacrylamide (29:1) était de 15%. Les fractions les plus pures (homogènes à plus de 95%) ont été rassemblées et dialysées contre le tampon A, et enfin congelées à -80°C.

Tests protéiques

La concentration des domaines E3.X-H6 purifiés a été mesurée par spectrométrie d'absorbance. Les coefficients d'extinction molaire à 280 nm (ϵ_{280nm}), tous égaux à 10.220 M⁻¹.cm⁻¹, ont été calculés comme décrits (Pace et al., 1995).

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à 20°C à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS-5B. Les largeurs de fente étaient de 2.5 nm pour la lumière d'excitation et de 5 nm pour l'émission. La longueur d'onde d'excitation était égale à 278 nm, et le spectre d'émission a été mesuré entre 320 nm et 370 nm. Le pas de longueur d'onde était de 0.5 nm et la durée d'acquisition du signal de 2 secondes pour chaque longueur

d'onde. Le signal de fluorescence pour la fraction protéique (1 μM) a été obtenu en soustrayant le signal du tampon de celui de l'essai. La valeur de la longueur d'onde de fluorescence maximum (λ_{max}) a été obtenue en ajustant l'équation suivante au spectre expérimental, avec les paramètres a , b , c et λ_{max} comme paramètres flottants (Monsellier et Bedouelle, soumis):

$$Y(\lambda) = a + b (\lambda - \lambda_{\text{max}})^2 + c (\lambda - \lambda_{\text{max}})^3$$

Le test d'Ellman a été réalisé comme décrit (Creighton, 1989). Chaque réaction (1 mL) contenait 0.1 M de tampon phosphate, pH 7.3, 6 M chlorure de guanidinium (GdmCl), 1 mM EDTA, 0.15 mM DTNB et $> 3 \mu\text{M}$ de protéine. La L-cystéine a été utilisée pour établir une courbe d'étalonnage et la BSA, qui contient une cystéine libre, comme contrôle positif. La formation de thionitrobenzoate (NTB) à partir du DTNB a été mesurée par l'absorbance à 412 nm. La limite inférieure de sensibilité du spectrophotomètre utilisé (Perkin-Elmer lambda 2) étant de 0.005 unités d' $A_{412 \text{ nm}}$, la limite inférieure de détection était de 0.44 μM de cystéines libres.

ELISA indirect

Les puits d'une plaque de microtitration ont été tapissés par E3.DV1-H6, E3.JEV-H6, E3.WNV-H6 ou E3.YFV-H6 à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les mesures ont été faites à 25°C dans du PBS contenant 1% de BSA. Les protéines immobilisées ont été incubées avec 0.4 nM Fab4E11 pendant 1 heure. Les molécules liées de Fab4E11 ont été incubées avec un anticorps spécifique du fragment Fab d'IgG de souris, conjugué à la biotine (Sigma); un conjugué entre la streptavidine et la phosphatase alcaline (Sigma) a ensuite permis de révéler les anticorps anti-Fab fixés. Les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 405 nm, et les valeurs corrigées par soustraction de l'absorbance du bruit de fond.

Détermination des constantes d'équilibre par ELISA

Les constantes K_D de dissociation à l'équilibre en solution entre le fragment Fab4E11-H6 et les domaines E3.X-H6 et leurs mutants ont été mesurées par un test ELISA de compétition (Friguet et al., 1985). Les mesures ont été faites à 25°C dans du PBS contenant 1% de BSA. Fab4E11-H6 à une concentration constante de 0.2 nM et les domaines E3.X-H6 à 12 concentrations différentes ont été incubés ensemble en solution pendant 20 heures pour atteindre l'équilibre. La concentration en Fab4E11-H6 libre a été ensuite mesurée suivant le même protocole d'ELISA indirect que précédemment, la plaque de microtitration ayant été

cette fois tapissée avec E3.DV1-H6 à 0.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les valeurs d'absorbance à 405 nm des tests ELISA ont fait l'objet du traitement suivant.

Soit l'équilibre d'association et de dissociation entre un anticorps (Ac) et un antigène (Ag) suivant pour donner le complexe Ac:Ag = C.



A l'équilibre, la loi d'action de masse donne la constante de dissociation K_D :

$$K_D = [\text{Ac}][\text{Ag}] / [\text{C}] \quad (1)$$

La conservation de la matière impose ($[\text{Ac}]_0$ et $[\text{Ag}]_0$ concentrations initiales):

$$[\text{Ac}]_0 = [\text{Ac}] + [\text{C}] \quad \text{et} \quad [\text{Ag}]_0 = [\text{Ag}] + [\text{C}] \quad (2)$$

En remplaçant dans (1):

$$[\text{Ac}]^2 + (K_D + [\text{Ag}]_0 - [\text{Ac}]_0) [\text{Ac}] - K_D [\text{Ac}]_0 = 0 \quad (3)$$

L'équilibre a été réalisé dans des conditions telles que l'intensité du signal protéique S est proportionnelle à la concentration en anticorps libre [Ac] (loi du signal) où S_0 est le signal pour $[\text{Ag}]_0$, et S_∞ le signal pour $[\text{Ag}] \rightarrow \infty$.

$$(S - S_\infty) / (S_0 - S_\infty) = [\text{Ac}] / [\text{Ac}]_0 \quad (4)$$

L'équation (4) dans laquelle [Ac] est solution de l'équation (3), a été ajustée aux valeurs expérimentales $A_{405 \text{ nm}}$, avec 2.10^{-10} M pour $[\text{Ac}]_0$, 12 concentrations différentes et fixées pour $[\text{Ag}]_0$, K_D , S_∞ et S_0 étant des paramètres flottants. La valeur de K_D donne directement accès à la variation d'énergie libre de dissociation par la relation:

$$\Delta G = - R T \ln (K_D) \quad (5)$$

Analyse des structures

Les structures cristallographiques des domaines E3 des virus de la dengue (numéro d'accès PDB 1oan pour le sérotype 2 et 1uzg pour le sérotype 3) et de l'encéphalite à tique (1urz), ainsi que les structures des domaines E3 résolues par RMN des virus du Nil occidental (1s6n) et de l'encéphalite japonaise (1pjw), ont été analysées à l'aide des logiciels RasMol 2.7.2.1. (Bernstein, 2000) et WHAT IF (Vriend, 1990).

Plasmide			
résultant	Oligo		
pVP6	For1	5'	GAGCC <u>CCATGGG</u> CACAACCTATGGCATGTGCAC 3'
	For2	5'	GAGCC <u>CCATGGG</u> CACAACCTATG 3'
	Rev1	5'	GAGC <u>CTCGAG</u> TTTGCCCAGGGTGCTACCAGCTTTGTGCCAATGGTGGTTGATCTG 3'
	Rev2	5'	GAGC <u>CTCGAG</u> TTTGCCCAG 3'
pVP5	For1	5'	GAGCC <u>CCATGGG</u> AACAACCTATGGCGTCTGTTC 3'
	For2	5'	GAGCC <u>CCATGGG</u> AACAACCTATG 3'
	Rev1	5'	GAGC <u>CTCGAG</u> TTTGCCAATGCTGCTACCAGACTTGTGCCAATGGTGATTAATCTG 3'
	Rev2	5'	GAGC <u>CTCGAG</u> TTTGCCAATGCTG 3'
pVP4	For1	5'	GAGCC <u>CCATGGG</u> GACATCCTACAAAATATGC 3'
	For2	5'	CTGACACTGG <u>TCATGG</u> CACTGTTGTG 3'
	Rev1	5'	CAGTG <u>CCATGA</u> CCAGTGTGTCAGTTGGG 3'
	Rev2	5'	GAGC <u>CTCGAG</u> CTTTCCTATTGAGCTTCCCTC 3'

Tableau IV: Oligonucléotides utilisés pour le clonage des domaines E3 des virus JEV, WNV et YFV dans pET20b+. CCATGG site de restriction NcoI; CTCGAG site de restriction XhoI; TCATGG et CCATGA site NcoI muté lors de la construction de pVP4. pVP4 code pour E3.YFV-H6, pVP5 pour E3.WNV-H6 et pVP6 pour E3.JEV-H6.

Plasmide			
matrice	Oligo		
pLB14	OL307	5'	CATCTCTTTATCAATTTGAACTTTCCTGAGCA 3'
	OL789	5'	TTCTGCCATCTCTTTTCCAGTTTGAACCTTTCCTGAGCACAT 3'
	OL78912	5'	GCTGTGTTTCTGCCACTCTTTTCCAGTTTGAACCTTTCCTGAGCA 3'
pVP6	JE5	5'	GTGACCAGTGTCCGCAACTTCTTTCTCCAGTTTGAATTTTCTGTGCAC 3'
	JE2	5'	CAGCTTTGTGCCAATGCAGGTTTCACTGCTTGTCTCCCCTTC 3'
pVP5	WN3	5'	TGTGTCTGCGGGAGTTTCTCCAGCTTGAAAGCCTTTGAAC 3'
	WN2	5'	AGACTTGTGCCAATGCAGATTCAGCTGTTGTTCTCCTCTG 3'

Tableau V: Oligonucléotides mutagènes utilisés pour les transpositions de l'épitope du Fab4E11-H6 dans E3.DV4, E3.JEV et E3.WNV. Les mutations apparaissent en italique gras. pLB14 code pour E3.DV4-H6, pVP5 pour E3.WNV-H6 et pVP6 pour E3.JEV-H6.

RESULTATS

Production des domaines E3.X-H6

Les domaines E3.X-H6 de type sauvage et mutants ont été exprimés à partir des plasmides pLB14 et pVP4 à pVP6, sous contrôle d'une séquence signal et sous la forme d'une protéine fusionnée avec une hexahistidine. Ils ont été produits dans l'espace périplasmique de bactéries *Escherichia coli*, un environnement cellulaire où le pont disulfure entre les cystéines 302/333 (DV), 304/335 (JEV), 305/336 (WNV) et 300/330 (YFV) de E3 peut se former. Ils ont été purifiés à partir d'un extrait périplasmique par chromatographie d'affinité sur colonne d'ions nickel. Les mutants des différents domaines ont été produits et purifiés dans les mêmes conditions. Les niveaux de production étaient compris entre 0,5 et 2,2 mg par litre de culture et étaient généralement plus importants pour les protéines parentales que pour leurs dérivés mutants.

Intégrité des domaines E3.X-H6 parentaux

L'intégrité moléculaire et structurale des domaines E3.X-H6 parentaux a été vérifiée par différents tests, faisant intervenir leur poids moléculaire, la formation de leur pont disulfure et leur spectre de fluorescence. Le programme SignalP 3.0 (Brendtsen et al., 2004) prédisait que les précurseurs des domaines E3.X-H6 recombinants étaient clivés entre le peptide signal et le résidu Gly296 (E3.DV4-H6), Gly294 (E3.YFV-H6), Gly299 (E3.WNV-H6) ou Gly298 (E3.JEV-H6), avec une probabilité supérieure à 99% pour chaque construction. Une analyse par spectrométrie de masse, antérieure à mon travail, a montré que le domaine E3.DV1-H6 purifié a la masse attendue. La migration des domaines E3.X-H6 en gel SDS-PAGE a révélé un poids moléculaire concordant avec la valeur attendue, environ 12 kDa. La présence de cystéines libres dans les fractions purifiées de chaque protéine a été analysée par le test d'Ellman. La proportion de cystéines réactives était égale ou inférieure à la limite de détection dans mes conditions expérimentales. Moins de 10% des protéines comportaient des cystéines libres, confirmant la formation du pont disulfure.

Les domaines E3.X-H6 contiennent un résidu unique de tryptophane, en position 391 (numérotation de E3.DV1-H6). Les spectres de fluorescence du domaine E3.DV1-H6 avaient une intensité maximale à une longueur d'onde λ_{\max} de 340 ± 1 nm sous forme native et de 350 ± 1 nm en présence de 8 M urée. Ces valeurs de λ_{\max} étaient compatibles avec l'enfouissement du résidu Trp391 à l'intérieur du domaine E3 dans son état natif, avec son exposition au solvant dans son état déplié, et avec l'aire de surface accessible au solvant (ASA; 20.7%) de sa

chaîne latérale dans la structure cristalline de la gpE du sérotype 2 (Modis et al., 2003). Des expériences préliminaires sur les domaines E3.DV4-H6 et E3.X-H6 des flavivirus indiquent des spectres de fluorescence identiques entre les domaines sauvages et mutants. Ces expériences sont à compléter.

Les domaines E3.X-H6 produits avaient ainsi leur pont disulfure correctement formé et Trp391 enfoui dans leur structure d'après les critères biochimiques et biophysiques précédents. J'ai conclu que leur repliement était correct.

Intégrité des domaines E3.X-H6 mutants

Le programme SignalP 3.0 (Bendsten, 2004) prédisait le même site de clivage entre le peptide signal et le domaine E3.X-H6 de chaque mutant par rapport au domaine parental. Les mutations introduites dans les différents domaines E3.X-H6 ont été parfois nombreuses (jusqu'à 7 résidus) et souvent drastiques en terme de substitution de chaînes latérales, pouvant être à l'origine d'un repliement anormal des domaines. Afin de m'assurer de leur intégrité, j'ai analysé leur masse moléculaire apparente par SDS-PAGE et leur état de repliement au moyen du test d'Ellman et de leur spectre de fluorescence. Les résultats ont été identiques pour un domaine sauvage et les mutants correspondants. La formation du pont disulfure entre les deux cystéines et l'enfouissement du Trp dans la structure des domaines E3.X-H6 n'étaient pas affectés par les mutations introduites. De façon opportune, le pont disulfure et Trp391 se situent aux deux extrémités de l'épitope. En conclusion, le repliement des domaines E3.X-H6 mutants n'était pas affecté par les mutations, et les effets des mutations sur le K_D pouvaient être attribués à un effet local.

Transposition de l'épitope du sérotype 1 vers le sérotype 4 des virus de la dengue

La valeur de K_D est 50 000 fois plus élevée pour E3.DV4-H6 que pour E3.DV1-H6 (Tableau I). Quatre des neuf résidus de E3.DV1-H6 qui sont importants énergétiquement pour l'interaction avec Fab4E11 diffèrent entre les deux sérotypes (Figure 5). Pour tester si ces différences de séquence sont responsables de la différence d'affinité mesurée, j'ai progressivement substitué les résidus de E3.DV4-H6 en question par ceux de E3.DV1-H6. Les valeurs de K_D et de variation d'énergie d'interaction sont résumées dans le Tableau VI. La simple substitution S307K diminuait d'un facteur 100 la valeur de K_D entre E3.DV4-H6 et Fab4E11-H6. Les mutations S307K, I308L et D309E introduites simultanément diminuaient la valeur de K_D au niveau de celle de E3.DV1-H6 (Figure4). Enfin, les quatre changements simultanés S307K, I308L, D309E et M312V diminuaient si fortement le K_D qu'il n'a pas été

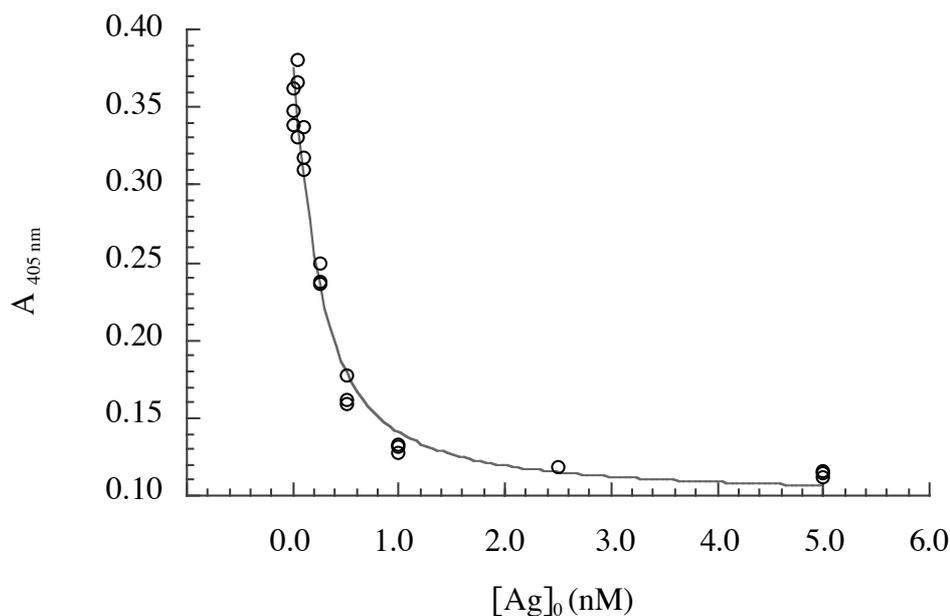


Figure 4: Mesure du K_D entre Fab4E11-H6 et un domaine E3.DV4-H6 mutant. Résultats d'un test ELISA de compétition après transposition des résidus Lys307, Leu308 et Glu309 de E3.DV1 dans E3.DV4. La concentration totale en antigène, ici E3.DV4-H6 muté, est donnée en abscisse. Chaque dilution a été réalisée en triplicata. En ordonnée figure l'absorbance à 405 nm après 3h à 20°C et 12h à 4°C. L'équation (4) page 13 a été ajustée aux valeurs d'absorbance, la concentration en Fab4E11 libre étant solution de l'équation. Ici, $K_D = 0.15 \pm 0.03$ nM ($R = 0.9843$).

E3.X-H6	Résidus transposés	K_D (nM)	Ratio K_D	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G$ (E3.DV1) (kcal.mol ⁻¹)
E3.DV1-H6	wt	0.13 ± 0.01	1	13.56 ± 0.05	0 ± 0.07
E3.DV4-H6	wt	$4\ 100 \pm 700$	50 000	7.4 ± 0.1	6.4 ± 0.1
E3.DV4-H6	307	13 ± 2	100	10.77 ± 0.09	2.8 ± 0.2
E3.DV4-H6	307/8/9	0.07 ± 0.02	0.5	14.0 ± 0.2	-0.4 ± 0.2
E3.DV4-H6	307/8/9/12	< 0.05	< 0.4	> 14.1	< -0.54
E3.JEV-H6	Epitope	3.8 ± 0.8	30	11.5 ± 0.1	2.1 ± 0.2
E3.WNV-H6	Epitope	9.2 ± 6.8	71	11.2 ± 0.6	2.4 ± 0.6

Tableau VI: Résultats des transpositions de l'épitope du Fab4E11-H6 dans E3.DV4-H6, E3.JEV-H6 et E3.WNV-H6. Les constantes de dissociation à 25°C en solution mesurées par ELISA de compétition et les énergies libres associées pour la dissociation entre le Fab4E11-H6 et les différents domaines sont rapportées. Chaque valeur de K_D est la moyenne obtenue pour au moins trois mesures indépendantes. Ratio K_D désigne le rapport $K_D(E3.X)/K_D(E3.DV1)$. $\Delta\Delta G(E3.DV1) = \Delta G(E3.X) - \Delta G(E3.DV1)$.

possible de déterminer précisément sa valeur avec notre protocole d'ELISA de compétition. Ces résultats ont confirmé l'appartenance des résidus 307-312 à l'épitope de mAb4E11 et fourni une explication structurale aux différences d'affinité entre les sérotypes 1 et 4 des virus de la dengue (voir Discussion).

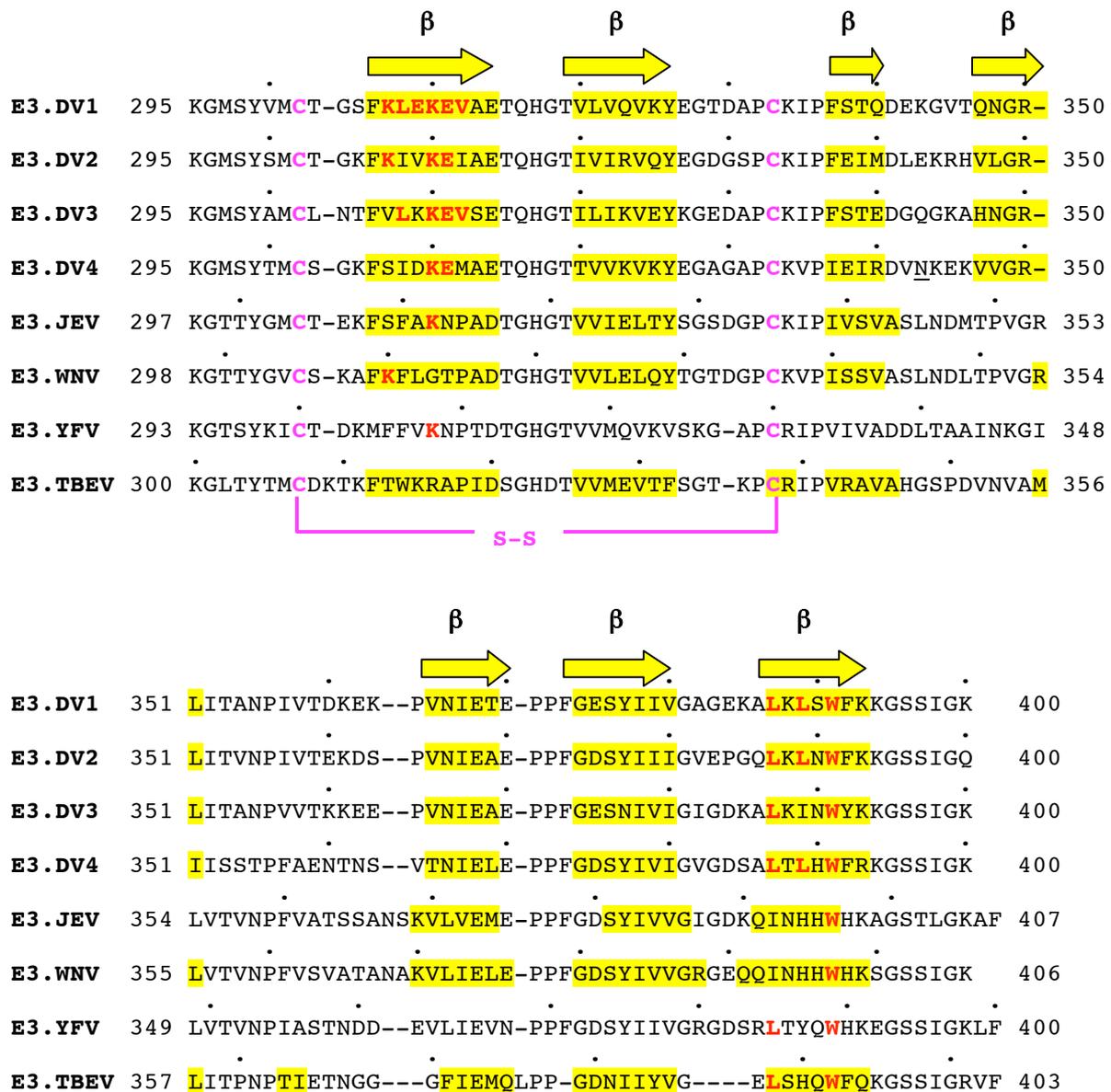
Absence de reconnaissance entre Fab4E11 et d'autres flavivirus

La spécificité antigénique de mAb4E11 a été étudiée par immunofluorescence et western-blot sur cellules C6/36 infectées par différents flavivirus (Mégret et al., 1992). L'absence de reconnaissance croisée par mAb4E11 de WNV, de JEV et de YFV avait permis de conclure à la spécificité de mAb4E11 pour le complexe des virus de la dengue. Afin de confirmer la spécificité de mAb4E11 pour le complexe dengue, un ELISA indirect entre Fab4E11 et les domaines E3.DV1-H6, E3.JEV-H6, E3.WNV-H6 et E3.YFV-H6 a été réalisé. Les puits d'une plaque de microtitration ont été tapissés avec une concentration importante de protéines ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Au terme de la révélation, qui a été volontairement prolongée (3h à 20°C, puis 20h à 4°C), l'absorbance $A_{405\text{nm}}$ pour E3.DV1-H6 était de 3.4 ± 0.4 , de 0.025 ± 0.004 pour E3.JEV-H6, et inférieure pour E3.WNV-H6 et E3.YFV-H6. Par conséquent, l'intensité du signal pour les domaines E3 des trois flavivirus utilisés était inférieure à 1% de celle mesurée avec E3.DV1-H6. Par ailleurs, un ELISA de compétition mené avec E3.JEV-H6 n'a pas permis de calculer une valeur de K_D sur la gamme de concentrations utilisée, et a permis de conclure que $K_D \geq 1 \mu\text{M}$. Ces résultats montrent que Fab4E11 ne reconnaît pas le domaine E3.X-H6 de ces trois flavivirus.

Transposition de l'épitope du sérotype 1 dans les domaines E3.X-H6 d'autres flavivirus

L'homologie de séquence en acides aminés entre les virus de la dengue et les autres flavivirus est d'environ 40% pour la gpE. Comme attendu à ce niveau d'identité, les structures des domaines E3 de WNV (Volk et al., 2004) et de JEV (Wu et al., 2003) résolues par RMN sont similaires à celles pour les sérotypes 2 (Modis et al., 2003) et 3 (Modis et al., 2005) des virus de la dengue résolues par radio-cristallographie. Les similarités de structure (Figure 5) ont suggéré qu'il serait possible de transposer l'épitope de E3.DV1-H6 vers ces domaines comme vers E3.DV4-H6. Pour les régions 307-314 et 387-391 prises ensemble, l'homologie entre le sérotype 1 du virus de la dengue et YFV, WNV ou JEV, est de 23%. Pour tester si les différences de séquence et/ou de structure locale étaient responsables de la spécificité de Fab4E11 pour le complexe des virus de la dengue, son épitope a été transposé dans E3.JEV-H6 et E3.WNV-H6.

L'épitope a pu être transposé dans sa totalité dans E3.JEV-H6 au moyen des mutations S309K, F310L, A311E, N313E, P314V, I392L et H394L, Lys312 correspondant à Lys310 et Trp396 correspondant à Trp391 étant conservées entre E3.JEV et E3.DV1. La valeur de K_D mesurée par ELISA de compétition entre Fab4E11 et ce mutant (noté E3.JEV-H6 + épitope, Tableau VI) était égale à 3.8 ± 0.8 nM, c'est-à-dire environ deux fois plus faible que le K_D pour E3.DV3-H6 (Tableau I). J'ai également transposé une partie de l'épitope dans E3.WNV-H6 par les mutations L311F, L312E, G313K, I393L et H395L. La valeur de K_D pour ce mutant (noté E3.WNV + épitope, Tableau VI) était de 9 ± 7 nM. Ces résultats confirment l'appartenance de ces résidus à l'épitope de mAb4E11, et expliquent l'absence de reconnaissance de ces deux flavivirus par mAb4E11.



DV1 souche FGA/89. Numéro d'accès GENBANK AF226687.
 DV2 souche Jamaica/N.1409. Numéro d'accès GENBANK M20558.
 DV3 souche PaH881/88. Numéro d'accès GENBANK AF349753.
 DV4 souche ThD4-0113-76. Numéro d'accès GENBANK AY618949.
 JEV souche 95-91. Numéro d'accès GENBANK AAR25540.
 WNV souche Isr00-Eq1. Numéro d'accès GENBANK AAK58102.
 YFV souche 17D. Numéro d'accès GENBANK P03314.
 TBEV isolat 4387. Numéro d'accès PDB 1URZF.

Figure 5: Alignement des structures primaires et secondaires des domaines E3 des virus de la dengue (sérotypes 1, 2, 3 et 4), JEV, WNV, YFV et TBEV. La structure secondaire est indiquée au-dessus des séquences. L'épitope énergétique de Fab4E11 est indiqué en rouge. Les résidus formant des brins- β sont surlignés en jaune. La numérotation des résidus est propre à chaque gpE.

DISCUSSION

Structure de l'épitope de mAb4E11

Les 19 mutations en alanine introduites ont permis d'identifier neuf résidus du domaine E3.DV1 qui contribuent à l'épitope énergétique de mAb4E11 ($\Delta\Delta G \geq 0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$), à savoir les résidus 307-312, 387, 389 et 391. J'ai confirmé l'importance des résidus 307-309 et 312 par leur transposition dans E3.DV4. Les résidus Lys307, Leu308, Lys310 et Leu389 forment des points chauds d'interaction avec $\Delta\Delta G \geq 1.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Ainsi l'épitope reconnu par mAb4E11 est discontinu. Les brins 306-314 et 387-393 sont au bord de deux feuillets β différents qui s'associent par des interactions tertiaires dans la structure de la gpE de sérotype 2 (Modis et al., 2003). Le squelette polypeptidique des résidus 305-315 s'associe à celui des résidus 319-329 de façon antiparallèle au bord du premier feuillet- β . De même, le squelette des résidus 387-393 s'associe à celui des résidus 374-380 de façon antiparallèle au bord du second feuillet β . Par conséquent l'épitope de mAb4E11 chevauche les bords de deux feuillets β qui s'associent par des interactions tertiaires. C'est un épitope discontinu et conformationnel. L'épitope complet n'est formé que si le domaine E3 est correctement replié, ce qui a été vérifié en testant la formation du pont disulfure Cys302-Cys333 au moyen du test d'Ellman et l'enfouissement du Trp391 au moyen du spectre de fluorescence. La conformation du segment continu 307-312 dans le contexte du domaine E3.DV1 est importante pour la reconnaissance par mAb4E11, comme le montre la somme des $\Delta\Delta G$ pour les résidus 307-312 du domaine E3.DV1, égale à $13.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, supérieure de 6 kcal.mol^{-1} au ΔG pour le peptide synthétique correspondant (Thullier et al., 2001). Les résidus 309-311 forment une bulle hors du brin- β 306-314, fortement exposée à la surface du domaine E3.DV2 du virus, puisque E3 est localisé aux axes de symétrie d'ordre 3 et 5 du virion et fait protrusion à sa surface (Figure 1) (Kuhn et al, 2002). Cette bulle existe dans les structures d'autres flavivirus. Elle pourrait avoir un rôle fonctionnel et être particulièrement immunogène. La partie aliphatique de la chaîne latérale pour Lys307, et les chaînes latérales des résidus Leu308 et Val312 forment des interactions tertiaires avec Leu387, Leu389 et Trp391. Ces six résidus forment une poche hydrophobe qui pourrait accueillir le résidu H-Trp96 du segment D de l'anticorps mAb4E11 (Figure 6).

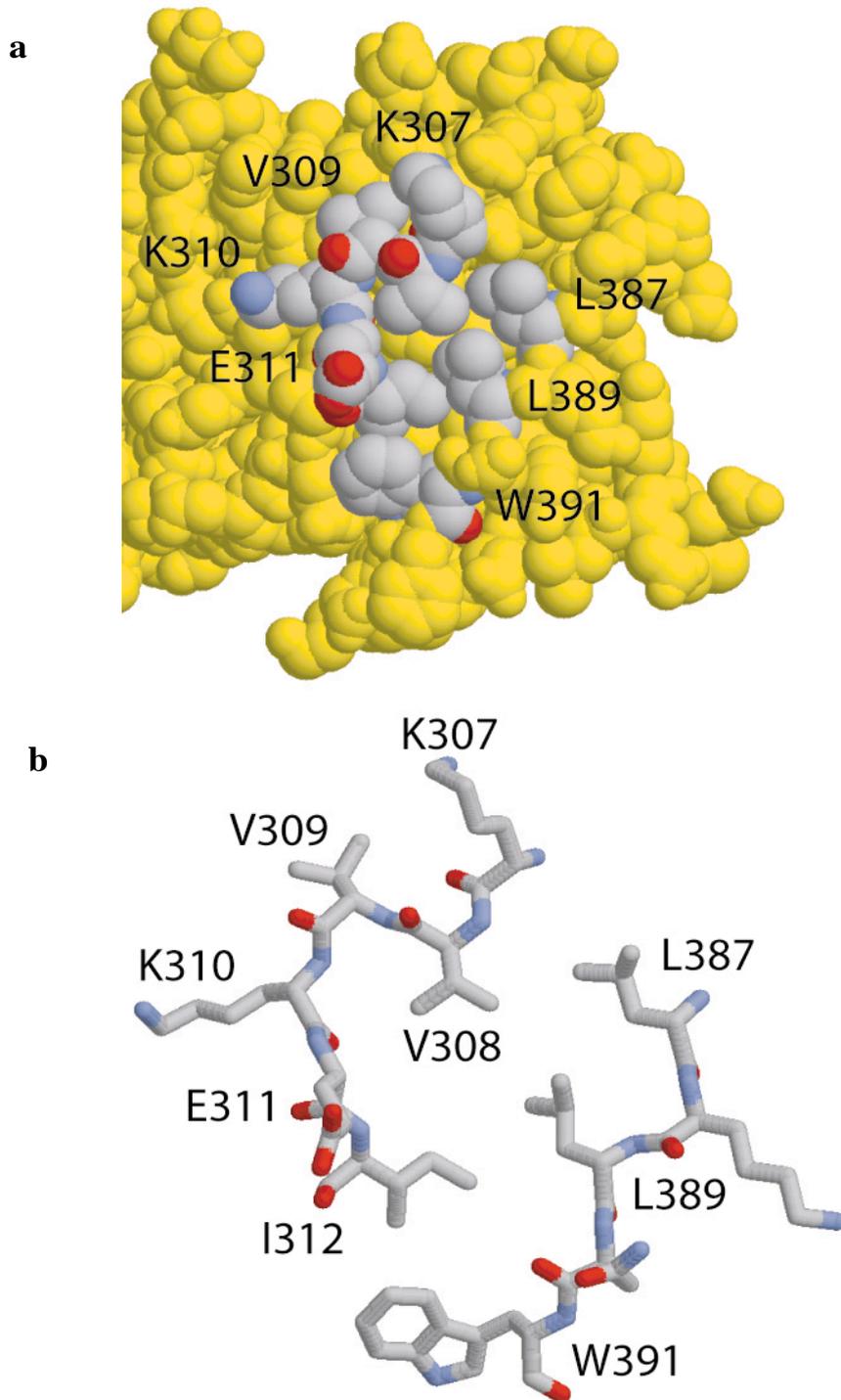


Figure 6: Epitope discontinu et conformationnel de mAb4E11 dans la structure cristallographique de gpE du sérotype 2 du virus de la dengue (1oan). (a) En jaune, résidus de la gpE; en gris, représentation en sphères de Van der Waals des résidus responsables de la majeure partie de l'énergie d'interaction entre E3.DV1 et Fab4E11. (b) Représentation en bâtonnets. Les résidus 307-312 et 387-391 appartiennent à deux feuillettes β différents. Les résidus V308, L387, L389 et W391 forment une poche hydrophobe qui pourrait accueillir H-W96 du segment D de mAb4E11. Les résidus 309-311 forment une bulle fortement exposée à la surface de E3.

Complétude de l'épitope

Les variations d'énergie d'interaction entre E3.DV1 et Fab4E11 pour les neuf mutations qui ont des effets significatifs ($\Delta\Delta G \geq 0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$), ont une somme égale à $17.08 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Cette somme se décompose en $13.53 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour les résidus 307-312 et $3.55 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour les trois résidus Leu387, Leu389 et Trp391. Elle est supérieure à l'énergie d'interaction $\Delta G = 13.56 \text{ kcal.mol}^{-1}$ entre E3.DV1 et Fab4E11. Cette comparaison suggère que les neuf résidus identifiés constituent l'intégralité de l'épitope et montre que les effets des mutations ne sont pas indépendants, certains résidus de l'épitope formant des interactions entre eux d'après la structure cristalline de E3.DV2.

J'ai confirmé la complétude de l'épitope énergétique par les différentes transpositions réalisées. Les résidus 307, 308, 309 étaient à eux seuls responsables de la différence d'énergie d'interaction de $6.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ existant entre Fab4E11 et soit E3.DV1, soit E3.DV4, comme l'a montré leur transposition dans E3.DV4 (Tableau VI). L'introduction de l'épitope dans sa totalité dans E3.JEV donnait une énergie d'interaction de $11.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$, soit 2 kcal.mol^{-1} de moins que celle pour E3.DV1. Cette différence, équivalente à une ou deux liaisons hydrogène, pourrait venir de l'environnement structural différent de l'épitope dans les domaines E3.DV1 et E3.JEV.

Bases moléculaires de la reconnaissance croisée des quatre sérotypes de la dengue

La comparaison des séquences de 20 souches de chaque sérotype, isolées à différentes époques et dans différentes régions du globe, a montré une très bonne conservation des résidus constituant l'épitope énergétique au sein de chaque sérotype. La seule variation concerne le résidu 308 de E3.DV2, qui prend les valeurs Ile ou Val avec les mêmes occurrences. La séquence de l'épitope semble donc très bien conservée au sein de chaque sérotype.

Les constantes de dissociation entre Fab4E11 et les domaines E3.DVi des quatre sérotypes varient d'un facteur jusqu'à 50 000 (Tableau I). Parmi les neuf résidus de l'épitope, Lys310, Glu311, Leu 387 et Trp391 sont conservés entre les quatre sérotypes (Figure 5). Par conséquent, il reste cinq résidus pour expliquer les différences d'affinité. Parmi ces cinq positions, trois constituent des points chauds d'énergie d'interaction, Lys307, Leu308 et Leu389. Les résidus 308 et 389 apparaissent relativement conservés puisqu'ils prennent les valeurs Leu ou Ile. Par conséquent, Lys307 apparaît comme un site important de discrimination entre sérotypes. De fait, Lys307 est présent dans E3.DV1 et E3.DV2, changé en Val307 dans E3.DV3 et en Ser307 dans E3.DV4. La chaîne latérale de Val307 est

hydrophobe; elle peut mimer partiellement la partie aliphatique de celle de Lys307, et participer à la formation de la poche hydrophobe mentionnée ci-dessus. Par contre, Ser307 introduit un résidu polaire, incompatible avec une poche hydrophobe. Ainsi, il y a une relation claire entre les propriétés physico-chimiques du résidu en position 307 et l'affinité pour Fab4E11. De façon compatible, j'ai montré que la mutation S307K dans E3.DV4 diminuait à elle seule le K_D pour Fab4E11 d'un facteur 100, correspondant à une variation d'énergie libre d'interaction de $2.8 \pm 0.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Tableau VI). Pour confirmer ces hypothèses, des transpositions analogues à celles effectuées dans E3.DV4 restent à faire dans E3.DV2 et E3.DV3.

Contre-spécificité pour les autres flavivirus

Les domaines E3.X-H6 des virus JEV, WNV et YFV n'étaient pas reconnus par Fab4E11 en ELISA indirect. Cette absence de reconnaissance a confirmé la spécificité de l'anticorps 4E11 pour le complexe de la dengue décrite antérieurement (Mégret et al., 1992). La conservation des séquences, la conservation des résidus de cystéines et celles des structures disponibles suggèrent que le repliement des glycoprotéines E est conservées entre les flavivirus (Figure 5). J'ai manipulé les domaines E3.X-H6 de flavivirus représentatifs pour comprendre les bases structurales de la spécificité de mAb4E11 envers le complexe des virus de la dengue à l'exclusion des autres flavivirus. Ainsi, l'épitope défini dans E3.DV1-H6 a-t-il été transposé totalement dans E3.JEV et partiellement dans E3.WNV (à l'exclusion de E311 et V312). La constante de dissociation K_D entre Fab4E11-H6 et ces domaines E3.X-H6 chimériques a pu être mesurée par ELISA de compétition. Sa valeur était de l'ordre de celle pour E3.DV3-H6, et elle a montré qu'il est possible d'introduire l'épitope discontinu du Fab4E11 dans un contexte structural distinct.

L'analyse des points chauds d'énergie d'interaction entre Fab4E11 et le domaine E3.DV1-H6 permet de mieux comprendre les bases de la spécificité (Figure 5). Le résidu 307 est très variable parmi les flavivirus, et même entre les quatre sérotypes de la dengue (voir ci-dessus). JEV porte Ser309 en position équivalente, qui pourrait être un déterminant négatif de spécificité vis-à-vis de mAb4E11, comme établi pour le sérotype 4 de la dengue (voir ci-dessus).

Les résidus Leu/Ile308 et Leu/Ile389 forment le centre d'une poche hydrophobe chez les virus de la dengue; ils sont remplacés par des résidus encombrants chez les autres flavivirus, aromatiques Phe/Trp en position équivalente à 308, et cycliques His/Trp en position équivalente à 389. Ces remplacements suggèrent que la poche hydrophobe chez les

virus de la dengue pourrait fixer le résidu H-Trp96 du mAb4E11 et être un déterminant positif de spécificité. L'encombrement de cette poche par les résidus Trp/Phe/His/Tyr serait un déterminant négatif de spécificité chez les autres flavivirus. Il serait intéressant de transposer uniquement la région [307-312] dans E3.JEV et E3.WNV afin d'évaluer l'importance de la région [387-391] comme déterminant négatif de spécificité de mAb4E11 pour ces virus.

Le résidu Lys310 est conservé sous la forme Lys/Arg chez tous les flavivirus, sauf WNV, où il est remplacé par Gly313. Par conséquent Lys310 est un déterminant positif de spécificité vis-à-vis des virus de la dengue par rapport au WNV.

Bien que le résidu Val312 ne soit pas un point chaud d'énergie d'interaction ($\Delta\Delta G = 0.97 \pm 0.07 \text{ kcal.mol}^{-1}$), il est intéressant de discuter sa nature. Ce résidu prend les valeurs Val/Ile/Met312 chez les virus de la dengue, et il contribue aux différences d'affinité entre les sérotypes comme le montre l'effet positif de la mutation M312V dans le domaine E3.DV4. Ce résidu prend la valeur Pro chez tous les autres flavivirus. Dans la structure du TBEV, Pro318 en position équivalente est enfoui et interagit fortement avec le cycle aromatique enfoui du Trp314 (Leu308 chez DV1) et avec His390 (Leu389 chez DV1). Ainsi, la triade Leu/Ile308, Val/Ile/Met312, et Leu/Ile389 chez les virus de la dengue, est-elle remplacée par Trp/Phe, Pro et His/Tyr respectivement chez les autres flavivirus. Le résidu Pro pourrait être un déterminant négatif de spécificité. Son rôle précis reste à analyser par construction de mutants additionnels. Plus généralement, certaines constructions relatives aux transpositions de l'épitope dans les domaines E3.X-H6 de flavivirus restent à construire et/ou à caractériser, notamment des transpositions dans E3.YFV.

Corrélation avec la neutralisation

Les constantes de dissociation du Fab4E11 pour les domaines E3.DVi ($i = 1, \dots, 4$) varient dans les rapports 1, 5, 100 et 50 000 (Tableau I). Des tests de neutralisation ont montré que les titres de mAb4E11 qui donnent une réduction de 50 % du nombre d'UFP (Unités Formant Plage), varient dans les rapports 1, 8, 8, et > 8 respectivement. Ces mêmes tests ont montré que le Fab4E11 est également neutralisant, mais avec des titres de demi-neutralisation plus élevés (Thullier et al., 1999). Ainsi, les affinités du Fab4E11 envers les domaines E3.DVi des quatre sérotypes des virus de la dengue, et les pouvoirs neutralisants du mAb4E11 envers ces mêmes sérotypes varient dans le même ordre, sans que cette relation d'ordre entre affinité et pouvoir neutralisant ne constitue une corrélation au sens strict, puisque les pouvoirs neutralisants du mAb4E11 envers les virus des sérotypes 2 et 3 sont identiques, alors que l'affinité du Fab4E11 est 20 fois plus élevée pour le domaine E3.DV2 que pour E3.DV3.

La différence de pouvoir neutralisant entre mAb et Fab a déjà été discutée (Thullier et al., 1999). Elle pourrait venir d'un effet d'avidité puisque le mAb est bivalent pour la fixation de son antigène, le Fab est monovalent, et l'épitope du mAb4E11 est présent en 180 copies à la surface du virus (Figure 1) (Kuhn et al., 2002). Cette différence pourrait également venir des encombrements stériques différents du mAb et du Fab. L'absence de corrélation stricte entre pouvoir neutralisant et affinité pourrait venir du fait que les souches de virus de la dengue qui ont servi pour les tests de neutralisation, sont différentes des souches qui ont servi pour le clonage des domaines E3.DVi. Elle pourrait également résulter d'une interaction légèrement différente entre mAb4E11 et son épitope dans le contexte du virus entier et dans le contexte du domaine E3 isolé.

L'existence d'une relation entre affinité et pouvoir neutralisant a été débattue. Elle est généralement admise, spécialement pour des antigènes monovalents mais également pour des virus (Burton, 2002). L'existence d'une telle relation suggère que l'obtention de mutants du Fab4E11 qui auraient des affinités améliorées envers les domaines E3.DV3 et E3.DV4 tout en conservant leurs affinités élevées pour E3.DV1 et E3.DV2, pourraient avoir des pouvoirs neutralisants égaux envers les quatre sérotypes des virus de la dengue. De tels dérivés du mAb4E11, une fois humanisés, pourraient constituer des molécules thérapeutiques.

Mécanisme de neutralisation et comparaison avec d'autres flavivirus

Les arguments en faveur d'un rôle du domaine E3 dans l'interaction virus/cellule chez les flavivirus sont multiples. Certains sont d'ordre structural, notamment la légère protrusion formée à la surface du virus par E3 et donc son accessibilité, ou encore sa structure de type IgG, retrouvée dans de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire. D'autres découlent d'observations fonctionnelles: les mAbs au plus fort pouvoir neutralisant sont dirigés contre ce domaine (Crill et Roehrig, 2001); des mutations affectant le tropisme, l'entrée virale, ou la virulence y sont localisées (Hurrelbrink et McMinn, 2003); et enfin un domaine E3 recombinant inhibe l'adsorption du virus en culture cellulaire (Hung et al., 2004).

En particulier, plusieurs résidus du domaine E3 qui font partie de l'épitope du mAb4E11, ont été impliqués dans la biologie des virus de la dengue ou d'autres flavivirus, et de nombreuses mutations d'échappement aux anticorps neutralisants chez différents flavivirus se concentrent dans cette région de E3 (Hurrelbrink et McMinn, 2003). Ces données suggèrent l'existence d'épitopes neutralisants analogues pour d'autres flavivirus dans cette région du domaine E3 critique pour le tropisme des virus, et proche du site de liaison aux récepteurs proposé par certains groupes (Rey et al., 1995; Volk et al., 2004). mAb4E11

pourrait ainsi être neutralisant et protecteur en interférant stériquement et en inhibant de façon compétitive la fixation du virus à ses récepteurs cellulaires. Réciproquement, il serait intéressant de tester si les changements de résidus effectués dans le domaine E3.DV1 et qui affectent fortement l'interaction avec mAb4E11, affectent l'adsorption du virus aux cellules, ce qui permettrait de cartographier les sites d'interaction entre E3.DV1 et les cellules de moustique ou de mammifère.

Conclusion

L'approche méthodologique que j'ai suivie, à savoir la transposition de tout ou partie de l'épitope de mAb4E11 à partir du virus de sérotype 1 de la dengue vers d'autres flavivirus, suivie par l'analyse de l'affinité entre mAb4E11 et les domaines E3 chimériques par ELISA de compétition, a permis de répondre aux questions qui se posaient après la cartographie de l'épitope de mAb4E11. J'ai ainsi confirmé l'importance des résidus identifiés par mutation en Ala pour l'interaction entre épitope et paratope, et proposé des mécanismes structuraux pour la spécificité de mAb4E11 envers les virus de la dengue et pour les différences de neutralisation envers les quatre sérotypes de ces virus. L'originalité de l'approche par transposition d'épitope a permis de caractériser un épitope neutralisant, discontinu, conformationnel, et constituant une signature antigénique des virus de la dengue.

PERSPECTIVES

La cartographie de l'épitope pourra être complétée par deux approches. La première consistera à mesurer les K_D entre mutants du Fab4E11 et mutants du domaine E3.DV1 et permettra de déterminer les résidus en interaction énergétique par l'analyse de cycles thermodynamiques. La seconde sera la résolution de la structure cristallographique du complexe entre le Fab4E11 et le domaine E3.DV1, qui permettra de définir l'épitope non plus énergétiquement, mais en mettant en évidence les résidus en contact topologique.

L'ensemble des mutants des domaines E3.DV1 pourront par ailleurs être utilisés pour cartographier le site d'interaction entre ce domaine et les récepteurs cellulaires du virus, en utilisant les méthodologies décrites par d'autres groupes pour le domaine E3.DV2 de type sauvage (Hung et al., 2004). Ainsi il sera possible de comprendre les bases structurales des interactions entre ce domaine viral, des anticorps neutralisants et les récepteurs cellulaires, et les mécanismes fins de neutralisation.

L'ensemble des résultats du laboratoire font de la cartographie de cet épitope la plus aboutie de celles effectuées sur les virus de la dengue à ce jour, et viennent enrichir les données sur l'antigénicité des virus de la dengue. La cartographie de l'épitope énergétique de mAb4E11 pourra être exploitée dans différents champs d'application. Les infections à flavivirus induisent des anticorps spécifiques de type, mais aussi de complexe et de groupe, rendant parfois difficile le diagnostic, notamment dans des régions où sévissent plusieurs flavivirus, ce qui sera de plus en plus le cas à l'avenir suite à l'expansion de ces arboviroses; à ce titre, mAb4E11 peut constituer une sonde spécifique du complexe de la dengue. En outre, E3 contient surtout des épitopes sub-complexe et complexe spécifiques, contrairement à E2; les domaines E3.DVi recombinants pourraient constituer des sondes antigéniques spécifiques de type. Dans le cadre d'une utilisation vaccinale, son immunogénicité chez l'homme doit être évaluée; est-ce un épitope restreint à la souris, ou est-il immunodominant? Dans ce dernier cas, l'induction vaccinale d'anticorps liant cet épitope doit être évaluée, voire renforcée en améliorant son immunogénicité. L'espoir qu'un vaccin sûr et efficace contre les virus de la dengue devienne une réalité dans les prochaines années est en effet permis; contrairement à des agents pathogènes tels que le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), *Bacillus tuberculosis* ou *Plasmodium spp.*, contre lesquels il est difficile d'induire une immunité forte et durable, l'immunité homotypique contre un sérotype de la dengue est protectrice à vie; par ailleurs, des vaccins contre d'autres flavivirus (virus de la fièvre jaune et de l'encéphalite japonaise) existent et sont efficaces. Reste ainsi à surmonter le challenge propre aux virus de

la dengue, à savoir induire une immunité tétravalente ne présentant pas le risque d'une facilitation de l'infection par un virus sauvage. Enfin, l'amélioration de l'affinité de mAb4E11 vis-à-vis des sérotypes 3 et 4 des virus de la dengue pourrait faire de cette molécule un anticorps recombinant thérapeutique.

Ainsi la cartographie et la caractérisation biologique d'épitopes des virus de la dengue constituent des approches intéressantes pour comprendre le mécanisme de l'ADE, améliorer le diagnostic des infections à flavivirus et développer un vaccin anti-dengue, l'ensemble de ces champs d'application étant essentiels afin d'améliorer la santé publique vis-à-vis d'infections émergentes au niveau mondial.

REFERENCES

- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**:783-795.
- Bernstein, H.J. (2000). Recent changes to RasMol, recombining the variants. *Trends Biochem Sci.* **25**:453-455.
- Burton, D.R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:706-713.
- Chu, J.J.H., Rajamanonmani, R., Li, J., Bhuvanakantham, R., Lescar, J., Ng, M.L. (2005). Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **86**:405-412.
- Clarke, T. (2002). Break-bone fever. *Nature* **416**:672-674.
- Creighton, T.E. (1989). *Protein structure: a practical approach*. 1st Ed., Oxford University Press, Oxford, England.
- Crill, W.D., Roehrig, J.T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* **75**:7769-7773.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**:70-77.
- Friguet, B., Chafotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L., and Goldberg, M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **77**: 305-319.
- Gubler, D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology.* **10**:100-103.
- Halstead, S. B., and Deen, J. (2002). The future of dengue vaccines. *The Lancet* **360**:1243-1245.
- Halstead, S. B. (2003). Neutralization and antibody-dependant enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* **60**:421-467.
- Halstead, S.B., Heinz, F.X., Barrett, A.D., Roehrig, J.T. (2003). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine* **23**:849-856.
- Hung, J.J., Hsieh, M.T., Young, M.J., Kao, C.L., King, C.C., Chang, W. (2004). An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J. Virol.* **78**:378-388.
- Hurrelbrink, R.J. & McMinn, P.C. (2003). Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation. *Adv. Virus Res.* **60**:1-42.
- Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Baker, T.S., Strauss, J.H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**: 717-725.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D., Zakour, R.A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**: 367-382.
- Mégret, F., Hugnot, J.P., Falconar, A., Gentry, M.K., Morens, D.M., Murray, J.M., Schlesinger, J.J., Wright, P.J., Young, P., Van Regenmortel, M.H.V., Deubel, V. (1992). Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology* **187**:480-491.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:6986-91.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C. (2005). Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **79**:1223-1231.
- Monath, T.P. (1994). Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:2395-2400.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X.N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S.,

- Yenchitsomanus, P.T., McMichael, A., Malasit, P., Screaton, G. (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat. Med.* **9**:921-927.
- Monsellier, E. and Bedouelle, H. (2005). Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibriums monitored with the fluorescence maximum wavelength. *Biophys. J.* in press.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:13-22.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley G., Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**: 2411-2423.
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S.C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**: 291-298.
- Roehrig, J.T. (2003). Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv. Virus Res.* **59**:141-175.
- Rothman, A.L. (2003). Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv. Virus Res.* **60**:397-419.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Thullier, P., Demangel, C., Bedouelle, H., Megret, F., Jouan, A., Deubel, V., Mazie, J.C., Lafaye, P. (2001). Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. *J. Gen. Virol.* **82**:1885-92.
- Thullier, P., Lafaye, P., Megret, F., Deubel, V., Jouan, A., Mazie, J.C. (1999). A recombinant Fab neutralizes dengue virus in vitro. *J. Biotechnol.* **69**:183-90.
- Volk, D.E., Beasley, D.W.C., Kalick, D.A., Holbrook, M.R., Barrett, A.D.T., Gorenstein, D.G. (2004). Solution structure and antibody binding studies of the envelope protein domain III from the New York strain of west-nile virus. *J. Biol. Chem.* **279**:38755-38761.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**: 52-56.
- Wu, K-P., Wu, C-W., Tsao, Y-P., Kuo, T-W., Lou, Y-C., Lin, C-W., Wu., S-C., Cheng, J-W. (2003). Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody. *J. Biol. Chem.* **278**:46007-46013.