Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2443290 A1 2002/10/17

(21) 2 443 290

(12) DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION

(13) A1

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2002/04/04
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/10/17
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/10/01
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2002/001168
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/081511
(30) Priorités/Priorities: 2001/04/04 (01/04599) FR;
2001/09/06 (01/11525) FR

(51) Cl.Int.^{7}/Int.Cl.^{7} C07K 14/18, A61K 39/00, C07K 16/10

(71) Demandeurs/Applicants:
INSTITUT PASTEUR, FR;
KIMRON VETERINARY INSTITUTE, IL

(72) Inventeurs/Inventors:
DESPRES, PHILIPPE, FR;
DEUBEL, VINCENT, FR;
GUENET, JEAN-LOUIS, FR;
DROUET, MARIE-THERESE, FR;
MALKINSON, MERTYN, IL;
BANET, CAROLINE, IL;
...

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : SOUCHE NEUROVIRULENTE DU VIRUS WEST-NILE ET SES APPLICATIONS
(54) Title: NEUROVIRULENT STRAIN OF THE WEST NILE VIRUS AND APPLICATIONS THEREOF

(57) Abrégé/Abstract:
Souche neuroinvasive et neurovirulente du virus West-Nile, dénommée IS-98-ST1, molécules d'acide nucléique issues de son génome, protéines et peptides codés par lesdites molécules d'acide nucléique ainsi que leurs applications.

(21) 2 443 290

(13) A1

(72) **Inventeurs(suite)/Inventors(continued)**: FRENKIEL, MARIE-PASCALE, FR; COURAGEOT, MARIE-PIERRE, FR; COULIBALY, FASSELI, FR; CATTEAU, ADELINE, FR; FLAMAND, MARIE, FR; WEBER, PATRICK, FR; CECCALDI, PIERRE-EMMANUEL, FR

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
17 octobre 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/081511 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] :
C07K 14/18, 16/10, A61K 39/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/01168

(22) Date de dépôt international : 4 avril 2002 (04.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

01/04599	4 avril 2001 (04.04.2001)	FR
01/11525	6 septembre 2001 (06.09.2001)	FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **INSTITUT PASTEUR** [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). **KIMRON VETERINARY INSTITUTE** [IL/IL]; P.O.B. 12, 50250 Beit Dagan (IL).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **DESPRES, Philippe** [FR/FR]; 18 place de la liberté, F-92250 La Garenne-colombes (FR). **DEUBEL, Vincent** [FR/FR]; 29 bd du Lycée, F-92000 Vanves (FR). **GUENET, Jean-Louis** [FR/FR]; 4, rue de l'Ecuyer, F-91160 Longjumeau (FR). **DROUET, Marie-Thérèse** [FR/FR]; Institut Pasteur, 28 Rue Du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). **MALKINSON, Mertyn** [IL/IL]; Kimron Veterinary Institute, P.O.B. 12, 50250 Beit Dagan (IL). **BANET, Caroline** [FR/IL]; Kimron Veterinary Institute, P.O.B. 12, 50250 Beit Dagan (IL). **FRENKIEL, Marie-Pascale** [FR/FR]; 15, rue Chaptal, F-92300 Levallois (FR). **COURAGEOT, Marie-Pierre** [FR/FR]; 7, rue Ferdinand Fabre, F-75015 Paris (FR). **COULIBALY, Fasséli** [FR/FR]; 12, rue Roli, F-75014 Paris (FR). **CATTEAU, Adeline** [FR/FR]; Chez M. Boni, 18, rue des Cailles, F-91600 Savigny Sur Orge (FR). **FLAMAND, Marie** [FR/FR]; 20, rue Philibert Lucot, F-75013 Paris (FR). **WEBER, Patrick** [FR/FR]; 2 square Lénine, TH2-70, F-93170 Montreuil (FR). **CECCALDI, Pierre-Emmanuel** [FR/FR]; 27, rue Latour Maubourg, F-77350 Boissise-la-bertrand (FR).

(74) Mandataires : **CABINET ORES** etc.; 6 avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
— *avec rapport de recherche internationale*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 02/081511 A1

(54) **Title:** NEUROVIRULENT STRAIN OF THE WEST NILE VIRUS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) **Titre :** SOUCHE NEUROVIRULENTE DU VIRUS WEST-NILE ET SES APPLICATIONS

(57) **Abstract:** The invention relates to a neuroinvasive and neurovirulent strain of the West Nile virus, known as IS-98-ST1, nucleic acid molecules originating from the genome thereof, proteins and peptides coded by said nucleic acid molecules. The invention also relates to the applications of same.

(57) **Abrégé :** Souche neuroinvasive et neurovirulente du virus West-Nile, dénommée IS-98-ST1, molécules d'acide nucléique issues de son génome, protéines et peptides codés par lesdites molécules d'acide nucléique ainsi que leurs applications.

SOUCHE NEUROVIRULENTE DU VIRUS WEST-NILE ET SES APPLICATIONS

La présente invention est relative à une souche neuroinvasive et neurovirulente du virus West-Nile, dénommée IS-98-ST1, à des molécules d'acide nucléique issues de son génome, aux protéines et peptides codés par lesdites molécules d'acide nucléique ainsi qu'à leurs applications.

La présente invention concerne également tous variants de la souche virale IS-98-ST1 ayant au moins une mutation dans la séquence nucléique correspondant à NS5.

La famille des *Flaviviridae* regroupe les virus du genre flavivirus responsables de pathologies humaines graves telles que la dengue, la fièvre jaune, les encéphalites transmises par les tiques, l'encéphalite japonaise, l'encéphalite à West-Nile et les virus des hépatites C et G. Si les flavivirus sont susceptibles de provoquer une morbidité et une mortalité importantes chez l'homme, l'infection est généralement asymptomatique et seule une fraction des individus infectés développent une maladie grave.

Les flavivirus sont des petits virus enveloppés. Leur génome est une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 11 000 bases. L'ARN génomique est associé à plusieurs copies de la protéine de capside C pour former la nucléocapside; elle est entourée d'une enveloppe virale constituée d'une double couche lipidique issue des membranes du réticulum endoplasmique (RE) dans lesquelles sont ancrées la protéine d'enveloppe E et la protéine de membrane M. L'ARN génomique des flavivirus contient un unique cadre de lecture ouvert d'environ 10500 nucléotides flanqué de deux courtes régions non codantes à ses extrémités 5' et 3'. Le génome est traduit en une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés qui est le précurseur des protéines structurales C , prM (le précurseur intracellulaire de M) et E dans sa partie N-terminale et d'au moins sept protéines non structurales (NS) de NS1 à NS5 dans sa partie C-terminale.

Jusque très récemment, le virus West-Nile était reconnu comme un virus peu pathogène, responsable d'un syndrome grippal et présent en Afrique, en

Europe du Sud et au Moyen Orient ; il a été isolé au cours d'épidémies, survenues notamment en Israël dans les années 1950 et en Afrique du Sud dans les années 1970.

Très récemment, l'épidémiologie du virus West-Nile s'est modifiée et un nombre croissant de cas d'encéphalites a été observé aux cours des épidémies survenues en Roumanie en 1996, en Israël en 1998 et aux USA en 1999.

Des souches pathogènes ont été isolées lors de ces épidémies (Anderson et al., et Lanciotti et al., Science, 1999, 286 : 2331-2333, 2333-2337), en particulier la souche NY1999 (GenBank n°AF202541, Lanciotti et al., précité), dont la pathogénicité serait corrélée à la présence d'un site de glycosylation NTS dans la protéine d'enveloppe E (Jordan et al., Viral Immunol., 2000, 13, 4 : 435-446).

Des facteurs viraux mal identifiés pourraient être responsables de la gravité de l'infection, alors que la constitution génétique de l'hôte (humain ou non-humain) contribuerait à la résistance à l'infection.

Toutefois, les données relatives à ces souches pathogènes récemment isolées n'ont pas permis de déterminer tous les facteurs viraux et les gènes de l'hôte impliqués dans la sensibilité/résistance à l'infection par les *Flaviviridae*.

Des modèles murins ont permis d'établir l'existence d'une résistance génétique à l'infection par les flavivirus. Il a été montré que certaines lignées de souris récemment dérivées de l'état sauvage et appartenant aux espèces *Mus musculus musculus* ou *Mus spretus* (Det, BSVR, BRVR, PRI, CASA/Rk et CAST/Ei) sont résistantes à l'infection par les flavivirus, alors que les lignées consanguines de laboratoire les plus courantes qui dérivent majoritairement de l'espèce *Mus musculus domesticus* , n'y résistent pas (Sangster *et al.,* J.Virol., 1993, 67 : 340-347).

La résistance est contrôlée par au moins un locus autosomal dénommé *Flv*, localisé sur le chromosome 5, chez la souris et trois allèles Flv^s, Flv^r et Flv^{mr} confèrent respectivement la sensibilité, la résistance et la résistance intermédiaire à l'infection par les flavivirus. En utilisant une souche du flavivirus de l'encéphalite de la Vallée de Murray et des souris issues du croisement en retour de la lignée de souris résistante C3H/RV avec les lignées de souris sensibles C3/He ou BALB/c, le locus *Flv* a été localisé dans une région de 0,9 cM du chromosome 5, chez

la souris, entre les marqueurs *D5Mit68* et *D5Mit242* (G.R. Shellam et al., Rev. Sci. Tech. Off. Epiz. 1998,17 :231-248.).

Les Inventeurs ont maintenant isolé une nouvelle souche du virus West-Nile, à partir d'échantillons prélevés sur des cigognes en Israël (dans la ville d'Eilat) en septembre 1998, qui a été sélectionnée pour l'étude de la résistance/sensibilité d'un hôte (mammifère humain ou non-humain) à l'infection par les virus de la famille des *Flaviviridae*.

Conformément à l'invention, ladite souche neurovirulente et neuroinvasive du virus West-Nile isolée, dénommée IS-98-ST1, est caractérisée en ce que son génome est constitué par la séquence SEQ ID NO :1 qui code pour une polyprotéine présentant la séquence SEQ ID NO : 2.

Les Inventeurs ont notamment montré que les souris de laboratoire sont extrêmement sensibles à l'infection par la souche IS-98-ST1 alors que les souris des lignées SEG, WMP, STF et MAI qui dérivent de souris sauvages appartenant à des espèces différentes bien que du même genre *Mus*, sont complètement résistantes à l'infection par cette souche ; une inoculation par voie intrapéritonéale de 1000 UFF (Unités Formant Foyer ; UFF:DL50 = 100) est mortelle à 100 % pour les souris de laboratoire, alors que les souris sauvages ne présentent aucun symptôme ; en outre, le virus se réplique chez ces souris, comme le montre l'apparition d'anticorps sériques spécifiques.

La présente invention a également pour objet des réactifs, dérivés de la souche IS-98-ST1, utilisés pour l'étude et le diagnostic des infections par les *Flaviviridae*, lesquels réactifs sont sélectionnés dans le groupe constitué par les réactifs suivants :

(a) une molécule d'acide nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID NO :1, les fragments d'au moins 15 nucléotides de la séquence SEQ ID NO :1 et les séquences complémentaires sens et anti-sens des séquences précédentes, à l'exclusion du fragment présentant la séquence GENBANK AF205882.

(b) un vecteur recombinant comprenant une molécule d'acide nucléique telle que définie en (a),

(c) une cellule transformée par une molécule d'acide nucléique telle que définie en (a). un vecteur tel que défini en (b) ou une souche neurovirulente du virus West-Nile telle que définie en (a),

(d) une protéine ou un peptide codé par une molécule d'acide nucléique telle que définie en (a),

(e) un anticorps polyclonal, susceptible d'être obtenu par immunisation d'un mammifère non-humain avec la souche IS-98-ST1 du virus West-Nile telle que définie ci-dessus ; de manière préférée, ledit mammifère non-humain est une souris homozygote pour l'allèle *Flv*^{r}, résistante à l'infection par les *Flaviviridae*, et

(f) un anticorps polyclonal ou monoclonal, susceptible d'être obtenu par immunisation d'un mammifère non-humain avec un vecteur recombinant tel que défini en (b) ou bien une protéine ou un peptide, tels que définis en (d).

Ces différents réactifs sont préparés et utilisés selon les techniques classiques de biologie moléculaire et d'immunologie, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA) et dans *Current Protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and Son Inc. Library of Congress. USA).

Les fragments d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus, en particulier ceux correspondant aux séquences SEQ ID NO: 3-11 sont utilisés par exemple comme sonde ou comme amorce pour le diagnostic d'une infection par le virus West-Nile ; l'infection est détectée par exemple par PCR et/ou par hybridation, à partir des acides nucléiques extraits d'un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté ou un animal de laboratoire inoculé par ledit virus.

Selon un mode de réalisation avantageux desdits fragments, ils comprennent au moins 15 nucléotides de la SEQ ID NO:1 en amont ou en aval de l'un des codons en position suivante :

- codon Alanine (A) en positions 1117-1119, correspondant au résidu en position 51 de la protéine E ou en position 341 de la séquence de la polyprotéine virale de séquence SEQ ID NO:2 (la séquence de la protéine E s'étend

des codons en position 291 à 791 de la séquence SEQ ID NO:2, correspondants aux nucléotides 967 à 2469 de la séquence SEQ ID NO:1),

- codon Asparagine (N) en positions 2518-2520, correspondant au résidu en position 17 de la protéine NS1 ou en position 808 de la séquence SEQ ID NO:2 (la séquence de la protéine NS1 s'étend des codons en position 792 à 1144 de la séquence SEQ ID NO:2, correspondants aux nucléotides 2470 à 3528 de la séquence SEQ ID NO:1),

- codon Arginine (R) en positions 4018-4020, correspondant au résidu en position 164 de la protéine NS2A ou en position 1308 de la séquence SEQ ID NO:2 (la séquence de la protéine NS2A s'étend des codons en position 1145 à 1374 de la séquence SEQ ID NO:2, correspondants aux nucléotides 3529 à 4218 de la séquence SEQ ID NO:1),

- codons Glycine (G) en positions 4462-4464 et acide Glutamique (E) en positions 4465-4467, correspondant respectivement au résidu en position 82 et 83 de la protéine NS2B ou en position 1456 et 1457 de la séquence SEQ ID NO:2 (la séquence de la protéine NS2B s'étend des codons en position 1375 à 1505 de la séquence SEQ ID NO:2, correspondants aux nucléotides 4219 à 4611 de la séquence SEQ ID NO:1),

- codons Proline (P) en positions 6097-6099 et acide Glutamique en positions 6172-6174, correspondant respectivement au résidu en position 496 et 521 de la protéine NS3 ou en position 2001 et 2026 de la séquence SEQ ID NO:2 (la séquence de la protéine NS3 s'étend des codons en position 1506 à 2124 de la séquence SEQ ID NO:2, correspondants aux nucléotides 4612 à 6468 de la séquence SEQ ID NO:1), et

- codons Serine (S) en positions 7840-7842, Asparagine (N) en positions 8518-8520 et Alanine (A) en positions 8794-8796, correspondant respectivement au résidu en position 54, 280 et 372 de NS5 ou en position 2582, 2808 et 2900 de la séquence SEQ ID NO:2 (la séquence de la protéine NS5 s'étend des codons en position 2529 à 3430 de la séquence SEQ ID NO:2, correspondants aux nucléotides 7681 à 10386 de la séquence SEQ ID NO:1).

De telles amorces sont utiles pour amplifier des fragments contenant lesdits codons.

De manière préférée, lesdites amorces sont situés entre 10 et 100 nucléotides en amont ou en aval desdits codons.

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdits fragments, ils sont constitués par les fragments comprenant les codons précités, de préférence entre 50 et 200 nucléotides, qui sont amplifiés en utilisant les amorces telles que définies ci-dessus.

Les vecteurs recombinants tels que définis ci-dessus, en particulier les vecteurs d'expression et les cellules transformées par lesdits vecteurs d'expression sont avantageusement utilisés pour la production des protéines et des peptides correspondants.

Lesdites protéines et lesdits peptides, qui sont aptes à être reconnus et/ou à induire la production d'anticorps spécifiques du virus West-Nile, en particulier de souches neurovirulentes, sont utiles pour le diagnostic d'une infection par un virus West-Nile ; l'infection est détectée par une technique appropriée, notamment EIA, ELISA, RIA, immunofluorescence à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté ou un animal de laboratoire inoculé par ledit virus. Les protéines et les peptides tels que définis ci-dessus sont également utilisés pour la recherche de partenaires cellulaires de ces protéines virales susceptibles d'être impliqués dans la pathogénicité (neurovirulence) du virus West-Nile ; ces partenaires sont identifiés par des techniques d'immunoaffinité, par exemple par chromatographie sur colonne d'immunoaffinité.

Les anticorps selon l'invention sont utiles pour le diagnostic d'une infection par un virus West-Nile en particulier des souches neurovirulentes ; l'infection est détectée par une technique appropriée, notamment EIA, ELISA, RIA, immunofluorescence à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté ou un animal de laboratoire inoculé par ledit virus. Parmi ceux-ci, les anticorps produits par immunisation de souris *Flv*^{r}/*Flv*^{r} avec la souche IS-98-ST1 possèdent avantageusement un titre élevé et une très grande spécificité pour le virus West-Nile.

Les cellules transformées selon l'invention, en particulier les cellules neurales (neurones et cellules endothéliales) infectées par une souche neurovirulente telle que définie ci-dessus, sont utilisées pour identifier les gènes issus de ces cellules dont l'expression pourrait être modulée au cours de l'infection virale ; ces gènes sont détectés par exemple par la technologie des biopuces, selon les protocoles classiques tels que décrits dans « Atlas Mouse Arrays (#membranes) ATLAS™ NYLON cDNA EXPRESSION ARRAYS (CLONTECH, USA).

La présente invention a également pour objet un modèle d'étude de la sensibilité/résistance à l'infection par un virus de la famille des *Flaviviridae*, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche neurovirulente du virus West-Nile telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit modèle, il comprend en outre une souris homozygote pour l'allèle Flv^r ou Flv^s.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'une infection à *Flaviviridae*, notamment du virus West-Nile, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'amplification des ARN issus d'un échantillon biologique à tester à l'aide des amorces telles que définies ci-dessus, et
- le séquençage du produit d'amplification obtenu.

Une telle détection peut avantageusement permettre le pronostic de la sévérité d'une encéphalite virale à virus West-Nile.

La souche neurovirulente du virus West-Nile selon l'invention est utilisée pour le criblage de gènes cellulaires impliqués dans la résistance d'un mammifère à l'infection par un virus de la famille des *Flaviviridae,* de préférence le virus de l'hépatite C.

De manière avantageuse, ledit procédé de criblage comprend les étapes suivantes :

- mise en culture de cellules dérivées d'un hôte (humain ou non-humain) sélectionné pour sa résistance ou sa sensibilité à l'infection par un *Flaviviridae*,
- infection *in vitro* desdites cellules par un *Flaviviridae*, et

- détection de gènes exprimés de manière différentielle dans lesdites cellules infectées.

Conformément à l'invention, ladite détection peut comprendre l'établissement du profil de transcrits ou de protéines à partir desdites cellules.

La présente invention a également pour objet l'utilisation du modèle tel que défini ci-dessus pour le tri de molécules actives contre une infection virale due à un virus de la famille des *Flaviviridae*.

La présente invention a en outre pour objet un procédé de tri de molécules actives contre une infection par un Flavivirus , caractérisé par :

- la mise en contact d'une culture de cellules eucaryotes, issues d'un mammifère (humain ou non-humain) sensible à l'infection à un *Flaviviridae* avec une suspension virale de la souche selon la revendication 1, en présence ou en l'absence de la molécule à tester et

- détection de l'amplification/réplication du virus, par toute méthode connue (quantification génome, ARNm, protéines, particules virales).

La présente invention a également pour objet un variant de la souche virale telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce que son génome comprend au moins une mutation dans la séquence nucléotidique correspondant à la protéine NS5.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'objet de la présente invention, ave références aux dessins annexés dans lesquels :

- les figures 1A à 1E représentent la comparaison de la séquence en acides aminés des protéines virales de la souche IS-98-ST1 (SEQ ID NO : 2), isolée à partir de cigognes (CI) et de la souche New York (NY99 ; Genbank AF196835) isolée à partir de flamands roses (FLA), lors de l'épidémie de 1999 aux Etats-Unis,

- la figure 2 représente la cinétique de mortalité et la cinétique d'apparition des anticorps sériques spécifiques chez des souris sensibles Flv^s/Flv^s (BALB/c), infectées par la souche IS-98-ST1 du virus West-Nile,

- la figure 3 représente la cinétique de propagation de la souche IS-98-ST1 dans le système nerveux central des souris sensibles Flv^s/Flv^s (BALB/c),

- les figures 4 (A, B et C) représentent la cinétique d'apparition des antigènes viraux dans les cellules Neuro 2a et les neurones primaires de souris sensibles (BALB/c) infectées par le virus West-Nile (souche IS-98-ST1),

- la figure 5 représente la mort par nécrose des cellules Neuro 2a infectées par le virus West-Nile (souche IS-98-ST1),

- la figure 6 représente le protocole expérimental utilisé pour préciser la localisation du locus *Flv* sur le chromosome 5 de la souris,

- la figure 7 représente la carte génétique du locus *Flv*, déterminée à partir de souris sensibles, issues du premier croisement en retour entre les lignées résistantes (MAI/Pas et MBT/Pas) et les lignées sensibles (C57BL/6 ou BALB/c). Les boîtes blanches représentent les allèles BALB/c ou C57Bl/6 et les boîtes noires représentent les allèles MAI/Pas ou MBT/Pas.

- la figure 8 représente la carte génétique du locus *Flv* déterminée à partir des souris résistantes et sensibles, issues du premier croisement en retour (BC1) entre les lignées résistantes (MAI/Pas et MBT/Pas) et les lignées sensibles (C57BL/6 et BALB/c). Les lignes grisées représentent les allèles (BALB/c ou C57Bl/6) et les lignes noires représentent les allèles MAI/Pas ou MBT/Pas,

- la figure 9 représente la carte génétique et la carte physique du locus *Flv* et la position du gène OAS dans ce locus, et

- la figure 10 représente la distribution des allèles *Flv* chez les souris résistantes et sensibles issues du premier croisement en retour (BC1) entre les lignées résistantes (MAI/Pas et MBT/Pas) et les lignées sensibles (C57BL/6 et BALB/c).

<u>Exemple 1</u> : Isolement, amplification, purification et titration de la souche neuroinvasive du virus West-Nile IS-98-ST1

Un isolat du virus West-Nile (WN) a été obtenu à partir du système nerveux central d'une cigogne manifestant des troubles neuropathologiques sévères, en septembre 1998, à Eilat (Israël). L'infection de cellules VERO par cet isolat est cytolytique et l'immunofluorescence indirecte avec un ascite de souris immun spécifique du virus West-Nile (sérum immun de référence WN 8907) est positive à 100 %. Le virus produit sur cellules VERO a été récolté et amplifié sur cellules de moustiques AP61 (Després et al., Virol., 1993, 196 : 209-219)

Le Passage 1 (ou P1) du virus WN sur cellules AP61 a été récolté 3 jours après l'infection ; il possède un titre de 2,5 x 10^8 UFF/ml (Unité Formant Foyer) par la technique de titration sur cellules AP61 décrite dans Després et al (précité). L'inoculum P1 du virus WN sur cellules AP61 a été identifié comme la souche IS-98-ST1.

Un P2 a été obtenu à partir de cellules AP61 infectées par la souche IS-98-ST1, P1 (titre: 6 x 10^7 UFF/ml). L'inoculum P2 de IS-98-ST1 est utilisé pour les épreuves de sensibilité à l'infection virale chez des souris adultes.

Un inoculum viral P3 de la souche IS-98-ST1 avec un titre de 5 x 10^7 UFF/ml a été produit sur cellules AP61. Une préparation virale hautement purifiée, préparée selon le protocole de purification des flavivirions décrit dans Després et al., 1993) a été obtenue à partir de 20 boites de 150 cm^2 de cellules AP61 récoltées 3 jours après l'infection par l'inoculum P3 du virus WN souche IS-98-ST1 (multiplicité d'infection de 0,4). La souche IS-98-ST1 purifiée en gradients de saccharose a un titre final de 2 x 10^{10} UFF/ml. Les ARN extraits de ce virus purifié sont utilisés pour amplifier les ADNc correspondant aux protéines virales C, prM et NS1 ou aux séquences non codantes aux extrémités 5' et 3' du génome viral.

<u>Exemple 2</u> : Séquençage du génome de la souche neuroinvasive IS-98-ST1

Le génome viral a été extrait à partir du surnageant de culture des cellules VERO infectées de l'exemple 1 à l'aide du kit " QIAamp Viral RNA " (QIAGEN), en suivant les instructions du fabricant. 6 produits RT-PCR chevauchants ont été amplifiés à partir de ces ARNs en utilisant les amorces décrites par Lanciotti et al. (précité). Les extrémités 5' et 3' du génome viral ont été amplifiées respectivement à l'aide des amorces suivantes:

- 5' AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGACAAAC 3' (SEQ ID NO:5), et
- 5' AGATCCTGTGTTCTCGCACCACCAGCCAC 3' (SEQ ID NO:6).

L'ADNc correspondant à la protéine virale E a été amplifié à l'aide des amorces 5' GGATGGATGCT(A/T)GG(G/T)AGCAAC 3' (SEQ ID NO:7) et 5' CCATCCAAGCCTCCACATC 3' (SEQ ID NO:8), s'hybridant respectivement dans le gène de la protéine M (positions 889 à 909 de la séquence SEQ ID NO:1) et dans le gène de la protéine NS1 (positions 2539 à 2557 de la séquence SEQ ID NO:1).

Les ADNc obtenus ont été purifiés par chromatographie échangeuse d'ions et précipités dans 2 volumes d'isopropanol. Ensuite les ADNc ont été séquencés sur les deux brins en utilisant le kit " Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing " (PERKIN ELMER CORP./APPLIED BIOSYSTEM) et les amorces espacées de 400 paires de bases sur le génome viral (Lanciotti et al., précité). Le séquençage a été réalisé avec 0.2 pmoles d'ADNc purifié et 30 pmoles d'amorces, en suivant le protocole recommandé par le fabricant. L'alignement des séquences est réalisé à l'aide du logiciel CLUSTAL W.

La séquence génomique complète de la souche IS-98-ST1 du virus West-Nile correspond à la séquence SEQ ID NO :1.

L'alignement des séquences en acides aminés de la souche IS-98-ST1 (Seq ID NO : 2) et de la souche NY99, présentée à la figure 1, montre que la souche IS-98-ST1 isolée en Israël en 1998 et la souche NY-99 isolée à New York en 1999 sont très proches (divergence de moins de 0,2% au niveau des séquences en acides aminés).

Cependant, les différences observées dans la souche IS-98-ST1, respectivement dans les protéines E (A_{51}), NS1 (N_{17}), NS2A (R_{164}), NS2B (G_{82}, E_{83}), NS3 (P_{496}, E_{521}) et NS5 (S_{54}, N_{280}, A_{372}) sont potentiellement responsables de la neurovirulence et des propriétés neuroinvasives observées avec cette souche et peuvent servir de marqueur de virulence du virus West-Nile.

Exemple 3 : Clonage des protéines de la souche neuroinvasive IS-98-ST1 et utilisations des plasmides recombinants obtenus.

1- La protéine C

L'ARN génomique extrait des virions IS-98-ST1 purifiés sur gradients de saccharose décrits à l'exemple 1, à l'aide de la solution RNA PLUS 2 (Q.BIOGEN), est utilisé comme matrice pour amplifier la séquence codant pour la protéine C (acides aminés 1 à 123) par la technique RT-PCR (kit Titan One Tube RT-PCR; Roche Biochemicals #1939 823).

Le couple d'amorces utilisé sur la matrice ARN est le suivant :

• 5'C/WNV (séquence des nt 81-117 de la séquence SEQ ID NO:1)

5' TAG CAC GAA GAA TTC GAT GTC TAA AAA CCA GGA GGG 3' (SEQ ID NO:11) qui contient le site de restriction *EcoR*I, et

• 3'C/WNV (séquence anti-sens des nt 433 à 482 de la séquence SEQ ID NO:1)

5' AAGTTAGCCCGGGTTAATGCTCCTACGCTGGCGATCAGGCCAATCAGGAC 3' (SEQ ID NO:4) qui contient le site de restriction *Sma* I.

L'ADNc de la protéine C de la souche IS-98-ST1 (acides aminés 1 à 123) du virus WN a été cloné d'une part entre les sites *EcoR*I et *Sma*I du plasmide pCI-neo (Promega # E1841) et d'autre part entre les sites *Ksp*I et *Sma*I du plasmide pIVEX 2.4a (Roche).

Le plasmide recombiné pCI-C/WN (déposé le 21 juin 2001 à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris, 28, rue du Docteur Roux, 75724, PARIS Cedex 15 sous le numéro I-2688) contient la séquence complète du gène de la protéine C de la souche IS-98-ST1 du virus WN entre les promoteurs T7 et T3. La transcription *in vitro* de pCI-C/WN linéarisé par *Nhe*I sous la dépendance du promoteur T3 synthétise un ARN d'environ 350 bases complémentaires de la séquence virale génomique. La ribosonde marquée à la DIG (digoxigénine) est utilisée pour la détection des ARN viraux sens positif présents dans les cellules infectées par le virus WN, par la technique d'hybridation *in situ*, selon le protocole décrit dans Després *et al.*,(*J.Virol.*, 1998, **72** : 823-829).

Le plasmide recombinant pIVEX-C/WN est utilisé pour la production massive de la protéine C (acides aminés 1 à 123) du virus WN en lysat bactérien (système RTS 500 de Roche). La protéine recombinante C produite *in vitro* possède à son extrémité N-terminale une séquence $[His]_6$ et le site de clivage reconnu par la protéase Xa pour permettre d'une part sa purification sur colonne de Ni et d'autre part l'élimination des résidus histidines. La protéine C de la souche IS-98-ST1 du virus WN ainsi produite est utilisée pour des études structurales, pour la recherche de partenaires cellulaires de cette protéine en colonne d'immunoaffinité, et pour la production

d'anticorps monospécifiques chez le lapin.

2- La protéine M

Les ADNc de la souche IS-98-ST1 du virus WN codant pour la protéine M (acides aminés 215 à 290 de la polyprotéine virale) ou son ectodomaine de 41 acides aminés (acides aminés 215 à 255; acronyme *ectoM*) sont clonés :

(1) en phase avec l'extrémité C-terminale de l'EGFP dans le plasmide p[95-114]EGFP, dérivé du plasmide pEGFP-N1 (Clontech) qui comprend les résidus 95-114 de la protéine C du virus de la dengue de type 1 (souche BR/90) fusionnés en phase avec la séquence N-terminale de la protéine EGFP[215-290]WNV, pour donner le plasmide p[95-114]EGFP[215-290]WNV,

(2) dans le plasmide pIVEX (système RTS 500 de Roche) pour donner le plasmide pIVEX[EGFP][215-255]WNV,

(3) dans le vecteur rétroviral TRIPdeltaU3CMV, pour donner le plasmide TRIPdeltaU3CMV[95-114]EGFP[215-255]WNV.

Le plasmide pIVEX[EGFP][215-255]WNV permet la synthèse *acellulo* et la purification de la protéine chimérique EGFP-*ectoM* WNV qui est utilisée d'une part pour la production d'anticorps monospécifiques dirigés contre la protéine M du virus WN et d'autre part pour la recherche de partenaires cellulaires de la molécule *ectoM* WNV en colonne d'immunoaffinité.

Le plasmide TRIPdeltaU3CMV[95-114]EGFP[215-255]WNV est cotransfecté dans des cellules 293T avec les plasmides 8.7 et G-VSV pour produire des particules virales pseudotypées par l'enveloppe G du virus de stomatite vésiculaire (VSV), contenant les protéines internes du virus de l'immunodéficience acquise (VIH) et des molécules d'ARN chimériques CMV[95-114]EGFP[215-255]WNV. L'infection des cellules cibles par le vecteur recombiné non réplicatif permet l'intégration dans le génome cellulaire de l'ADN CMV[95-114]EGFP[215-255]WNV et l'expression stable de l'ectodomaine de la protéine M-WN sous le contrôle du promoteur CMV.

3- La protéine NS1

L'ARN génomique extrait des virions IS-98-ST1 purifiés est amplifié par la technique RT-PCR (kit Titan One Tube RT-PCR; Roche Biochemicals #1939 823) à l'aide du couple d'amorces suivant:

- 5'TGGATGGGATCCAATATGCGTGATAGGTCC 3' (SEQ ID NO:9) qui contient le site de restriction *BamH1* et

- 3'AAAAGGGTCAATGGTACCAGCATTTTAAGCATTCACGTT 3' (SEQ ID NO:10) qui contient le site de restriction *KpnI*.

L'ADNc codant pour la glycoprotéine NS1 avec son peptide signal (acides aminés 767 à 1143 de la polyprotéine virale est cloné entre les sites *BamH*1 et *Kpn*I du vecteur rétroviral TRIPdeltaU3 pour produire le plasmide recombiné TRIPdeltaU3-CMV-NS1-WN (déposé le 9 janvier 2002 à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris, 28 rue du Docteur ROUX, 75724, PARIS Cedex 15 sous le numéro I-2770). Le plasmide TRIPdeltaU3-CMV-NS1-WN est cotransfecté dans des cellules 293T avec les plasmides 8.7 et G-VSV pour produire des particules virales pseudotypées par l'enveloppe G du virus de stomatite vésiculaire (VSV), contenant les protéines internes du virus de l'immunodéficience acquise (VIH) et des molécules d'ARN chimériques CMV-NS1-WN. L'infection des cellules cibles par le vecteur recombiné non réplicatif permet l'intégration dans le génome cellulaire de l'ADN CMV-NS1-WN et l'expression stable de la protéine NS1 du virus WN sous le contrôle du promoteur CMV. La protéine NS1 de la souche IS-98-ST1 du virus WN ainsi produite est utilisée pour des études structurales, pour la recherche de partenaires cellulaires de cette protéine en colonne d'immunoaffinité, et pour la production d'anticorps monospécifiques chez le lapin.

<u>Exemple 4</u> : Les souris sauvages et de lignées consanguines de laboratoire se différencient par leur sensibilité à l'infection par la souche neuroinvasive IS-98-ST1 du virus West-Nile.

1- <u>Les lignées de souris et les cellules sensibles.</u>

a) <u>lignées de souris sensibles</u>

Des souris de lignées consanguines sensibles Flv^s (BALB/c) âgées de 6 semaines sont inoculées par la voie intrapéritonéale avec 100 UFF de la souche IS-98-ST1 virus West-Nile (UFF:DL50 = 10), préparée comme décrit à l'exemple 1.

Ces souris meurent à 100% avec un temps moyen de mortalité de 9 ± 2 jours (Figure 2).

La cinétique de propagation de la souche IS-98ST1 dans le système

nerveux central de la souris sensible (BALB/c) a été analysée à partir des extraits de cerveau des souris infectés titrés sur cellules AP61, selon la technique décrite dans selon la technique décrite dans Després et al. (*J. Virol.*, 1998, **72**, 823-829). Les résultats montrent que le virus est détecté dans le système nerveux central (SNC) murin au 5ème jour de l'infection et la production virale est maximale au 7ème jour (Figure 3). Au 9ème jour de l'infection, le virus n'est plus détecté dans le SNC murin (Figure 3).

La réplication du virus WN dans le SNC et les organes périphériques des souris infectées par la souche IS-98-ST1 est également détectée par immuno-histologie, selon les protocoles classiques tels que décrits dans Després et al., 1998 (précité) et par hybridation *in situ*, selon les protocoles décrits à l'exemple 3.

Les anticorps sériques spécifiquement dirigés contre les protéines du virus WN sont titrés par ELISA selon le protocole décrit dans Després et al., 1993 (précité), en utilisant la souche IS-98-ST1 purifié sur gradient de saccharose telle que décrite à l'exemple 1, comme antigène. Les résultats montrent que les anticorps sériques apparaissent au 5ème jour de l'infection et sont significativement détectés au 7ème jour (figure 2).

b) cellules sensibles

b1) cultures primaires

Des neurones primaires et des astrocytes du SNC de souris sensibles homozygotes pour l'allèle Flv^s (souris Swiss, Janvier) sont préparés selon les protocoles classiques. Les cellules sont infectées par la souche IS-98-ST1 à une multiplicité d'infection de 20 UFF par cellule (m.i. de 20). L'effet cytopathique est observé en microscopie optique. la production virale est analysée par titration sur cellules AP61 comme décrit précédemment à l'exemple 1 et l'expression des antigènes viraux est analysée par radioimmunoprécipitation à l'aide d'un sérum immun de souris anti-West-Nile, selon les protocoles classiques tels que décrits dans Duarte Dos Santos et al. (*Virology*, 2000, 274 : 292-308).

Les résultats montrent que 80% des neurones en culture produisent les antigènes viraux :

- leur profil en gel de polyacrylamide-SDS est présenté à la figure

4A.

- la production virale est de [3.0 ± 1,5] x 10^6 UFF/ml après 20 h d'infection et de [7,0 ± 0.5] x 10^7 UFF/ml à 40 h.

- les effets cytopathiques (ECPs) de type nécrotique sont observés après 48 h d'infection virale.

En revanche, les astrocytes du SNC murin ne sont pas permissifs à la réplication du virus WN souche IS-98-ST1.

b_2) lignées cellulaires

Des cellules de neuroblastome murin Neuro 2a et des cellules d'hépatome humain HepG2, cultivées dans les conditions classiques telles que décrites dans Marianneau et al. (*J. Virol.*, 1996, 77 : 2547-2554) sont infectées à différentes multiplicité d'infection par le virus WN souche IS-98-ST1, préparé comme décrit à l'exemple 1. L'effet cytopathique est observé en microscopie optique, la production virale est analysée par titration sur cellules AP61 comme décrit précédemment à l'exemple 1 et l'expression des antigènes viraux est analysée par radioimmuno-précipitation à l'aide d'un sérum immun de souris anti-West-Nile, selon les protocoles classiques tels que décrits dans Duarte Dos Santos et al., Virol., 2000, 274,292-308.

Les résultats montrent que les cellules de neuroblastome murin Neuro 2a sont permissives à la réplication de la souche IS-98-ST1 du virus WN. Une m.i. de 4 est nécessaire pour infecter 80% des cellules Neuro 2a en monocouche. La production virale est de 10^7 UFF/ml (m.i. de 4) après 40 h d'infection et la mort cellulaire par nécrose est massive (Figure 5). La cinétique de production des antigènes majeurs prM, E et NS1 à partir de la polyprotéine virale présentée dans la figure 4B. montre que le demi-temps de formation de la glycoprotéine d'enveloppe E est d'environ 30 min. La protéine E de la souche IS-98-ST1 semble ne posséder qu'un seul résidu N-glycanne (figure 4C).

Les résultats montrent également que les cellules d'hépatome humain HepG2 sont permissives à la réplication de la souche IS-98-ST1 du virus WN. A une m.i. de 10, la production virale est de [2 ± 1] x 10^6 UFF/ml après 48 h d'infection et les ECPs sont observés à partir de 72 h.

2- Les souris résistantes.

Les lignées de souris résistantes (*Flv*^{r}) qui dérivent de souris sauvages de l'espèce *Mus spretus* (SEG/Pas et STF/Pas), *Mus musculus musculus* (MBT/Pas, MAI/pas). *Mus musculus domesticus* (WMP/Pas), sont inoculées par la voie intrapéritonéale, avec 1000 UFF (100 DL50) de la souche IS-98-ST1 préparée selon le protocole décrit à l'exemple 1.

Contrairement aux souris de laboratoire qui sont sensibles à l'infection par la souche IS-98-ST1 et meurent en une dizaine de jours, ces souris dérivant de souris sauvages sont résistantes à l'inoculation de la souche IS-98-ST1 et néanmoins permissives à la réplication de la souche IS-98-ST1. En effet, l'infection virale des souris dérivant de souris sauvages est asymptomatique bien que le virus se multiplie *in toto* comme le démontre la production d'anticorps sériques anti-WN à hauts titres ; en ELISA, les titres des sérums à la dilution 1:100 pour 10^6 UFF de virion purifié IS-98-ST1 sont supérieurs à 1 unité de D.O. à 450 nm.

Les souris résistantes à l'infection virale sont utilisées pour la production de sérums immuns spécifiquement dirigés contre les protéines de la souche IS-98-ST1 du virus WN. Trois semaines après inoculation du virus WN, les sérums prélevés de souris résistantes (0,045 ml par souris) sont mélangés, décomplémentés 30 min à 56°C puis dilués au 1:10 dans du DPBS* ($^v/_v$) supplémenté avec 0,2% ($^v/_v$) de Sérum Albumine bovine (Life Technologies) et 0,05% ($^p/_v$) d'azide de sodium. Les sérums dilués sont répartis en 0,2 ml et conservés à -20°C. Les sérums immuns dirigés contre la souche IS-98-ST1 sont utilisés aux dilutions finales de 1:500 pour l'immunofluorescence indirecte et au 1:1000 pour l'immunoprécipitation des protéines virales radiomarquées.

<u>Exemple 5</u> : Utilisation de la souche IS-98-ST1 du virus West-Nile pour identifier les gènes cellulaires impliqués dans la sensibilité de l'hôte à l'infection aux virus de la famille des *Flaviviridae*.

1) <u>Méthodes</u>

a) <u>Modèle d'analyse de la résistance à l'infection par les *Flaviviridae* (figure 6)</u>

Des souris mâles des lignées résistantes MAI/Pas et MBT/Pas sont croisées avec des souris femelles des lignées sensibles C57BL/6 et BALB/c. Les souris

mâles de la génération F1 sont croisées en retour avec des souris femelles des lignées sensibles C57BL/6 et BALB/c pour donner une génération de souris de premier croisement en retour (BC1).

Des souris BC1 âgées de 5 semaines sont inoculées par voie intra-péritonéale avec la souche IS-98-ST1, préparée selon le protocole décrit à l'exemple 1, dans les conditions décrites à l'exemple 2.

Les animaux sont observés tous les jours et les taux de mortalité et de survie sont déterminés 14 jours après l'infection.

b) génotypage des allèles Flv

Les allèles *Flv* des individus BC1 ont été cartographiés par PCR génomique à l'aide d'amorces spécifiques de 16 microsatellites du chromosome 5 (Catalogue Research Genetics) entourant le locus *Flv* (figures 7-9), selon les techniques courantes de biologie moléculaire en utilisant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL,2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

2) Résultats

L'analyse de la distribution des allèles *Flv* chez les souris BC1 sensibles et résistantes à l'infection par la souche IS-98ST1 montre qu'un allèle Flv^r est suffisant pour conférer la résistance à l'infection (figure 10). Les résultats montrent également que dans ce modèle il existe une corrélation parfaite entre le phénotype résistant et la présence de l'allèle Flv^r et une corrélation presque parfaite entre le phénotype sensible et l'absence de l'allèle Flv^r (figure 10).

Le génotypage des allèles *Flv* montre que le locus *Flv* est localisé dans une région de 0.2 cM contenant le gène OAS1 (figures 7-9).

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR
KIMRON VETERINARY INSTITUTE
DESPRES Philippe
DEUBEL Vincent
GUENET Jean-Louis
DROUET Marie-Thérèse
MALKINSON Mertyn
BANET Caroline
FRENKIEL Marie-Pascale
COURAGEOT Marie-Pierre
COULILABY Fasséli
CATTEAU Adeline
FLAMAND Marie
WEBER Patrick
CECCALDI Pierre-Emmanuel

<120> SOUCHE NEUROVIRULENTE DU VIRUS WEST NILE ET SES APPLICATIONS

<130> 226CAS93EXT

<140>
<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 11029
<212> ARN
<213> Flavivirus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (97)..(10395)

<400> 1
agtagttcgc ctgtgtgagc tgacaaactt agtagtgttt gtgaggatta acaacaatta 60

acacagtgcg agctgtttct tagcacgaag atctcg atg tct aag aaa cca gga 114
Met Ser Lys Lys Pro Gly
1 5

ggg ccc ggc aag agc cgg gct gtc aat atg cta aaa cgc gga atg ccc 162
Gly Pro Gly Lys Ser Arg Ala Val Asn Met Leu Lys Arg Gly Met Pro
10 15 20

cgc gtg ttg tcc ttg att gga ctg aag agg gct atg ttg agc ctg atc 210
Arg Val Leu Ser Leu Ile Gly Leu Lys Arg Ala Met Leu Ser Leu Ile
25 30 35

gac ggc aag ggg cca ata cga ttt gtg ttg gct ctc ttg gcg ttc ttc 258
Asp Gly Lys Gly Pro Ile Arg Phe Val Leu Ala Leu Leu Ala Phe Phe
40 45 50

agg ttc aca gca att gct ccg acc cga gca gtg ctg gat cga tgg aga 306
Arg Phe Thr Ala Ile Ala Pro Thr Arg Ala Val Leu Asp Arg Trp Arg
55 60 65 70

```
ggt gtg aat aaa caa aca gcg atg aaa cac ctt ctg agt ttt aag aag   354
Gly Val Asn Lys Gln Thr Ala Met Lys His Leu Leu Ser Phe Lys Lys
                  75                  80                  85

gaa cta ggg acc ttg acc agt gct atc aat cgg cgg agc tca aaa caa   402
Glu Leu Gly Thr Leu Thr Ser Ala Ile Asn Arg Arg Ser Ser Lys Gln
             90                  95                 100

aag aaa aga gga gga aag acc gga att gca gtc atg att ggc ctg atc   450
Lys Lys Arg Gly Gly Lys Thr Gly Ile Ala Val Met Ile Gly Leu Ile
        105                 110                 115

gcc agc gta gga gca gtt acc ctc tct aac ttc caa ggg aag gtg atg   498
Ala Ser Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val Met
    120                 125                 130

atg acg gta aat gct act gac gtc aca gat gtc atc acg att cca aca   546
Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro Thr
135                 140                 145                 150

gct gct gga aag aac cta tgc att gtc aga gca atg gat gtg gga tac   594
Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly Tyr
                155                 160                 165

atg tgc gat gat act atc act tat gaa tgc cca gtg ctg tcg gct ggt   642
Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala Gly
            170                 175                 180

aat gat cca gaa gac atc gac tgt tgg tgc aca aag tca gca gtc tac   690
Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val Tyr
        185                 190                 195

gtc agg tat gga aga tgc acc aag aca cgc cac tca aga cgc agt cgg   738
Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser Arg
    200                 205                 210

agg tca ctg aca gtg cag aca cac gga gaa agc act cta gcg aac aag   786
Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn Lys
215                 220                 225                 230

aag ggg gct tgg atg gac agc acc aag gcc aca agg tat ttg gta aaa   834
Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val Lys
                235                 240                 245

aca gaa tca tgg atc ttg agg aac cct gga tat gcc ctg gtg gca gcc   882
Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala Ala
            250                 255                 260

gtc att ggt tgg atg ctt ggg agc aac acc atg cag aga gtt gtg ttt   930
Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val Phe
        265                 270                 275

gtc gtg cta ttg ctt ttg gtg gcc cca gct tac agc ttt aac tgc ctt   978
Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu
    280                 285                 290

gga atg agc aac aga gac ttc ttg gaa gga gtg tct gga gca aca tgg   1026
Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr Trp
295                 300                 305                 310
```

```
gtg gat ttg gtt ctc gaa ggc gac agc tgc gtg act atc atg tct aag   1074
Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser Lys
                315                 320                 325

gac aag cct acc atc gat gtg aag atg atg aat atg gag gcg gcc aac   1122
Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala Asn
            330                 335                 340

ctg gca gag gtc cgc agt tat tgc tat ttg gct acc gtc agc gat ctc   1170
Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp Leu
        345                 350                 355

tcc acc aaa gct gcg tgc ccg acc atg gga gaa gct cac aat gac aaa   1218
Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp Lys
    360                 365                 370

cgt gct gac cca gct ttt gtg tgc aga caa gga gtg gtg gac agg ggc   1266
Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg Gly
375                 380                 385                 390

tgg ggc aac ggc tgc gga cta ttt ggc aaa gga agc att gac aca tgc   1314
Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys
                395                 400                 405

gcc aaa ttt gcc tgc tct acc aag gca ata gga aga acc atc ttg aaa   1362
Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu Lys
            410                 415                 420

gag aat atc aag tac gaa gtg gcc att ttt gtc cat gga cca act act   1410
Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr Thr
        425                 430                 435

gtg gag tcg cac gga aac tac tcc aca cag gtt gga gcc act cag gca   1458
Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln Ala
    440                 445                 450

ggg aga ttc agc atc act cct gcg gcg cct tca tac aca cta aag ctt   1506
Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys Leu
455                 460                 465                 470

gga gaa tat gga gag gtg aca gtg gac tgt gaa cca cgg tca ggg att   1554
Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile
                475                 480                 485

gac acc aat gca tac tac gtg atg act gtt gga aca aag acg ttc ttg   1602
Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe Leu
            490                 495                 500

gtc cat cgt gag tgg ttc atg gac ctc aac ctc cct tgg agc agt gct   1650
Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser Ala
        505                 510                 515

gga agt act gtg tgg agg aac aga gag acg tta atg gag ttt gag gaa   1698
Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu Glu
    520                 525                 530

cca cac gcc acg aag cag tct gtg ata gca ttg ggc tca caa gag gga   1746
Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly
535                 540                 545                 550
```

```
gct ctg cat caa gct ttg gct gga gcc att cct gtg gaa ttt tca agc   1794
Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser Ser
                555                 560                 565

aac act gtc aag ttg acg tcg ggt cat ttg aag tgt aga gtg aag atg   1842
Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Val Lys Met
            570                 575                 580

gaa aaa ttg cag ttg aag gga aca acc tat ggc gtc tgt tca aag gct   1890
Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys Ala
        585                 590                 595

ttc aag ttt ctt ggg act ccc gca gac aca ggt cac ggc act gtg gtg   1938
Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val
    600                 605                 610

ttg gaa ttg cag tac act ggc acg gat gga cct tgc aaa gtt cct atc   1986
Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile
615                 620                 625                 630

tcg tca gtg gct tca ttg aac gac cta acg cca gtg ggc aga ttg gtc   2034
Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val
                635                 640                 645

act gtc aac cct ttt gtt tca gtg gcc acg gcc aac gct aag gtc ctg   2082
Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu
            650                 655                 660

att gaa ttg gaa cca ccc ttt gga gac tca tac ata gtg gtg ggc aga   2130
Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg
        665                 670                 675

gga gaa caa cag att aat cac cat tgg cac aag tct gga agc agc att   2178
Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser Ile
    680                 685                 690

ggc aaa gcc ttt aca acc acc ctc aaa gga gcg cag aga cta gcc gct   2226
Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala
695                 700                 705                 710

cta gga gac aca gct tgg gac ttt gga tca gtt gga ggg gtg ttc acc   2274
Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Thr
                715                 720                 725

tca gtt ggg aag gct gtc cat caa gtg ttc gga gga gca ttc cgc tca   2322
Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Ser
            730                 735                 740

ctg ttc gga ggc atg tcc tgg ata acg caa gga ttg ctg ggg gct ctc   2370
Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala Leu
        745                 750                 755

ctg ttg tgg atg ggc atc aat gct cgt gat agg tcc ata gct ctc acg   2418
Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Thr
    760                 765                 770

ttt ctc gca gtt gga gga gtt ctg ctc ttc ctc tcc gtg aac gtg cac   2466
Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val His
775                 780                 785                 790
```

```
gct gac act ggg tgt gcc ata gac atc agc cgg caa gag ctg aga tgt   2514
Ala Asp Thr Gly Cys Ala Ile Asp Ile Ser Arg Gln Glu Leu Arg Cys
                795                 800                 805

gga aat gga gtg ttc ata cac aat gat gtg gag gct tgg atg gac cgg   2562
Gly Asn Gly Val Phe Ile His Asn Asp Val Glu Ala Trp Met Asp Arg
            810                 815                 820

tac aag tat tac cct gaa acg cca caa ggc cta gcc aag atc att cag   2610
Tyr Lys Tyr Tyr Pro Glu Thr Pro Gln Gly Leu Ala Lys Ile Ile Gln
        825                 830                 835

aaa gct cat aag gaa gga gtg tgc ggt cta cga tca gtt tcc aga ctg   2658
Lys Ala His Lys Glu Gly Val Cys Gly Leu Arg Ser Val Ser Arg Leu
    840                 845                 850

gag cat caa atg tgg gaa gca gtg aag gac gag ctg aac act ctt ttg   2706
Glu His Gln Met Trp Glu Ala Val Lys Asp Glu Leu Asn Thr Leu Leu
855                 860                 865                 870

aag gag aat ggt gtg gac ctt agt gtc gtg gtt gag aaa cag gag gga   2754
Lys Glu Asn Gly Val Asp Leu Ser Val Val Val Glu Lys Gln Glu Gly
                875                 880                 885

atg tac aag tca gca cct aaa cgc ctc acc gcc acc acg gaa aaa ttg   2802
Met Tyr Lys Ser Ala Pro Lys Arg Leu Thr Ala Thr Thr Glu Lys Leu
            890                 895                 900

gaa att ggc tgg aag gcc tgg gga aag agt att tta ttt gca cca gaa   2850
Glu Ile Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys Ser Ile Leu Phe Ala Pro Glu
        905                 910                 915

ctc gcc aac aac acc ttt gtg gtt gat ggt ccg gag acc aag gaa tgt   2898
Leu Ala Asn Asn Thr Phe Val Val Asp Gly Pro Glu Thr Lys Glu Cys
    920                 925                 930

ccg act cag aat cgc gct tgg aat agc tta gaa gtg gag gat ttt gga   2946
Pro Thr Gln Asn Arg Ala Trp Asn Ser Leu Glu Val Glu Asp Phe Gly
935                 940                 945                 950

ttt ggt ctc acc agc act cgg atg ttc ctg aag gtc aga gag agc aac   2994
Phe Gly Leu Thr Ser Thr Arg Met Phe Leu Lys Val Arg Glu Ser Asn
                955                 960                 965

aca act gaa tgt gac tcg aag atc att gga acg gct gtc aag aac aac   3042
Thr Thr Glu Cys Asp Ser Lys Ile Ile Gly Thr Ala Val Lys Asn Asn
            970                 975                 980

ttg gcg atc cac agt gac ctg tcc tat tgg att gaa agc agg ctc aat   3090
Leu Ala Ile His Ser Asp Leu Ser Tyr Trp Ile Glu Ser Arg Leu Asn
        985                 990                 995

gat acg tgg aag ctt gaa agg gca gtt ctg ggt gaa gtc aaa tca tgt   3138
Asp Thr Trp Lys Leu Glu Arg Ala Val Leu Gly Glu Val Lys Ser Cys
   1000                1005                1010

acg tgg cct gag acg cat acc ttg tgg ggc gat gga atc ctt gag agt   3186
Thr Trp Pro Glu Thr His Thr Leu Trp Gly Asp Gly Ile Leu Glu Ser
1015                1020                1025                1030
```

```
gac ttg ata ata cca gtc aca ctg gcg gga cca cga agc aat cac aat   3234
Asp Leu Ile Ile Pro Val Thr Leu Ala Gly Pro Arg Ser Asn His Asn
                1035                1040                1045

cgg aga cct ggg tac aag aca caa aac cag ggc cca tgg gac gaa ggc   3282
Arg Arg Pro Gly Tyr Lys Thr Gln Asn Gln Gly Pro Trp Asp Glu Gly
            1050                1055                1060

cgg gta gag att gac ttc gat tac tgc cca gga act acg gtc acc ctg   3330
Arg Val Glu Ile Asp Phe Asp Tyr Cys Pro Gly Thr Thr Val Thr Leu
        1065                1070                1075

agt gag agc tgc gga cac cgt gga cct gcc act cgc acc acc aca gag   3378
Ser Glu Ser Cys Gly His Arg Gly Pro Ala Thr Arg Thr Thr Thr Glu
    1080                1085                1090

agc gga aag ttg ata aca gat tgg tgc tgc agg agc tgc acc tta cca   3426
Ser Gly Lys Leu Ile Thr Asp Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro
1095                1100                1105                1110

cca ctg cgc tac caa act gac agc ggc tgt tgg tat ggt atg gag atc   3474
Pro Leu Arg Tyr Gln Thr Asp Ser Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile
                1115                1120                1125

aga cca cag aga cat gat gaa aag acc ctc gtg cag tca caa gtg aat   3522
Arg Pro Gln Arg His Asp Glu Lys Thr Leu Val Gln Ser Gln Val Asn
            1130                1135                1140

gct tat aat gct gat atg att gac cct ttt cag ttg ggc ctt ctg gtc   3570
Ala Tyr Asn Ala Asp Met Ile Asp Pro Phe Gln Leu Gly Leu Leu Val
        1145                1150                1155

gtg ttc ttg gcc acc cag gag gtc ctt cgc aag agg tgg aca gcc aag   3618
Val Phe Leu Ala Thr Gln Glu Val Leu Arg Lys Arg Trp Thr Ala Lys
    1160                1165                1170

atc agc atg cca gct ata ctg att gct ctg cta gtc ctg gtg ttt ggg   3666
Ile Ser Met Pro Ala Ile Leu Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Phe Gly
1175                1180                1185                1190

ggc att act tac act gat gtg tta cgc tat gtc atc ttg gtg ggg gca   3714
Gly Ile Thr Tyr Thr Asp Val Leu Arg Tyr Val Ile Leu Val Gly Ala
                1195                1200                1205

gct ttc gca gaa tct aat tcg gga gga gac gtg gta cac ttg gcg ctc   3762
Ala Phe Ala Glu Ser Asn Ser Gly Gly Asp Val Val His Leu Ala Leu
            1210                1215                1220

atg gcg acc ttc aag ata caa cca gtg ttt atg gtg gca tcg ttt ctc   3810
Met Ala Thr Phe Lys Ile Gln Pro Val Phe Met Val Ala Ser Phe Leu
        1225                1230                1235

aaa gcg aga tgg acc aac cag gag aac att ttg ttg atg ttg gcg gct   3858
Lys Ala Arg Trp Thr Asn Gln Glu Asn Ile Leu Leu Met Leu Ala Ala
    1240                1245                1250

gtt ttc ttt caa atg gct tat cac gat gcc cgc caa att ctg ctc tgg   3906
Val Phe Phe Gln Met Ala Tyr His Asp Ala Arg Gln Ile Leu Leu Trp
1255                1260                1265                1270
```

```
gag atc cct gat gtg ttg aat tca ctg gcg gta gct tgg atg ata ctg   3954
Glu Ile Pro Asp Val Leu Asn Ser Leu Ala Val Ala Trp Met Ile Leu
                1275                1280                1285

aga gcc ata aca ttc aca acg aca tca aat gtg gtc gtc ccg ctg cta   4002
Arg Ala Ile Thr Phe Thr Thr Thr Ser Asn Val Val Val Pro Leu Leu
            1290                1295                1300

gcc ctg cta aca ccc cgg ctg aga tgc ttg aat ctg gat gtg tac agg   4050
Ala Leu Leu Thr Pro Arg Leu Arg Cys Leu Asn Leu Asp Val Tyr Arg
        1305                1310                1315

ata ctg ctg ttg atg gtc gga ata ggc agc ttg atc agg gag aag agg   4098
Ile Leu Leu Leu Met Val Gly Ile Gly Ser Leu Ile Arg Glu Lys Arg
    1320                1325                1330

agt gca gct gca aaa aag aaa gga gca agt ctg cta tgc ttg gct cta   4146
Ser Ala Ala Ala Lys Lys Lys Gly Ala Ser Leu Leu Cys Leu Ala Leu
1335                1340                1345                1350

gcc tca aca gga ctt ttc aac ccc atg atc ctt gct gct gga ctg att   4194
Ala Ser Thr Gly Leu Phe Asn Pro Met Ile Leu Ala Ala Gly Leu Ile
                1355                1360                1365

gca tgt gat ccc aac cgt aaa cgc gga tgg ccc gca act gaa gtg atg   4242
Ala Cys Asp Pro Asn Arg Lys Arg Gly Trp Pro Ala Thr Glu Val Met
            1370                1375                1380

aca gct gtc ggc cta atg ttt gcc atc gtc gga ggg ctg gca gag ctt   4290
Thr Ala Val Gly Leu Met Phe Ala Ile Val Gly Gly Leu Ala Glu Leu
        1385                1390                1395

gac att gac tcc atg gcc att cca atg act atc gcg ggg ctc atg ttt   4338
Asp Ile Asp Ser Met Ala Ile Pro Met Thr Ile Ala Gly Leu Met Phe
    1400                1405                1410

gct gct ttc gtg att tct ggg aaa tca aca gat atg tgg att gag aga   4386
Ala Ala Phe Val Ile Ser Gly Lys Ser Thr Asp Met Trp Ile Glu Arg
1415                1420                1425                1430

acg gcg gac att tcc tgg gaa agt gat gca gaa att aca ggc tcg agc   4434
Thr Ala Asp Ile Ser Trp Glu Ser Asp Ala Glu Ile Thr Gly Ser Ser
                1435                1440                1445

gaa aga gtt gat gtt cgg ctt gat gat ggt gaa aac ttc cag ctc atg   4482
Glu Arg Val Asp Val Arg Leu Asp Asp Gly Glu Asn Phe Gln Leu Met
            1450                1455                1460

aat gat cca gga gca cct tgg aag ata tgg atg ctc aga atg gtc tgt   4530
Asn Asp Pro Gly Ala Pro Trp Lys Ile Trp Met Leu Arg Met Val Cys
        1465                1470                1475

ctc gcg att agt gcg tac acc ccc tgg gca atc ttg ccc tca gta gtt   4578
Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Thr Pro Trp Ala Ile Leu Pro Ser Val Val
    1480                1485                1490

gga ttt tgg ata act ctc caa tac aca aag aga gga ggt gtg ttg tgg   4626
Gly Phe Trp Ile Thr Leu Gln Tyr Thr Lys Arg Gly Gly Val Leu Trp
1495                1500                1505                1510
```

```
gac act ccc tca cca aag gag tac aaa aag ggg gac acg acc acc ggc   4674
Asp Thr Pro Ser Pro Lys Glu Tyr Lys Lys Gly Asp Thr Thr Thr Gly
                1515                1520                1525

gtc tac agg atc atg act cgt ggg ctg ctc ggc agt tat caa gca gga   4722
Val Tyr Arg Ile Met Thr Arg Gly Leu Leu Gly Ser Tyr Gln Ala Gly
            1530                1535                1540

gcg ggc gtg atg gtt gaa ggt gtt ttc cac acc ctt tgg cat aca aca   4770
Ala Gly Val Met Val Glu Gly Val Phe His Thr Leu Trp His Thr Thr
        1545                1550                1555

aaa gga gcc gct ttg atg agc gga gag ggc cgc ctg gac cca tac tgg   4818
Lys Gly Ala Ala Leu Met Ser Gly Glu Gly Arg Leu Asp Pro Tyr Trp
    1560                1565                1570

ggc agt gtc aag gag gat cga ctt tgt tac gga gga ccc tgg aaa ttg   4866
Gly Ser Val Lys Glu Asp Arg Leu Cys Tyr Gly Gly Pro Trp Lys Leu
1575                1580                1585                1590

cag cac aag tgg aac ggg cag gat gag gtg cag atg att gtg gtg gaa   4914
Gln His Lys Trp Asn Gly Gln Asp Glu Val Gln Met Ile Val Val Glu
                1595                1600                1605

cct ggc aag aac gtt aag aac gtc cag acg aaa cca ggg gtg ttc aaa   4962
Pro Gly Lys Asn Val Lys Asn Val Gln Thr Lys Pro Gly Val Phe Lys
            1610                1615                1620

aca cct gaa gga gaa atc ggg gcc gtg act ttg gac ttc ccc act gga   5010
Thr Pro Glu Gly Glu Ile Gly Ala Val Thr Leu Asp Phe Pro Thr Gly
        1625                1630                1635

aca tca ggc tca cca ata gtg gac aaa aac ggt gat gtg att ggg ctt   5058
Thr Ser Gly Ser Pro Ile Val Asp Lys Asn Gly Asp Val Ile Gly Leu
    1640                1645                1650

tat ggc aat gga gtc ata atg ccc aac ggc tca tac ata agc gcg ata   5106
Tyr Gly Asn Gly Val Ile Met Pro Asn Gly Ser Tyr Ile Ser Ala Ile
1655                1660                1665                1670

gtg cag ggt gaa agg atg gat gag cca atc cca gcc gga ttc gaa cct   5154
Val Gln Gly Glu Arg Met Asp Glu Pro Ile Pro Ala Gly Phe Glu Pro
                1675                1680                1685

gag atg ctg agg aaa aaa cag atc act gta ctg gat ctc cat ccc ggc   5202
Glu Met Leu Arg Lys Lys Gln Ile Thr Val Leu Asp Leu His Pro Gly
            1690                1695                1700

gcc ggt aaa aca agg agg att ctg cca cag atc atc aaa gag gcc ata   5250
Ala Gly Lys Thr Arg Arg Ile Leu Pro Gln Ile Ile Lys Glu Ala Ile
        1705                1710                1715

aac aga aga ctg aga aca gcc gtg cta gca cca acc agg gtt gtg gct   5298
Asn Arg Arg Leu Arg Thr Ala Val Leu Ala Pro Thr Arg Val Val Ala
    1720                1725                1730

gct gag atg gct gaa gca ctg aga gga ctg ccc atc cgg tac cag aca   5346
Ala Glu Met Ala Glu Ala Leu Arg Gly Leu Pro Ile Arg Tyr Gln Thr
1735                1740                1745                1750
```

```
tcc gca gtg ccc aga gaa cat aat gga aat gag att gtt gat gtc atg   5394
Ser Ala Val Pro Arg Glu His Asn Gly Asn Glu Ile Val Asp Val Met
                1755                1760                1765

tgt cat gct acc ctc acc cac agg ctg atg tct cct cac agg gtg ccg   5442
Cys His Ala Thr Leu Thr His Arg Leu Met Ser Pro His Arg Val Pro
            1770                1775                1780

aac tac aac ctg ttc gtg atg gat gag gct cat ttc acc gac cca gct   5490
Asn Tyr Asn Leu Phe Val Met Asp Glu Ala His Phe Thr Asp Pro Ala
        1785                1790                1795

agt atc gca gca aga ggt tac att tcc aca aag gtc gag cta ggg gag   5538
Ser Ile Ala Ala Arg Gly Tyr Ile Ser Thr Lys Val Glu Leu Gly Glu
    1800                1805                1810

gcg gcg gca ata ttc atg aca gcc acc cca cca ggc act tca gat cca   5586
Ala Ala Ala Ile Phe Met Thr Ala Thr Pro Pro Gly Thr Ser Asp Pro
1815                1820                1825                1830

ttc cca gag tcc aat tca cca att tcc gac tta cag act gag atc ccg   5634
Phe Pro Glu Ser Asn Ser Pro Ile Ser Asp Leu Gln Thr Glu Ile Pro
                1835                1840                1845

gat cga gct tgg aac tct gga tac gaa tgg atc aca gaa tac acc ggg   5682
Asp Arg Ala Trp Asn Ser Gly Tyr Glu Trp Ile Thr Glu Tyr Thr Gly
            1850                1855                1860

aag acg gtt tgg ttt gtg cct agt gtc aag atg ggg aat gag att gcc   5730
Lys Thr Val Trp Phe Val Pro Ser Val Lys Met Gly Asn Glu Ile Ala
        1865                1870                1875

ctt tgc cta caa cgt gct gga aag aaa gta gtc caa ttg aac aga aag   5778
Leu Cys Leu Gln Arg Ala Gly Lys Lys Val Val Gln Leu Asn Arg Lys
    1880                1885                1890

tcg tac gag acg gag tac cca aaa tgt aag aac gat gat tgg gac ttt   5826
Ser Tyr Glu Thr Glu Tyr Pro Lys Cys Lys Asn Asp Asp Trp Asp Phe
1895                1900                1905                1910

gtt atc aca aca gac ata tct gaa atg ggg gct aac ttc aag gcg agc   5874
Val Ile Thr Thr Asp Ile Ser Glu Met Gly Ala Asn Phe Lys Ala Ser
                1915                1920                1925

agg gtg att gac agc cgg aag agt gtg aaa cca acc atc ata aca gaa   5922
Arg Val Ile Asp Ser Arg Lys Ser Val Lys Pro Thr Ile Ile Thr Glu
            1930                1935                1940

gga gaa ggg aga gtg atc ctg gga gaa cca tct gca gtg aca gca gct   5970
Gly Glu Gly Arg Val Ile Leu Gly Glu Pro Ser Ala Val Thr Ala Ala
        1945                1950                1955

agt gcc gcc cag aga cgt gga cgt atc ggt aga aat ccg tcg caa gtt   6018
Ser Ala Ala Gln Arg Arg Gly Arg Ile Gly Arg Asn Pro Ser Gln Val
    1960                1965                1970

ggt gat gag tac tgt tat ggg ggg cac acg aat gaa gac gac tcg aac   6066
Gly Asp Glu Tyr Cys Tyr Gly Gly His Thr Asn Glu Asp Asp Ser Asn
1975                1980                1985                1990
```

```
ttc gcc cat tgg act gag gca cga atc atg ccg gac aac atc aac atg   6114
Phe Ala His Trp Thr Glu Ala Arg Ile Met Pro Asp Asn Ile Asn Met
                1995                2000                2005

cca aac gga ctg atc gct caa ttc tac caa cca gag cgt gag aag gta   6162
Pro Asn Gly Leu Ile Ala Gln Phe Tyr Gln Pro Glu Arg Glu Lys Val
            2010                2015                2020

tat acc atg gag ggg gaa tac cgg ctc aga gga gaa gag agg aaa aac   6210
Tyr Thr Met Glu Gly Glu Tyr Arg Leu Arg Gly Glu Glu Arg Lys Asn
        2025                2030                2035

ttt ctg gaa ctg ttg agg act gca gat ctg cca gtt tgg ctg gct tac   6258
Phe Leu Glu Leu Leu Arg Thr Ala Asp Leu Pro Val Trp Leu Ala Tyr
    2040                2045                2050

aag gtt gca gcg gct gga gtg tca tac cac gac cgg agg tgg tgc ttt   6306
Lys Val Ala Ala Ala Gly Val Ser Tyr His Asp Arg Arg Trp Cys Phe
2055                2060                2065                2070

gat ggt cct agg aca aac aca att tta gaa gac aac aac gaa gtg gaa   6354
Asp Gly Pro Arg Thr Asn Thr Ile Leu Glu Asp Asn Asn Glu Val Glu
                2075                2080                2085

gtc atc acg aag ctt ggt gaa agg aag att ctg agg ccg cgc tgg att   6402
Val Ile Thr Lys Leu Gly Glu Arg Lys Ile Leu Arg Pro Arg Trp Ile
            2090                2095                2100

gac gcc agg gtg tac tcg gat cac cag gca cta aag gcg ttc aag gac   6450
Asp Ala Arg Val Tyr Ser Asp His Gln Ala Leu Lys Ala Phe Lys Asp
        2105                2110                2115

ttc gcc tcg gga aaa cgt tct cag ata ggg ctc att gag gtt ctg gga   6498
Phe Ala Ser Gly Lys Arg Ser Gln Ile Gly Leu Ile Glu Val Leu Gly
    2120                2125                2130

aag atg cct gag cac ttc atg ggg aag aca tgg gaa gca ctt gac acc   6546
Lys Met Pro Glu His Phe Met Gly Lys Thr Trp Glu Ala Leu Asp Thr
2135                2140                2145                2150

atg tac gtt gtg gcc act gca gag aaa gga gga aga gct cac aga atg   6594
Met Tyr Val Val Ala Thr Ala Glu Lys Gly Gly Arg Ala His Arg Met
                2155                2160                2165

gcc ctg gag gaa ctg cca gat gct ctt cag aca att gcc ttg att gcc   6642
Ala Leu Glu Glu Leu Pro Asp Ala Leu Gln Thr Ile Ala Leu Ile Ala
            2170                2175                2180

tta ttg agt gtg atg acc atg gga gta ttc ttc ctc ctc atg cag cgg   6690
Leu Leu Ser Val Met Thr Met Gly Val Phe Phe Leu Leu Met Gln Arg
        2185                2190                2195

aag ggc att gga aag ata ggt ttg gga ggc gct gtc ttg gga gtc gcg   6738
Lys Gly Ile Gly Lys Ile Gly Leu Gly Gly Ala Val Leu Gly Val Ala
    2200                2205                2210

acc ttt ttc tgt tgg atg gct gaa gtt cca gga acg aag atc gcc gga   6786
Thr Phe Phe Cys Trp Met Ala Glu Val Pro Gly Thr Lys Ile Ala Gly
2215                2220                2225                2230
```

```
atg ttg ctg ctc tcc ctt ctc ttg atg att gtg cta att cct gag cca   6834
Met Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Met Ile Val Leu Ile Pro Glu Pro
                2235                2240                2245

gag aag caa cgt tcg cag aca gac aac cag cta gcc gtg ttc ctg att   6882
Glu Lys Gln Arg Ser Gln Thr Asp Asn Gln Leu Ala Val Phe Leu Ile
            2250                2255                2260

tgt gtc atg acc ctt gtg agc gca gtg gca gcc aac gag atg ggt tgg   6930
Cys Val Met Thr Leu Val Ser Ala Val Ala Ala Asn Glu Met Gly Trp
        2265                2270                2275

cta gac aag acc aag agt gac ata agc agt ttg ttt ggg caa aga att   6978
Leu Asp Lys Thr Lys Ser Asp Ile Ser Ser Leu Phe Gly Gln Arg Ile
    2280                2285                2290

gag gtc aag gag aat ttc agc atg gga gag ttt ctt ctg gac ttg agg   7026
Glu Val Lys Glu Asn Phe Ser Met Gly Glu Phe Leu Leu Asp Leu Arg
2295                2300                2305                2310

ccg gca aca gcc tgg tca ctg tac gct gtg aca aca gcg gtc ctc act   7074
Pro Ala Thr Ala Trp Ser Leu Tyr Ala Val Thr Thr Ala Val Leu Thr
                2315                2320                2325

cca ctg cta aag cat ttg atc acg tca gat tac atc aac acc tca ttg   7122
Pro Leu Leu Lys His Leu Ile Thr Ser Asp Tyr Ile Asn Thr Ser Leu
            2330                2335                2340

acc tca ata aac gtt cag gca agt gca cta ttc aca ctc gcg cga ggc   7170
Thr Ser Ile Asn Val Gln Ala Ser Ala Leu Phe Thr Leu Ala Arg Gly
        2345                2350                2355

ttc ccc ttc gtc gat gtt gga gtg tcg gct ctc ctg cta gca gcc gga   7218
Phe Pro Phe Val Asp Val Gly Val Ser Ala Leu Leu Leu Ala Ala Gly
    2360                2365                2370

tgc tgg gga caa gtc acc ctc acc gtt acg gta aca gcg gca aca ctc   7266
Cys Trp Gly Gln Val Thr Leu Thr Val Thr Val Thr Ala Ala Thr Leu
2375                2380                2385                2390

ctt ttt tgc cac tat gcc tac atg gtt ccc ggt tgg caa gct gag gca   7314
Leu Phe Cys His Tyr Ala Tyr Met Val Pro Gly Trp Gln Ala Glu Ala
                2395                2400                2405

atg cgc tca gcc cag cgg cgg aca gcg gcc gga atc atg aaa aac gct   7362
Met Arg Ser Ala Gln Arg Arg Thr Ala Ala Gly Ile Met Lys Asn Ala
            2410                2415                2420

gta gtg gat ggc atc gtg gcc acg gac gtc cca gaa tta gag cgc acc   7410
Val Val Asp Gly Ile Val Ala Thr Asp Val Pro Glu Leu Glu Arg Thr
        2425                2430                2435

aca ccc atc atg cag aag aaa gtt gga cag atc atg ctg atc ttg gtg   7458
Thr Pro Ile Met Gln Lys Lys Val Gly Gln Ile Met Leu Ile Leu Val
    2440                2445                2450

tct cta gct gca gta gta gtg aac ccg tct gtg aag aca gta cga gaa   7506
Ser Leu Ala Ala Val Val Val Asn Pro Ser Val Lys Thr Val Arg Glu
2455                2460                2465                2470
```

```
gcc gga att ttg atc acg gcc gca gcg gtg acg ctt tgg gag aat gga   7554
Ala Gly Ile Leu Ile Thr Ala Ala Ala Val Thr Leu Trp Glu Asn Gly
                2475                2480                2485

gca agc tct gtt tgg aac gca aca act gcc atc gga ctc tgc cac atc   7602
Ala Ser Ser Val Trp Asn Ala Thr Thr Ala Ile Gly Leu Cys His Ile
            2490                2495                2500

atg cgt ggg ggt tgg ttg tca tgt cta tcc ata aca tgg aca ctc ata   7650
Met Arg Gly Gly Trp Leu Ser Cys Leu Ser Ile Thr Trp Thr Leu Ile
        2505                2510                2515

aag aac atg gaa aaa cca gga cta aaa aga ggt ggg gca aaa gga cgc   7698
Lys Asn Met Glu Lys Pro Gly Leu Lys Arg Gly Gly Ala Lys Gly Arg
    2520                2525                2530

acc ttg gga gag gtt tgg aaa gaa aga ctc aac cag atg aca aaa gaa   7746
Thr Leu Gly Glu Val Trp Lys Glu Arg Leu Asn Gln Met Thr Lys Glu
2535                2540                2545                2550

gag ttc act agg tac cgc aaa gag gcc atc atc gaa gtc gat cgc tca   7794
Glu Phe Thr Arg Tyr Arg Lys Glu Ala Ile Ile Glu Val Asp Arg Ser
                2555                2560                2565

gcg gca aaa cac gcc agg aaa gaa ggc aat gtc act gga ggg cat tca   7842
Ala Ala Lys His Ala Arg Lys Glu Gly Asn Val Thr Gly Gly His Ser
            2570                2575                2580

gtc tct agg ggc aca gca aaa ctg aga tgg ctg gtc gaa cgg agg ttt   7890
Val Ser Arg Gly Thr Ala Lys Leu Arg Trp Leu Val Glu Arg Arg Phe
        2585                2590                2595

ctc gaa ccg gtc gga aaa gtg att gac ctt gga tgt gga aga ggc ggt   7938
Leu Glu Pro Val Gly Lys Val Ile Asp Leu Gly Cys Gly Arg Gly Gly
    2600                2605                2610

tgg tgt tac tat atg gca acc caa aaa aga gtc caa gaa gtc aga ggg   7986
Trp Cys Tyr Tyr Met Ala Thr Gln Lys Arg Val Gln Glu Val Arg Gly
2615                2620                2625                2630

tac aca aag ggc ggt ccc gga cat gaa gag ccc caa cta gtg caa agt   8034
Tyr Thr Lys Gly Gly Pro Gly His Glu Glu Pro Gln Leu Val Gln Ser
                2635                2640                2645

tat gga tgg aac att gtc acc atg aag agt gga gtg gat gtg ttc tac   8082
Tyr Gly Trp Asn Ile Val Thr Met Lys Ser Gly Val Asp Val Phe Tyr
            2650                2655                2660

aga cct tct gag tgt tgt gac acc ctc ctt tgt gac atc gga gag tcc   8130
Arg Pro Ser Glu Cys Cys Asp Thr Leu Leu Cys Asp Ile Gly Glu Ser
        2665                2670                2675

tcg tca agt gct gag gtt gaa gag cat agg acg att cgt gtc ctt gaa   8178
Ser Ser Ser Ala Glu Val Glu Glu His Arg Thr Ile Arg Val Leu Glu
    2680                2685                2690

atg gtt gag gac tgg ctg cac cga ggg cca agg gaa ttt tgc gtg aag   8226
Met Val Glu Asp Trp Leu His Arg Gly Pro Arg Glu Phe Cys Val Lys
2695                2700                2705                2710
```

```
gtg ctc tgc ccc tac atg ccg aaa gtc ata gag aag atg gag ctg ctc   8274
Val Leu Cys Pro Tyr Met Pro Lys Val Ile Glu Lys Met Glu Leu Leu
                2715                2720                2725

caa cgc cgg tat ggg ggg gga ctg gtc aga aac cca ctc tca cgg aat   8322
Gln Arg Arg Tyr Gly Gly Gly Leu Val Arg Asn Pro Leu Ser Arg Asn
            2730                2735                2740

tcc acg cac gag atg tat tgg gtg agt cga gct tca ggc aat gtg gta   8370
Ser Thr His Glu Met Tyr Trp Val Ser Arg Ala Ser Gly Asn Val Val
        2745                2750                2755

cat tca gtg aat atg acc agc cag gtg ctc cta gga aga atg gaa aaa   8418
His Ser Val Asn Met Thr Ser Gln Val Leu Leu Gly Arg Met Glu Lys
    2760                2765                2770

agg acc tgg aag gga ccc caa tac gag gaa gat gta aac ttg gga agc   8466
Arg Thr Trp Lys Gly Pro Gln Tyr Glu Glu Asp Val Asn Leu Gly Ser
2775                2780                2785                2790

gga acc agg gcg gtg gga aaa ccc ctg ctc aac tca gac acc agt aaa   8514
Gly Thr Arg Ala Val Gly Lys Pro Leu Leu Asn Ser Asp Thr Ser Lys
                2795                2800                2805

atc aac aac agg att gaa cga ctc agg cgt gag tac agt tcg acg tgg   8562
Ile Asn Asn Arg Ile Glu Arg Leu Arg Arg Glu Tyr Ser Ser Thr Trp
            2810                2815                2820

cac cac gat gag aac cac cca tat aga acc tgg aac tat cac ggc agt   8610
His His Asp Glu Asn His Pro Tyr Arg Thr Trp Asn Tyr His Gly Ser
        2825                2830                2835

tat gat gtg aag ccc aca ggc tcc gcc agt tcg ctg gtc aat gga gtg   8658
Tyr Asp Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ser Ser Leu Val Asn Gly Val
    2840                2845                2850

gtc agg ctc ctc tca aaa cca tgg gac acc atc acg aat gtt acc acc   8706
Val Arg Leu Leu Ser Lys Pro Trp Asp Thr Ile Thr Asn Val Thr Thr
2855                2860                2865                2870

atg gcc atg act gac act act ccc ttc ggg cag cag cga gtg ttc aaa   8754
Met Ala Met Thr Asp Thr Thr Pro Phe Gly Gln Gln Arg Val Phe Lys
                2875                2880                2885

gag aag gtg gac acg aaa gct cct gaa ccg cca gaa gga gcg aag tac   8802
Glu Lys Val Asp Thr Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Gly Ala Lys Tyr
            2890                2895                2900

gtg ctc aac gag acc acc aac tgg ttg tgg gcg ttt ttg gcc aga gaa   8850
Val Leu Asn Glu Thr Thr Asn Trp Leu Trp Ala Phe Leu Ala Arg Glu
        2905                2910                2915

aaa cgt ccc aga atg tgc tct cga gag gaa ttc ata aga aag gtc aac   8898
Lys Arg Pro Arg Met Cys Ser Arg Glu Glu Phe Ile Arg Lys Val Asn
    2920                2925                2930

agc aat gca gct ttg ggt gcc atg ttt gaa gag cag aat caa tgg agg   8946
Ser Asn Ala Ala Leu Gly Ala Met Phe Glu Glu Gln Asn Gln Trp Arg
2935                2940                2945                2950
```

```
agc gcc aga gaa gca gtt gaa gat cca aaa ttt tgg gag atg gtg gat   8994
Ser Ala Arg Glu Ala Val Glu Asp Pro Lys Phe Trp Glu Met Val Asp
                2955                2960                2965

gag gag cgc gag gca cat ctg cgg ggg gaa tgt cac act tgc att tac   9042
Glu Glu Arg Glu Ala His Leu Arg Gly Glu Cys His Thr Cys Ile Tyr
            2970                2975                2980

aac atg atg gga aag aga gag aaa aaa ccc gga gag ttc gga aag gcc   9090
Asn Met Met Gly Lys Arg Glu Lys Lys Pro Gly Glu Phe Gly Lys Ala
        2985                2990                2995

aag gga agc aga gcc att tgg ttc atg tgg ctc gga gct cgc ttt ctg   9138
Lys Gly Ser Arg Ala Ile Trp Phe Met Trp Leu Gly Ala Arg Phe Leu
    3000                3005                3010

gag ttc gag gct ctg ggt ttt ctc aat gaa gac cac tgg ctt gga aga   9186
Glu Phe Glu Ala Leu Gly Phe Leu Asn Glu Asp His Trp Leu Gly Arg
3015                3020                3025                3030

aag aac tca gga gga ggt gtc gag ggc ttg ggc ctc caa aaa ctg ggt   9234
Lys Asn Ser Gly Gly Gly Val Glu Gly Leu Gly Leu Gln Lys Leu Gly
                3035                3040                3045

tac atc ctg cgt gaa gtt ggc acc cgg cct ggg ggc aag atc tat gct   9282
Tyr Ile Leu Arg Glu Val Gly Thr Arg Pro Gly Gly Lys Ile Tyr Ala
            3050                3055                3060

gat gac aca gct ggc tgg gac acc cgc atc acg aga gct gac ttg gaa   9330
Asp Asp Thr Ala Gly Trp Asp Thr Arg Ile Thr Arg Ala Asp Leu Glu
        3065                3070                3075

aat gaa gct aag gtg ctt gag ctg ctt gat ggg gaa cat cgg cgt ctt   9378
Asn Glu Ala Lys Val Leu Glu Leu Leu Asp Gly Glu His Arg Arg Leu
    3080                3085                3090

gcc agg gcc atc att gag ctc acc tat cgt cac aaa gtt gtg aaa gtg   9426
Ala Arg Ala Ile Ile Glu Leu Thr Tyr Arg His Lys Val Val Lys Val
3095                3100                3105                3110

atg cgc ccg gct gct gat gga aga acc gtc atg gat gtt atc tcc aga   9474
Met Arg Pro Ala Ala Asp Gly Arg Thr Val Met Asp Val Ile Ser Arg
                3115                3120                3125

gaa gat cag agg ggg agt gga caa gtt gtc acc tac gcc cta aac act   9522
Glu Asp Gln Arg Gly Ser Gly Gln Val Val Thr Tyr Ala Leu Asn Thr
            3130                3135                3140

ttc acc aac ctg gcc gtc cag ctg gtg agg atg atg gaa ggg gaa gga   9570
Phe Thr Asn Leu Ala Val Gln Leu Val Arg Met Met Glu Gly Glu Gly
        3145                3150                3155

gtg att ggc cca gat gat gtg gag aaa ctc aca aaa ggg aaa gga ccc   9618
Val Ile Gly Pro Asp Asp Val Glu Lys Leu Thr Lys Gly Lys Gly Pro
    3160                3165                3170

aaa gtc agg acc tgg ctg ttt gag aat ggg gaa gaa aga ctc agc cgc   9666
Lys Val Arg Thr Trp Leu Phe Glu Asn Gly Glu Glu Arg Leu Ser Arg
3175                3180                3185                3190
```

```
atg gct gtc agt gga gat gac tgt gtg gta aag ccc ctg gac gat cgc   9714
Met Ala Val Ser Gly Asp Asp Cys Val Val Lys Pro Leu Asp Asp Arg
                3195                3200                3205

ttt gcc acc tcg ctc cac ttc ctc aat gct atg tca aag gtt cgc aaa   9762
Phe Ala Thr Ser Leu His Phe Leu Asn Ala Met Ser Lys Val Arg Lys
          3210                3215                3220

gac atc caa gag tgg aaa ccg tca act gga tgg tat gat tgg cag cag   9810
Asp Ile Gln Glu Trp Lys Pro Ser Thr Gly Trp Tyr Asp Trp Gln Gln
      3225                3230                3235

gtt cca ttt tgc tca aac cat ttc act gaa ttg atc atg aaa gat gga   9858
Val Pro Phe Cys Ser Asn His Phe Thr Glu Leu Ile Met Lys Asp Gly
   3240                3245                3250

aga aca ctg gtg gtt cca tgc cga gga cag gat gaa ttg gta ggc aga   9906
Arg Thr Leu Val Val Pro Cys Arg Gly Gln Asp Glu Leu Val Gly Arg
3255                3260                3265                3270

gct cgc ata tct cca ggg gcc gga tgg aac gtc cgc gac act gct tgt   9954
Ala Arg Ile Ser Pro Gly Ala Gly Trp Asn Val Arg Asp Thr Ala Cys
               3275                3280                3285

ctg gct aag tct tat gcc cag atg tgg ctg ctt ctg tac ttc cac aga   10002
Leu Ala Lys Ser Tyr Ala Gln Met Trp Leu Leu Leu Tyr Phe His Arg
          3290                3295                3300

aga gac ctg cgg ctc atg gcc aac gcc att tgc tcc gct gtc cct gtg   10050
Arg Asp Leu Arg Leu Met Ala Asn Ala Ile Cys Ser Ala Val Pro Val
      3305                3310                3315

aat tgg gtc cct acc gga aga acc acg tgg tcc atc cat gca gga gga   10098
Asn Trp Val Pro Thr Gly Arg Thr Thr Trp Ser Ile His Ala Gly Gly
   3320                3325                3330

gag tgg atg aca aca gag gac atg ttg gag gtc tgg aac cgt gtt tgg   10146
Glu Trp Met Thr Thr Glu Asp Met Leu Glu Val Trp Asn Arg Val Trp
3335                3340                3345                3350

ata gag gag aat gaa tgg atg gaa gac aaa acc cca gtg gag aaa tgg   10194
Ile Glu Glu Asn Glu Trp Met Glu Asp Lys Thr Pro Val Glu Lys Trp
               3355                3360                3365

agt gac gtc cca tat tca gga aaa cga gag gac atc tgg tgt ggc agc   10242
Ser Asp Val Pro Tyr Ser Gly Lys Arg Glu Asp Ile Trp Cys Gly Ser
          3370                3375                3380

ctg att ggc aca aga gcc cga gcc acg tgg gca gaa aac atc cag gtg   10290
Leu Ile Gly Thr Arg Ala Arg Ala Thr Trp Ala Glu Asn Ile Gln Val
      3385                3390                3395

gct atc aac caa gtc aga gca atc atc gga gat gag aag tat gtg gat   10338
Ala Ile Asn Gln Val Arg Ala Ile Ile Gly Asp Glu Lys Tyr Val Asp
   3400                3405                3410

tac atg agt tca cta aag aga tat gaa gac aca act ttg gtt gag gac   10386
Tyr Met Ser Ser Leu Lys Arg Tyr Glu Asp Thr Thr Leu Val Glu Asp
3415                3420                3425                3430
```

aca gta ctg tagatattta atcaattgta aatagacaat ataagtatgc 10435
Thr Val Leu

ataaaagtgt agttttatag tagtatttag tggtgttagt gtaaatagtt aagaaaattt 10495

tgaggagaaa gtcaggccgg gaagttcccg ccaccggaag ttgagtagac ggtgctgcct 10555

gcgactcaac cccaggagga ctgggtgaac aaagccgcga agtgatccat gtaagccctc 10615

agaaccgtct cggaaggagg accccacatg ttgtaacttc aaagcccaat gtcagaccac 10675

gctacggcgt gctactctgc ggagagtgca gtctgcgata gtgccccagg aggactgggt 10735

taacaaaggc aaaccaacgc cccacgcggc cctagccccg gtaatggtgt taaccagggc 10795

gaaaggacta gaggttagag gagaccccgc ggtttaaagt gcacggccca gcctgactga 10855

agctgtaggt caggggaagg actagaggtt agtggagacc ccgtgccaca aaacaccaca 10915

acaaaacagc atattgacac ctgggataga ctaggagatc ttctgctctg cacaaccagc 10975

cacacggcac agtgcgccga caatggtggc tggtggtgcg agaacacagg atct 11029

<210> 2
<211> 3433
<212> PRT
<213> Flavivirus sp.

<400> 2

Met	Ser	Lys	Lys	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Lys	Ser	Arg	Ala	Val	Asn	Met
1				5				10					15		
Leu	Lys	Arg	Gly	Met	Pro	Arg	Val	Leu	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Lys	Arg
			20					25					30		
Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Ile	Asp	Gly	Lys	Gly	Pro	Ile	Arg	Phe	Val	Leu
		35					40					45			
Ala	Leu	Leu	Ala	Phe	Phe	Arg	Phe	Thr	Ala	Ile	Ala	Pro	Thr	Arg	Ala
	50					55					60				
Val	Leu	Asp	Arg	Trp	Arg	Gly	Val	Asn	Lys	Gln	Thr	Ala	Met	Lys	His
65					70					75					80
Leu	Leu	Ser	Phe	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile	Asn
				85					90					95	
Arg	Arg	Ser	Ser	Lys	Gln	Lys	Lys	Arg	Gly	Gly	Lys	Thr	Gly	Ile	Ala
			100					105					110		
Val	Met	Ile	Gly	Leu	Ile	Ala	Ser	Val	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Asn
		115					120					125			
Phe	Gln	Gly	Lys	Val	Met	Met	Thr	Val	Asn	Ala	Thr	Asp	Val	Thr	Asp
	130					135					140				
Val	Ile	Thr	Ile	Pro	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Asn	Leu	Cys	Ile	Val	Arg
145					150					155					160

```
Ala Met Asp Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys
                165                 170                 175

Pro Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys
            180                 185                 190

Thr Lys Ser Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg
        195                 200                 205

His Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu
    210                 215                 220

Ser Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala
225                 230                 235                 240

Thr Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly
                245                 250                 255

Tyr Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr
            260                 265                 270

Met Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala
        275                 280                 285

Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly
    290                 295                 300

Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys
305                 310                 315                 320

Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met
                325                 330                 335

Asn Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu
            340                 345                 350

Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly
        355                 360                 365

Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln
    370                 375                 380

Gly Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys
385                 390                 395                 400

Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile
                405                 410                 415

Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe
            420                 425                 430

Val His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln
        435                 440                 445

Val Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro
    450                 455                 460

Ser Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys
465                 470                 475                 480
```

Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val
485 490 495

Gly Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn
500 505 510

Leu Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr
515 520 525

Leu Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala
530 535 540

Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile
545 550 555 560

Pro Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu
565 570 575

Lys Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr
580 585 590

Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr
595 600 605

Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly
610 615 620

Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr
625 630 635 640

Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr
645 650 655

Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser
660 665 670

Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His
675 680 685

Lys Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly
690 695 700

Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser
705 710 715 720

Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe
725 730 735

Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln
740 745 750

Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp
755 760 765

Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe
770 775 780

Leu Ser Val Asn Val His Ala Asp Thr Gly Cys Ala Ile Asp Ile Ser
785 790 795 800

Arg Gln Glu Leu Arg Cys Gly Asn Gly Val Phe Ile His Asn Asp Val
805 810 815

Glu Ala Trp Met Asp Arg Tyr Lys Tyr Tyr Pro Glu Thr Pro Gln Gly
820 825 830

Leu Ala Lys Ile Ile Gln Lys Ala His Lys Glu Gly Val Cys Gly Leu
835 840 845

Arg Ser Val Ser Arg Leu Glu His Gln Met Trp Glu Ala Val Lys Asp
850 855 860

Glu Leu Asn Thr Leu Leu Lys Glu Asn Gly Val Asp Leu Ser Val Val
865 870 875 880

Val Glu Lys Gln Glu Gly Met Tyr Lys Ser Ala Pro Lys Arg Leu Thr
885 890 895

Ala Thr Thr Glu Lys Leu Glu Ile Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys Ser
900 905 910

Ile Leu Phe Ala Pro Glu Leu Ala Asn Asn Thr Phe Val Val Asp Gly
915 920 925

Pro Glu Thr Lys Glu Cys Pro Thr Gln Asn Arg Ala Trp Asn Ser Leu
930 935 940

Glu Val Glu Asp Phe Gly Phe Gly Leu Thr Ser Thr Arg Met Phe Leu
945 950 955 960

Lys Val Arg Glu Ser Asn Thr Thr Glu Cys Asp Ser Lys Ile Ile Gly
965 970 975

Thr Ala Val Lys Asn Asn Leu Ala Ile His Ser Asp Leu Ser Tyr Trp
980 985 990

Ile Glu Ser Arg Leu Asn Asp Thr Trp Lys Leu Glu Arg Ala Val Leu
995 1000 1005

Gly Glu Val Lys Ser Cys Thr Trp Pro Glu Thr His Thr Leu Trp Gly
1010 1015 1020

Asp Gly Ile Leu Glu Ser Asp Leu Ile Ile Pro Val Thr Leu Ala Gly
025 1030 1035 1040

Pro Arg Ser Asn His Asn Arg Arg Pro Gly Tyr Lys Thr Gln Asn Gln
1045 1050 1055

Gly Pro Trp Asp Glu Gly Arg Val Glu Ile Asp Phe Asp Tyr Cys Pro
1060 1065 1070

Gly Thr Thr Val Thr Leu Ser Glu Ser Cys Gly His Arg Gly Pro Ala
1075 1080 1085

Thr Arg Thr Thr Thr Glu Ser Gly Lys Leu Ile Thr Asp Trp Cys Cys
1090 1095 1100

Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Gln Thr Asp Ser Gly Cys
105 1110 1115 1120

Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Gln Arg His Asp Glu Lys Thr Leu
1125 1130 1135

Val Gln Ser Gln Val Asn Ala Tyr Asn Ala Asp Met Ile Asp Pro Phe
1140 1145 1150

Gln Leu Gly Leu Leu Val Val Phe Leu Ala Thr Gln Glu Val Leu Arg
1155 1160 1165

Lys Arg Trp Thr Ala Lys Ile Ser Met Pro Ala Ile Leu Ile Ala Leu
1170 1175 1180

Leu Val Leu Val Phe Gly Gly Ile Thr Tyr Thr Asp Val Leu Arg Tyr
185 1190 1195 1200

Val Ile Leu Val Gly Ala Ala Phe Ala Glu Ser Asn Ser Gly Gly Asp
1205 1210 1215

Val Val His Leu Ala Leu Met Ala Thr Phe Lys Ile Gln Pro Val Phe
1220 1225 1230

Met Val Ala Ser Phe Leu Lys Ala Arg Trp Thr Asn Gln Glu Asn Ile
1235 1240 1245

Leu Leu Met Leu Ala Ala Val Phe Phe Gln Met Ala Tyr His Asp Ala
1250 1255 1260

Arg Gln Ile Leu Leu Trp Glu Ile Pro Asp Val Leu Asn Ser Leu Ala
265 1270 1275 1280

Val Ala Trp Met Ile Leu Arg Ala Ile Thr Phe Thr Thr Thr Ser Asn
1285 1290 1295

Val Val Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Thr Pro Arg Leu Arg Cys Leu
1300 1305 1310

Asn Leu Asp Val Tyr Arg Ile Leu Leu Leu Met Val Gly Ile Gly Ser
1315 1320 1325

Leu Ile Arg Glu Lys Arg Ser Ala Ala Ala Lys Lys Lys Gly Ala Ser
1330 1335 1340

Leu Leu Cys Leu Ala Leu Ala Ser Thr Gly Leu Phe Asn Pro Met Ile
345 1350 1355 1360

Leu Ala Ala Gly Leu Ile Ala Cys Asp Pro Asn Arg Lys Arg Gly Trp
1365 1370 1375

Pro Ala Thr Glu Val Met Thr Ala Val Gly Leu Met Phe Ala Ile Val
1380 1385 1390

Gly Gly Leu Ala Glu Leu Asp Ile Asp Ser Met Ala Ile Pro Met Thr
1395 1400 1405

Ile Ala Gly Leu Met Phe Ala Ala Phe Val Ile Ser Gly Lys Ser Thr
1410 1415 1420

Asp Met Trp Ile Glu Arg Thr Ala Asp Ile Ser Trp Glu Ser Asp Ala
425 1430 1435 1440

Glu Ile Thr Gly Ser Ser Glu Arg Val Asp Val Arg Leu Asp Asp Gly
1445 1450 1455

Glu Asn Phe Gln Leu Met Asn Asp Pro Gly Ala Pro Trp Lys Ile Trp
1460 1465 1470

Met Leu Arg Met Val Cys Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Thr Pro Trp Ala
1475 1480 1485

Ile Leu Pro Ser Val Val Gly Phe Trp Ile Thr Leu Gln Tyr Thr Lys
1490 1495 1500

Arg Gly Gly Val Leu Trp Asp Thr Pro Ser Pro Lys Glu Tyr Lys Lys
505 1510 1515 1520

Gly Asp Thr Thr Thr Gly Val Tyr Arg Ile Met Thr Arg Gly Leu Leu
1525 1530 1535

Gly Ser Tyr Gln Ala Gly Ala Gly Val Met Val Glu Gly Val Phe His
1540 1545 1550

Thr Leu Trp His Thr Thr Lys Gly Ala Ala Leu Met Ser Gly Glu Gly
1555 1560 1565

Arg Leu Asp Pro Tyr Trp Gly Ser Val Lys Glu Asp Arg Leu Cys Tyr
1570 1575 1580

Gly Gly Pro Trp Lys Leu Gln His Lys Trp Asn Gly Gln Asp Glu Val
585 1590 1595 1600

Gln Met Ile Val Val Glu Pro Gly Lys Asn Val Lys Asn Val Gln Thr
1605 1610 1615

Lys Pro Gly Val Phe Lys Thr Pro Glu Gly Glu Ile Gly Ala Val Thr
1620 1625 1630

Leu Asp Phe Pro Thr Gly Thr Ser Gly Ser Pro Ile Val Asp Lys Asn
1635 1640 1645

Gly Asp Val Ile Gly Leu Tyr Gly Asn Gly Val Ile Met Pro Asn Gly
1650 1655 1660

Ser Tyr Ile Ser Ala Ile Val Gln Gly Glu Arg Met Asp Glu Pro Ile
665 1670 1675 1680

Pro Ala Gly Phe Glu Pro Glu Met Leu Arg Lys Lys Gln Ile Thr Val
1685 1690 1695

Leu Asp Leu His Pro Gly Ala Gly Lys Thr Arg Arg Ile Leu Pro Gln
1700 1705 1710

Ile Ile Lys Glu Ala Ile Asn Arg Arg Leu Arg Thr Ala Val Leu Ala
1715 1720 1725

Pro Thr Arg Val Val Ala Ala Glu Met Ala Glu Ala Leu Arg Gly Leu
1730 1735 1740

Pro Ile Arg Tyr Gln Thr Ser Ala Val Pro Arg Glu His Asn Gly Asn
745 1750 1755 1760

Glu Ile Val Asp Val Met Cys His Ala Thr Leu Thr His Arg Leu Met
1765 1770 1775

Ser Pro His Arg Val Pro Asn Tyr Asn Leu Phe Val Met Asp Glu Ala
1780 1785 1790

His Phe Thr Asp Pro Ala Ser Ile Ala Ala Arg Gly Tyr Ile Ser Thr
1795 1800 1805

Lys Val Glu Leu Gly Glu Ala Ala Ala Ile Phe Met Thr Ala Thr Pro
1810 1815 1820

Pro Gly Thr Ser Asp Pro Phe Pro Glu Ser Asn Ser Pro Ile Ser Asp
825 1830 1835 1840

Leu Gln Thr Glu Ile Pro Asp Arg Ala Trp Asn Ser Gly Tyr Glu Trp
1845 1850 1855

Ile Thr Glu Tyr Thr Gly Lys Thr Val Trp Phe Val Pro Ser Val Lys
1860 1865 1870

Met Gly Asn Glu Ile Ala Leu Cys Leu Gln Arg Ala Gly Lys Lys Val
1875 1880 1885

Val Gln Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Glu Thr Glu Tyr Pro Lys Cys Lys
1890 1895 1900

Asn Asp Asp Trp Asp Phe Val Ile Thr Thr Asp Ile Ser Glu Met Gly
905 1910 1915 1920

Ala Asn Phe Lys Ala Ser Arg Val Ile Asp Ser Arg Lys Ser Val Lys
1925 1930 1935

Pro Thr Ile Ile Thr Glu Gly Glu Gly Arg Val Ile Leu Gly Glu Pro
1940 1945 1950

Ser Ala Val Thr Ala Ala Ser Ala Ala Gln Arg Arg Gly Arg Ile Gly
1955 1960 1965

Arg Asn Pro Ser Gln Val Gly Asp Glu Tyr Cys Tyr Gly Gly His Thr
1970 1975 1980

Asn Glu Asp Asp Ser Asn Phe Ala His Trp Thr Glu Ala Arg Ile Met
985 1990 1995 2000

Pro Asp Asn Ile Asn Met Pro Asn Gly Leu Ile Ala Gln Phe Tyr Gln
2005 2010 2015

Pro Glu Arg Glu Lys Val Tyr Thr Met Glu Gly Glu Tyr Arg Leu Arg
2020 2025 2030

Gly Glu Glu Arg Lys Asn Phe Leu Glu Leu Leu Arg Thr Ala Asp Leu
2035 2040 2045

Pro Val Trp Leu Ala Tyr Lys Val Ala Ala Ala Gly Val Ser Tyr His
2050 2055 2060

Asp Arg Arg Trp Cys Phe Asp Gly Pro Arg Thr Asn Thr Ile Leu Glu
065 2070 2075 2080

Asp Asn Asn Glu Val Glu Val Ile Thr Lys Leu Gly Glu Arg Lys Ile
2085 2090 2095

Leu Arg Pro Arg Trp Ile Asp Ala Arg Val Tyr Ser Asp His Gln Ala
2100 2105 2110

Leu Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ala Ser Gly Lys Arg Ser Gln Ile Gly
2115 2120 2125

Leu Ile Glu Val Leu Gly Lys Met Pro Glu His Phe Met Gly Lys Thr
2130 2135 2140

Trp Glu Ala Leu Asp Thr Met Tyr Val Val Ala Thr Ala Glu Lys Gly
145 2150 2155 2160

Gly Arg Ala His Arg Met Ala Leu Glu Glu Leu Pro Asp Ala Leu Gln
2165 2170 2175

Thr Ile Ala Leu Ile Ala Leu Leu Ser Val Met Thr Met Gly Val Phe
2180 2185 2190

Phe Leu Leu Met Gln Arg Lys Gly Ile Gly Lys Ile Gly Leu Gly Gly
2195 2200 2205

Ala Val Leu Gly Val Ala Thr Phe Phe Cys Trp Met Ala Glu Val Pro
2210 2215 2220

Gly Thr Lys Ile Ala Gly Met Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Met Ile
225 2230 2235 2240

Val Leu Ile Pro Glu Pro Glu Lys Gln Arg Ser Gln Thr Asp Asn Gln
2245 2250 2255

Leu Ala Val Phe Leu Ile Cys Val Met Thr Leu Val Ser Ala Val Ala
2260 2265 2270

Ala Asn Glu Met Gly Trp Leu Asp Lys Thr Lys Ser Asp Ile Ser Ser
2275 2280 2285

Leu Phe Gly Gln Arg Ile Glu Val Lys Glu Asn Phe Ser Met Gly Glu
2290 2295 2300

Phe Leu Leu Asp Leu Arg Pro Ala Thr Ala Trp Ser Leu Tyr Ala Val
305 2310 2315 2320

Thr Thr Ala Val Leu Thr Pro Leu Leu Lys His Leu Ile Thr Ser Asp
2325 2330 2335

Tyr Ile Asn Thr Ser Leu Thr Ser Ile Asn Val Gln Ala Ser Ala Leu
2340 2345 2350

Phe Thr Leu Ala Arg Gly Phe Pro Phe Val Asp Val Gly Val Ser Ala
2355 2360 2365

Leu Leu Leu Ala Ala Gly Cys Trp Gly Gln Val Thr Leu Thr Val Thr
2370 2375 2380

Val Thr Ala Ala Thr Leu Leu Phe Cys His Tyr Ala Tyr Met Val Pro
385 2390 2395 2400

Gly Trp Gln Ala Glu Ala Met Arg Ser Ala Gln Arg Arg Thr Ala Ala
2405 2410 2415

Gly Ile Met Lys Asn Ala Val Val Asp Gly Ile Val Ala Thr Asp Val
2420 2425 2430

Pro Glu Leu Glu Arg Thr Thr Pro Ile Met Gln Lys Lys Val Gly Gln
2435 2440 2445

Ile Met Leu Ile Leu Val Ser Leu Ala Ala Val Val Val Asn Pro Ser
2450 2455 2460

Val Lys Thr Val Arg Glu Ala Gly Ile Leu Ile Thr Ala Ala Ala Val
465 2470 2475 2480

Thr Leu Trp Glu Asn Gly Ala Ser Ser Val Trp Asn Ala Thr Thr Ala
2485 2490 2495

Ile Gly Leu Cys His Ile Met Arg Gly Gly Trp Leu Ser Cys Leu Ser
2500 2505 2510

Ile Thr Trp Thr Leu Ile Lys Asn Met Glu Lys Pro Gly Leu Lys Arg
2515 2520 2525

Gly Gly Ala Lys Gly Arg Thr Leu Gly Glu Val Trp Lys Glu Arg Leu
2530 2535 2540

Asn Gln Met Thr Lys Glu Glu Phe Thr Arg Tyr Arg Lys Glu Ala Ile
545 2550 2555 2560

Ile Glu Val Asp Arg Ser Ala Ala Lys His Ala Arg Lys Glu Gly Asn
2565 2570 2575

Val Thr Gly Gly His Ser Val Ser Arg Gly Thr Ala Lys Leu Arg Trp
2580 2585 2590

Leu Val Glu Arg Arg Phe Leu Glu Pro Val Gly Lys Val Ile Asp Leu
2595 2600 2605

Gly Cys Gly Arg Gly Gly Trp Cys Tyr Tyr Met Ala Thr Gln Lys Arg
2610 2615 2620

Val Gln Glu Val Arg Gly Tyr Thr Lys Gly Gly Pro Gly His Glu Glu
625 2630 2635 2640

Pro Gln Leu Val Gln Ser Tyr Gly Trp Asn Ile Val Thr Met Lys Ser
2645 2650 2655

Gly Val Asp Val Phe Tyr Arg Pro Ser Glu Cys Cys Asp Thr Leu Leu
2660 2665 2670

Cys Asp Ile Gly Glu Ser Ser Ser Ser Ala Glu Val Glu Glu His Arg
2675 2680 2685

Thr Ile Arg Val Leu Glu Met Val Glu Asp Trp Leu His Arg Gly Pro
2690 2695 2700

Arg Glu Phe Cys Val Lys Val Leu Cys Pro Tyr Met Pro Lys Val Ile
705 2710 2715 2720

Glu Lys Met Glu Leu Leu Gln Arg Arg Tyr Gly Gly Gly Leu Val Arg
2725 2730 2735

Asn Pro Leu Ser Arg Asn Ser Thr His Glu Met Tyr Trp Val Ser Arg
2740 2745 2750

Ala Ser Gly Asn Val Val His Ser Val Asn Met Thr Ser Gln Val Leu
2755 2760 2765

Leu Gly Arg Met Glu Lys Arg Thr Trp Lys Gly Pro Gln Tyr Glu Glu
2770 2775 2780

Asp Val Asn Leu Gly Ser Gly Thr Arg Ala Val Gly Lys Pro Leu Leu
785 2790 2795 2800

Asn Ser Asp Thr Ser Lys Ile Asn Asn Arg Ile Glu Arg Leu Arg Arg
2805 2810 2815

Glu Tyr Ser Ser Thr Trp His His Asp Glu Asn His Pro Tyr Arg Thr
2820 2825 2830

Trp Asn Tyr His Gly Ser Tyr Asp Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ser
2835 2840 2845

Ser Leu Val Asn Gly Val Val Arg Leu Leu Ser Lys Pro Trp Asp Thr
2850 2855 2860

Ile Thr Asn Val Thr Thr Met Ala Met Thr Asp Thr Thr Pro Phe Gly
865 2870 2875 2880

Gln Gln Arg Val Phe Lys Glu Lys Val Asp Thr Lys Ala Pro Glu Pro
2885 2890 2895

Pro Glu Gly Ala Lys Tyr Val Leu Asn Glu Thr Thr Asn Trp Leu Trp
2900 2905 2910

Ala Phe Leu Ala Arg Glu Lys Arg Pro Arg Met Cys Ser Arg Glu Glu
2915 2920 2925

Phe Ile Arg Lys Val Asn Ser Asn Ala Ala Leu Gly Ala Met Phe Glu
2930 2935 2940

Glu Gln Asn Gln Trp Arg Ser Ala Arg Glu Ala Val Glu Asp Pro Lys
945 2950 2955 2960

Phe Trp Glu Met Val Asp Glu Glu Arg Glu Ala His Leu Arg Gly Glu
2965 2970 2975

Cys His Thr Cys Ile Tyr Asn Met Met Gly Lys Arg Glu Lys Lys Pro
2980 2985 2990

Gly Glu Phe Gly Lys Ala Lys Gly Ser Arg Ala Ile Trp Phe Met Trp
2995 3000 3005

Leu Gly Ala Arg Phe Leu Glu Phe Glu Ala Leu Gly Phe Leu Asn Glu
3010 3015 3020

Asp His Trp Leu Gly Arg Lys Asn Ser Gly Gly Gly Val Glu Gly Leu
025 3030 3035 3040

Gly Leu Gln Lys Leu Gly Tyr Ile Leu Arg Glu Val Gly Thr Arg Pro
3045 3050 3055

Gly Gly Lys Ile Tyr Ala Asp Asp Thr Ala Gly Trp Asp Thr Arg Ile
3060 3065 3070

Thr Arg Ala Asp Leu Glu Asn Glu Ala Lys Val Leu Glu Leu Leu Asp
3075 3080 3085

Gly Glu His Arg Arg Leu Ala Arg Ala Ile Ile Glu Leu Thr Tyr Arg
3090 3095 3100

His Lys Val Val Lys Val Met Arg Pro Ala Ala Asp Gly Arg Thr Val
105 3110 3115 3120

Met Asp Val Ile Ser Arg Glu Asp Gln Arg Gly Ser Gly Gln Val Val
3125 3130 3135

Thr Tyr Ala Leu Asn Thr Phe Thr Asn Leu Ala Val Gln Leu Val Arg
3140 3145 3150

Met Met Glu Gly Glu Gly Val Ile Gly Pro Asp Asp Val Glu Lys Leu
3155 3160 3165

Thr Lys Gly Lys Gly Pro Lys Val Arg Thr Trp Leu Phe Glu Asn Gly
3170 3175 3180

Glu Glu Arg Leu Ser Arg Met Ala Val Ser Gly Asp Asp Cys Val Val
185 3190 3195 3200

Lys Pro Leu Asp Asp Arg Phe Ala Thr Ser Leu His Phe Leu Asn Ala
3205 3210 3215

Met Ser Lys Val Arg Lys Asp Ile Gln Glu Trp Lys Pro Ser Thr Gly
3220 3225 3230

Trp Tyr Asp Trp Gln Gln Val Pro Phe Cys Ser Asn His Phe Thr Glu
3235 3240 3245

Leu Ile Met Lys Asp Gly Arg Thr Leu Val Val Pro Cys Arg Gly Gln
3250 3255 3260

Asp Glu Leu Val Gly Arg Ala Arg Ile Ser Pro Gly Ala Gly Trp Asn
265 3270 3275 3280

Val Arg Asp Thr Ala Cys Leu Ala Lys Ser Tyr Ala Gln Met Trp Leu
3285 3290 3295

Leu Leu Tyr Phe His Arg Arg Asp Leu Arg Leu Met Ala Asn Ala Ile
3300 3305 3310

Cys Ser Ala Val Pro Val Asn Trp Val Pro Thr Gly Arg Thr Thr Trp
3315 3320 3325

Ser Ile His Ala Gly Gly Glu Trp Met Thr Thr Glu Asp Met Leu Glu
3330 3335 3340

Val Trp Asn Arg Val Trp Ile Glu Glu Asn Glu Trp Met Glu Asp Lys
345 3350 3355 3360

Thr Pro Val Glu Lys Trp Ser Asp Val Pro Tyr Ser Gly Lys Arg Glu
3365 3370 3375

Asp Ile Trp Cys Gly Ser Leu Ile Gly Thr Arg Ala Arg Ala Thr Trp
3380 3385 3390

Ala Glu Asn Ile Gln Val Ala Ile Asn Gln Val Arg Ala Ile Ile Gly
3395 3400 3405

Asp Glu Lys Tyr Val Asp Tyr Met Ser Ser Leu Lys Arg Tyr Glu Asp
3410 3415 3420

Thr Thr Leu Val Glu Asp Thr Val Leu
425 3430

<210> 3
<211> 37
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE OLIGONUCLEOTIDIQUE

<400> 3
tagcacgaag aattcgatgt ctaagaaacc aggaggg 37

<210> 4
<211> 50
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE OLIGONUCLEOTIDIQUE

<400> 4
aagttagccc gggttaatgc tcctacgctg gcgatcaggc caatcaggac 50

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5
agtagttcgc ctgtgtgagc tgacaaac 28

<210> 6
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 6
agatcctgtg ttctcgcacc accagccac 29

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 7
ggatggatgctwggkagc aac 21

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8
ccatccaagc ctccacatc 19

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 9
tggatgggat ccaatatgcg tgataggtcc 30

<210> 10
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 10
aaaagggtca atggtaccag cattttaagc attcacgtt 39

<210> 11
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 11
tagcacgaagaattcgatgtctaaaaaccaggaggg 36

REVENDICATIONS

1°) Souche isolée du virus West-Nile, caractérisée en ce que son génome est constitué par la séquence SEQ ID NO :1.

2°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par la séquence SEQ ID NO :1, les fragments d'au moins 15 nucléotides de la séquence SEQ ID NO :1 et les séquences complémentaires sens et anti-sens des séquences précédentes, à l'exclusion du fragment présentant la séquence GENBANK AF205882.

3°) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par les amorces comprenant au moins 15 nucléotides de la séquence en amont ou en aval de l'un des codons correspondant aux positions suivantes dans la séquence nucléotidique SEQ ID NO:1:

- codon Alanine en positions 1117-1119 (position 51 dans la séquence en acides aminés de la protéine E),
- codon Asparagine en positions 2518-2520 (position 17 de la séquence en acides aminés de la protéine NS1),
- codon Arginine en positions 4018-4020 (position 164 de la séquence en acides aminés de la protéine NS2A),
- codons Glycine en positions 4462-4464 et acide Glutamique en positions 4465-4467 (positions 82 et 83 de la séquence en acides aminés de la protéine NS2B),
- codons Proline en positions 6097-6099 et acide Glutamique en positions 6172-6174 (positions 496 et 521 de la séquence en acides aminés de la protéine NS3), et
- codons Serine en positions 7840-7842, Asparagine en positions 8518-8520 et Alanine en positions 8794-8796 (positions 54, 280 et 372 de la séquence en acides aminés de la protéine NS5).

4°) Molécule d`acide nucléique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par les fragments, de préférence entre 50 et 200 nucléotides, amplifiés en utilisant les amorces selon la revendication 3.

5°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4.

6°) Cellule eucaryote, caractérisée en ce qu'elle est transformée par une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, un vecteur selon la revendication 5 ou une souche neurovirulente du virus West-Nile selon la revendication 1.

7°) Protéine ou peptide, caractérisé en ce qu'il est codé par une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4.

8°) Anticorps polyclonal, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par immunisation d'un mammifère non-humain avec la souche selon la revendication 1.

9°) Anticorps selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit mammifère non-humain est une souris homozygote pour l'allèle *Flv*^{r} de résistance à l'infection par les virus de la famille des *Flaviviridae*.

10°) Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par immunisation d'un mammifère non-humain avec un vecteur recombinant selon la revendication 5 ou bien une protéine ou un peptide, selon la revendication 7.

11°) Modèle d'étude de la sensibilité/résistance à l'infection par un virus de la famille des *Flaviviridae*, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche neurovirulente du virus West-Nile selon la revendication 1.

12°) Modèle d'étude selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une souris homozygote pour l'allèle *Flv*^{r} ou *Flv*^{s}.

13°) Procédé de détection d'une infection à *Flaviviridae*, notamment du virus West Nile, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'amplification des ARN issus d'un échantillon biologique à tester en utilisant comme amorces des molécules d'acide nucléique selon la revendication 3, et

- le séquençage du produit d'amplification obtenu.

14°) Procédé de criblage de gènes cellulaires impliqués dans la résistance d'un mammifère à l'infection par un virus de la famille des *Flaviviridae*, caracté-

risé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en culture de cellules dérivées d'un hôte (humain ou non-humain) sélectionné pour sa résistance ou sa sensibilité à l'infection par un *Flaviviridae*,
- infection *in vitro* desdites cellules par un *Flaviviridae*,
- détection de gènes exprimés de manière différentielle dans lesdites cellules infectées.

15°) Utilisation du modèle selon la revendication 11 ou la revendication 12, pour le tri de molécules actives contre une infection virale due à un virus de la famille des *Flaviviridae*.

16°) Procédé de tri de molécules actives contre une infection par un Flavivirus, caractérisé par :

- la mise en contact d'une culture de cellules eucaryotes, issues d'un mammifère sensible à l'infection à un *Flaviviridae* avec une suspension virale de la souche selon la revendication 1, en présence ou en l'absence de la molécule à tester et
- détection de la réplication du virus.

17°) Variant de la souche virale selon la revendication 1, caractérisée en ce que son génome comprend au moins une mutation dans la séquence nucléotidique correspondant à la protéine NS5.

18°) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :3-11.

```
                                                C
CI                  MSKKPGGPGKSRAVNMLKRGMPRVLSLIGLKRAMLSLIDGKGPIRFVLAL
FLA                 MSKKPGGPGKSRAVNMLKRGMPRVLSLIGLKRAMLSLIDGKGPIRFVLAL
                    **************************************************

CI                  LAFFRFTAIAPTRAVLDRWRGVNKQTAMKHLLSFKKELGTLTSAINRRSS
FLA                 LAFFRFTAIAPTRAVLDRWRGVNKQTAMKHLLSFKKELGTLTSAINRRSS
                    **************************************************

                                                  pfM
CI                  KQKKRGGKTGIAVMIGLIASVGAVTLSNFQGKVMMTVNATDVTDVITIPT
FLA                 KQKKRGGKTGIAVMIGLIASVGAVTLSNFQGKVMMTVNATDVTDVITIPT
                    **************************************************

CI                  AAGKNLCIVRAMDVGYMCDDTITYECPVLSAGNDPEDIDCWCTKSAVYVR
FLA                 AAGKNLCIVRAMDVGYMCDDTITYECPVLSAGNDPEDIDCWCTKSAVYVR
                    **************************************************

                                    M
CI                  YGRCTKTRHSRRSRRSLTVQTHGESTLANKKGAWMDSTKATRYLVKTESW
FLA                 YGRCTKTRHSRRSRRSLTVQTHGESTLANKKGAWMDSTKATRYLVKTESW
                    **************************************************

                                                                  E
CI                  ILRNPGYALVAAVIGWMLGSNTMQRVVFVVLLLLVAPAYSFNCLGMSNRD
FLA                 ILRNPGYALVAAVIGWMLGSNTMQRVVFVVLLLLVAPAYSFNCLGMSNRD
                    **************************************************

CI                  FLEGVSGATWVDLVLEGDSCVTIMSKDKPTIDVKMMNMEAANLAEVRSYC
FLA                 FLEGVSGATWVDLVLEGDSCVTIMSKDKPTIDVKMMNMEAVNLAEVRSYC
                    ************************************ ********

CI                  YLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRADPAFVCRQGVVDRGWGNGCGLFGK
FLA                 YLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRADPAFVCRQGVVDRGWGNGCGLFGK
                    **************************************************

CI                  GSIDTCAKFACSTKAIGRTILKENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQVG
FLA                 GSIDTCAKFACSTKAIGRTILKENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQVG
                    **************************************************

CI                  ATQAGRFSITPAAPSYTLKLGEYGEVTVDCEPRSGIDTNAYYVMTVGTKT
FLA                 ATQAGRFSITPAAPSYTLKLGEYGEVTVDCEPRSGIDTNAYYVMTVGTKT
                    **************************************************

CI                  FLVHREWFMDLNLPWSSAGSTVWRNRETLMEFEEPHATKQSVIALGSQEG
FLA                 FLVHREWFMDLNLPWSSAGSTVWRNRETLMEFEEPHATKQSVIALGSQEG
                    **************************************************

CI                  ALHQALAGAIPVEFSSNTVKLTSGHLKCRVKMEKLQLKGTTYGVCSKAFK
FLA                 ALHQALAGAIPVEFSSNTVKLTSGHLKCRVKMEKLQLKGTTYGVCSKAFK
                    **************************************************

CI                  FLGTPADTGHGTVVLELQYTGTDGPCKVPISSVASLNDLTPVGRLVTVNP
FLA                 FLGTPADTGHGTVVLELQYTGTDGPCKVPISSVASLNDLTPVGRLVTVNP
                    **************************************************

CI                  FVSVATANAKVLIELEPPFGDSYIVVGRGEQQINHHWHKSGSSIGKAFTT
FLA                 FVSVATANAKVLIELEPPFGDSYIVVGRGEQQINHHWHKSGSSIGKAFTT
                    **************************************************
```

FIGURE 1A

```
CI      TLKGAQRLAALGDTAWDFGSVGGVFTSVGKAVHQVFGGAFRSLFGGMSWI
FLA     TLKGAQRLAALGDTAWDFGSVGGVFTSVGKAVHQVFGGAFRSLFGGMSWI
        **************************************************

                                                      NS1
CI      TQGLLGALLLWMGINARDRSIALTFLAVGGVLLFLSVNVHADTGCAIDIS
FLA     TQGLLGALLLWMGINARDRSIALTFLAVGGVLLFLSVNVHADTGCAIDIS
        **************************************************

CI      RQELRCGNGVFIHNDVEAWMDRYKYYPETPQGLAKIIQKAHKEGVCGLRS
FLA     RQELRCGSGVFIHNDVEAWMDRYKYYPETPQGLAKIIQKAHKEGVCGLRS
        *******.******************************************

CI      VSRLEHQMWEAVKDELNTLLKENGVDLSVVVEKQEGMYKSAPKRLTATTE
FLA     VSRLEHQMWEAVKDELNTLLKENGVDLSVVVEKQEGMYKSAPKRLTATTE
        **************************************************

CI      KLEIGWKAWGKSILFAPELANNTFVVDGPETKECPTQNRAWNSLEVEDFG
FLA     KLEIGWKAWGKSILFAPELANNTFVVDGPETKECPTQNRAWNSLEVEDFG
        **************************************************

CI      FGLTSTRMFLKVRESNTTECDSKIIGTAVKNNLAIHSDLSYWIESRLNDT
FLA     FGLTSTRMFLKVRESNTTECDSKIIGTAVKNNLAIHSDLSYWIESRLNDT
        **************************************************

CI      WKLERAVLGEVKSCTWPETHTLWGDGILESDLIIPVTLAGPRSNHNRRPG
FLA     WKLERAVLGEVKSCTWPETHTLWGDGILESDLIIPVTLAGPRSNHNRRPG
        **************************************************

CI      YKTQNQGPWDEGRVEIDFDYCPGTTVTLSESCGHRGPATRTTTESGKLIT
FLA     YKTQNQGPWDEGRVEIDFDYCPGTTVTLSESCGHRGPATRTTTESGKLIT
        **************************************************

                                                     NS2A
CI      DWCCRSCTLPPLRYQTDSGCWYGMEIRPQRHDEKTLVQSQVNAYNADMID
FLA     DWCCRSCTLPPLRYQTDSGCWYGMEIRPQRHDEKTLVQSQVNAYNADMID
        **************************************************

CI      PFQLGLLVVFLATQEVLRKRWTAKISMPAILIALLVLVFGGITYTDVLRY
FLA     PFQLGLLVVFLATQEVLRKRWTAKISMPAILIALLVLVFGGITYTDVLRY
        **************************************************

CI      VILVGAAFAESNSGGDVVHLALMATFKIQPVFMVASFLKARWTNQENILL
FLA     VILVGAAFAESNSGGDVVHLALMATFKIQPVFMVASFLKARWTNQENILL
        **************************************************

CI      MLAAVFFQMAYHDARQILLWEIPDVLNSLAVAWMILRAITFTTTSNVVVP
FLA     MLAAVFFQMAYHDARQILLWEIPDVLNSLAVAWMILRAITFTTTSNVVVP
        **************************************************

CI      LLALLTPRLRCLNLDVYRILLLMVGIGSLIREKRSAAAKKKGASLLCLAL
FLA     LLALLTPGLRCLNLDVYRILLLMVGIGSLIREKRSAAAKKKGASLLCLAL
        ******* ******************************************

                                        NS2B
CI      ASTGLFNPMILAAGLIACDPNRKRGWPATEVMTAVGLMFAIVGGLAELDI
FLA     ASTGLFNPMILAAGLIACDPNRKRGWPATEVMTAVGLMFAIVGGLAELDI
        **************************************************

CI      DSMAIPMTIAGLMFAAFVISGKSTDMWIERTADISWESDAEITGSSERVD
FLA     DSMAIPMTIAGLMFAAFVISGKSTDMWIERTADISWESDAEITGSSERVD
        **************************************************

CI      VRLDDGENFQLMNDPGAPWKIWMLRMVCLAISAYTPWAILPSVVGFWITL
```

FIGURE 1B

```
FLA     VRLDDDGNFQLMNDPGAPWKIWMLRMVCLAISAYTPWAILPSVVGFWITL
        *****. ****************************************

                NS3
CI      QYTKRGGVLWDTPSPKEYKKGDTTTGVYRIMTRGLLGSYQAGAGVMVEGV
FLA     QYTKRGGVLWDTPSPKEYKKGDTTTGVYRIMTRGLLGSYQAGAGVMVEGV
        **************************************************

CI      FHTLWHTTKGAALMSGEGRLDPYWGSVKEDRLCYGGPWKLQHKWNGQDEV
FLA     FHTLWHTTKGAALMSGEGRLDPYWGSVKEDRLCYGGPWKLQHKWNGQDEV
        **************************************************

CI      QMIVVEPGKNVKNVQTKPGVFKTPEGEIGAVTLDFPTGTSGSPIVDKNGD
FLA     QMIVVEPGKNVKNVQTKPGVFKTPEGEIGAVTLDFPTGTSGSPIVDKNGD
        **************************************************

CI      VIGLYGNGVIMPNGSYISAIVQGERMDEPIPAGFEPEMLRKKQITVLDLH
FLA     VIGLYGNGVIMPNGSYISAIVQGERMDEPIPAGFEPEMLRKKQITVLDLH
        **************************************************

CI      PGAGKTRRILPQIIKEAINRRLRTAVLAPTRVVAAEMAEALRGLPIRYQT
FLA     PGAGKTRRILPQIIKEAINRRLRTAVLAPTRVVAAEMAEALRGLPIRYQT
        **************************************************

CI      SAVPREHNGNEIVDVMCHATLTHRLMSPHRVPNYNLFVMDEAHFTDPASI
FLA     SAVPREHNGNEIVDVMCHATLTHRLMSPHRVPNYNLFVMDEAHFTDPASI
        **************************************************

CI      AARGYISTKVELGEAAAIFMTATPPGTSDPFPESNSPISDLQTEIPDRAW
FLA     AARGYISTKVELGEAAAIFMTATPPGTSDPFPESNSPISDLQTEIPDRAW
        **************************************************

CI      NSGYEWITEYTGKTVWFVPSVKMGNEIALCLQRAGKKVVQLNRKSYETEY
FLA     NSGYEWITEYTGKTVWFVPSVKMGNEIALCLQRAGKKVVQLNRKSYETEY
        **************************************************

CI      PKCKNDDWDFVITTDISEMGANFKASRVIDSRKSVKPTIITEGEGRVILG
FLA     PKCKNDDWDFVITTDISEMGANFKASRVIDSRKSVKPTIITEGEGRVILG
        **************************************************

CI      EPSAVTAASAAQRRGRIGRNPSQVGDEYCYGGHTNEDDSNFAHWTEARIM
FLA     EPSAVTAASAAQRRGRIGRNPSQVGDEYCYGGHTNEDDSNFAHWTEARIM
        **************************************************

CI      PDNINMPNGLIAQFYQPEREKVYTMEGEYRLRGEERKNFLELLRTADLPV
FLA     LDNINMPNGLIAQFYQPEREKVYTMDGEYRLRGEERKNFLELLRTADLPV
        **********************.***********************

CI      WLAYKVAAAGVSYHDRRWCFDGPRTNTILEDNNEVEVITKLGERKILRPR
FLA     WLAYKVAAAGVSYHDRRWCFDGPRTNTILEDNNEVEVITKLGERKILRPR
        **************************************************

                                NS4A
CI      WIDARVYSDHQALKAFKDFASGKRSQIGLIEVLGKMPEHFMGKTWEALDT
FLA     WIDARVYSDHQALKAFKDFASGKRSQIGLIEVLGKMPEHFMGKTWEALDT
        **************************************************

CI      MYVVATAEKGGRAHRMALEELPDALQTIALIALLSVMTMGVFFLLMQRKG
FLA     MYVVATAEKGGRAHRMALEELPDALQTIALIALLSVMTMGVFFLLMQRKG
        **************************************************

CI      IGKIGLGGAVLGVATFFCWMAEVPGTKIAGMLLLSLLLMIVLIPEPEKQR
```

FIGURE 1C

```
FLA     IGKIGLGGAVLGVATFFCWMAEVPGTKIAGMLLLSLLLMIVLIPEPEKQR
        **************************************************

                                                    NS4B
CI      SQTDNQLAVFLICVMTLVSAVAANEMGWLDKTKSDISSLFGQRIEVKENF
FLA     SQTDNQLAVFLICVMTLVSAVAANEMGWLDKTKSDISSLFGQRIEVKENF
        **************************************************

CI      SMGEFLLDLRPATAWSLYAVTTAVLTPLLKHLITSDYINTSLTSINVQAS
FLA     SMGEFLLDLRPATAWSLYAVTTAVLTPLLKHLITSDYINTSLTSINVQAS
        **************************************************

CI      ALFTLARGFPFVDVGVSALLLAAGCWGQVTLTVTVTAATLLFCHYAYMVP
FLA     ALFTLARGFPFVDVGVSALLLAAGCWGQVTLTVTVTAATLLFCHYAYMVP
        **************************************************

CI      GWQAEAMRSAQRRTAAGIMKNAVVDGIVATDVPELERTTPIMQKKVGQIM
FLA     GWQAEAMRSAQRRTAAGIMKNAVVDGIVATDVPELERTTPIMQKKVGQIM
        **************************************************

CI      LILVSLAAVVVNPSVKTVREAGILITAAAVTLWENGASSVWNATTAIGLC
FLA     LILVSLAAVVVNPSVKTVREAGILITAAAVTLWENGASSVWNATTAIGLC
        **************************************************

                                                    NS5
CI      HIMRGGWLSCLSITWTLIKNMEKPGLKRGGAKGRTLGEVWKERLNQMTKE
FLA     HIMRGGWLSCLSITWTLIKNMEKPGLKRGGAKGRTLGEVWKERLNQMTKE
        **************************************************

CI      EFTRYRKEAIIEVDRSAAKHARKEGNVTGGHSVSRGTAKLRWLVERRFLE
FLA     EFTRYRKEAIIEVDRSAAKHARKEGNVTGGHPVSRGTAKLRWLVERRFLE
        **************************************************

CI      PVGKVIDLGCGRGGWCYYMATQKRVQEVRGYTKGGPGHEEPQLVQSYGWN
FLA     PVGKVIDLGCGRGGWCYYMATQKRVQEVRGYTKGGPGHEEPQLVQSYGWN
        **************************************************

CI      IVTMKSGVDVFYRPSECCDTLLCDIGESSSSAEVEEHRTIRVLEMVEDWL
FLA     IVTMKSGVDVFYRPSECCDTLLCDIGESSSSAEVEEHRTIRVLEMVEDWL
        **************************************************

CI      HRGPREFCVKVLCPYMPKVIEKMELLQRRYGGGLVRNPLSRNSTHEMYWV
FLA     HRGPREFCVKVLCPYMPKVIEKMELLQRRYGGGLVRNPLSRNSTHEMYWV
        **************************************************

CI      SRASGNVVHSVNMTSQVLLGRMEKRTWKGPQYEEDVNLGSGTRAVGKPLL
FLA     SRASGNVVHSVNMTSQVLLGRMEKRTWKGPQYEEDVNLGSGTRAVGKPLL
        **************************************************

CI      NSDTSKINNRIERLRREYSSTWHHDENHPYRTWNYHGSYDVKPTGSASSL
FLA     NSDTSKIKNRIERLRREYSSTWHHDENHPYRTWNYHGSYDVKPTGSASSL
        *******.******************************************

CI      VNGVVRLLSKPWDTITNVTTMAMTDTTPFGQQRVFKEKVDTKAPEPPEGA
FLA     VNGVVRLLSKPWDTITNVTTMAMTDTTPFGQQRVFKEKVDTKAPEPPEGV
        **************************************************

CI      KYVLNETTNWLWAFLAREKRPRMCSREEFIRKVNSNAALGAMFEEQNQWR
FLA     KYVLNETTNWLWAFLAREKRPRMCSREEFIRKVNSNAALGAMFEEQNQWR
        **************************************************

CI      SAREAVEDPKFWEMVDEEREAHLRGECHTCIYNMMGKREKKPGEFGKAKG
```

FIGURE 1D

```
FLA     SAREAVEDPKFWEMVDEEREAHLRGECHTCIYNMMGKREKKPGEFGKAKG
        **************************************************

CI      SRAIWFMWLGARFLEFEALGFLNEDHWLGRKNSGGGVEGLGLQKLGYILR
FLA     SRAIWFMWLGARFLEFEALGFLNEDHWLGRKNSGGGVEGLGLQKLGYILR
        **************************************************

CI      EVGTRPGGKIYADDTAGWDTRITRADLENEAKVLELLDGEHRRLARAIIE
FLA     EVGTRPGGKIYADDTAGWDTRITRADLENEAKVLELLDGEHRRLARAIIE
        **************************************************

CI      LTYRHKVVKVMRPAADGRTVMDVISREDQRGSGQVVTYALNTFTNLAVQL
FLA     LTYRHKVVKVMRPAADGRTVMDVISREDQRGSGQVVTYALNTFTNLAVQL
        **************************************************

CI      VRMMEGEGVIGPDDVEKLTKGKGPKVRTWLFENGEERLSRMAVSGDDCVV
FLA     VRMMEGEGVIGPDDVEKLTKGKGPKVRTWLFENGEERLSRMAVSGDDCVV
        **************************************************

CI      KPLDDRFATSLHFLNAMSKVRKDIQEWKPSTGWYDWQQVPFCSNHFTELI
FLA     KPLDDRFATSLHFLNAMSKVRKDIQEWKPSTGWYDWQQVPFCSNHFTELI
        **************************************************

CI      MKDGRTLVVPCRGQDELVGRARISPGAGWNVRDTACLAKSYAQMWLLLYF
FLA     MKDGRTLVVPCRGQDELVGRARISPGAGWNVRDTACLAKSYAQMWLLLYF
        **************************************************

CI      HRRDLRLMANAICSAVPVNWVPTGRTTWSIHAGGEWMTTEDMLEVWNRVW
FLA     HRRDLRLMANAICSAVPVNWVPTGRTTWSIHAGGEWMTTEDMLEVWNRVW
        **************************************************

CI      IEENEWMEDKTPVEKWSDVPYSGKREDIWCGSLIGTRARATWAENIQVAI
FLA     IEENEWMEDKTPVEKWSDVPYSGKREDIWCGSLIGTRARATWAENIQVAI
        **************************************************

CI      NQVRAIIGDEKYVDYMSSLKRYEDTTLVEDTVL
FLA     NQVRAIIGDEKYVDYMSSLKRYEDTTLVEDTVL
        **********************************
```

FIGURE 1E

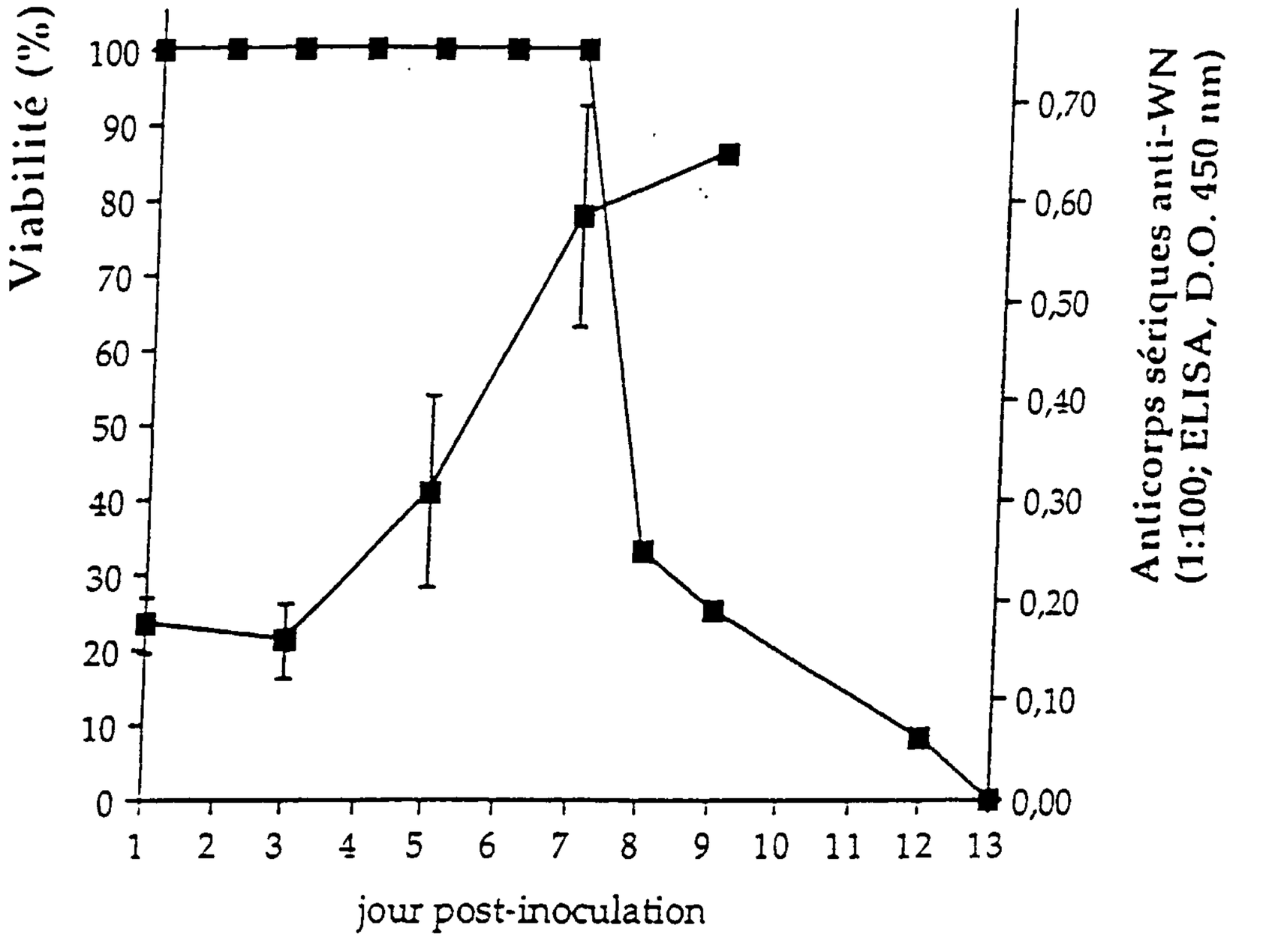


FIGURE 2

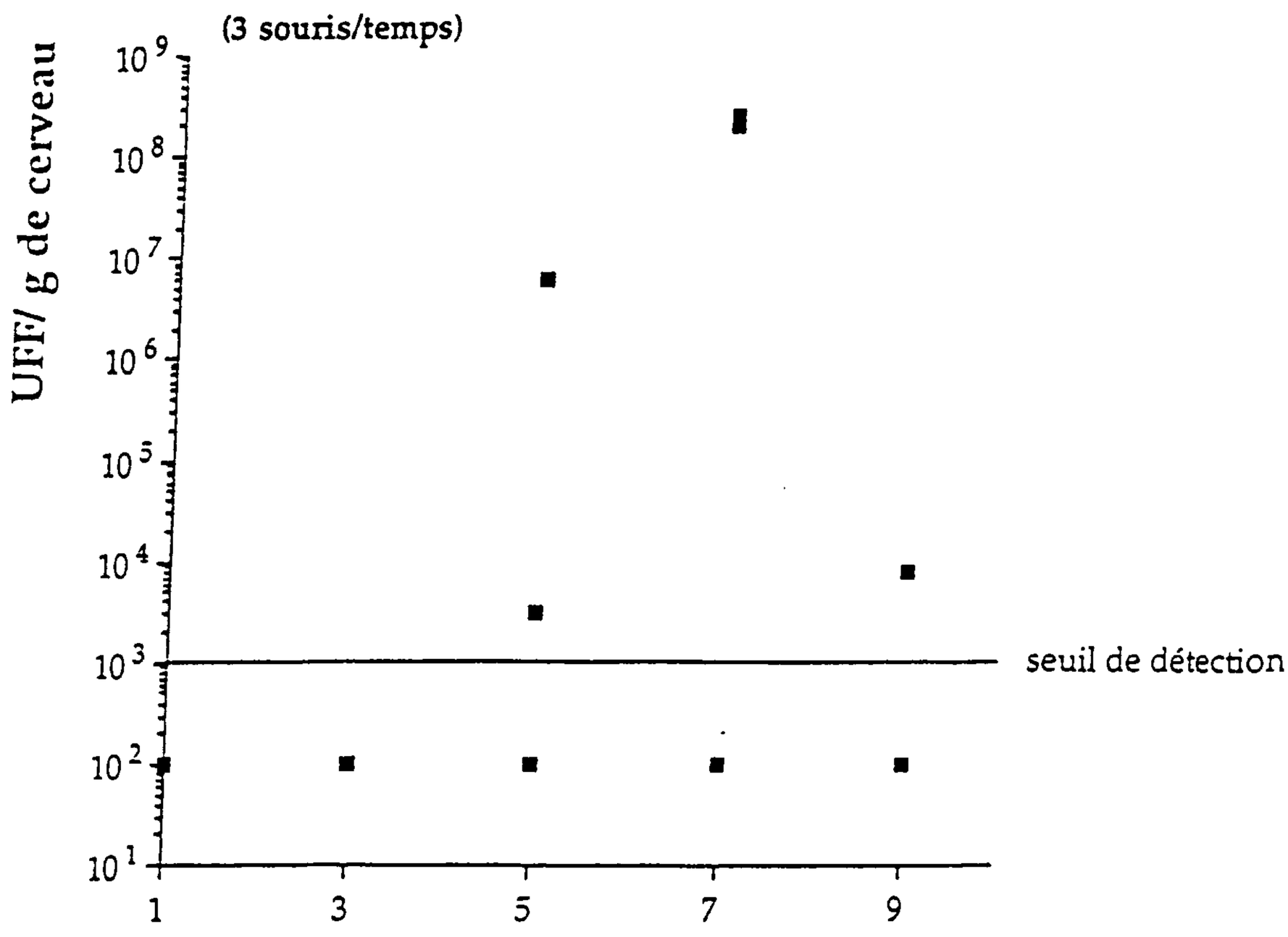


FIGURE 3

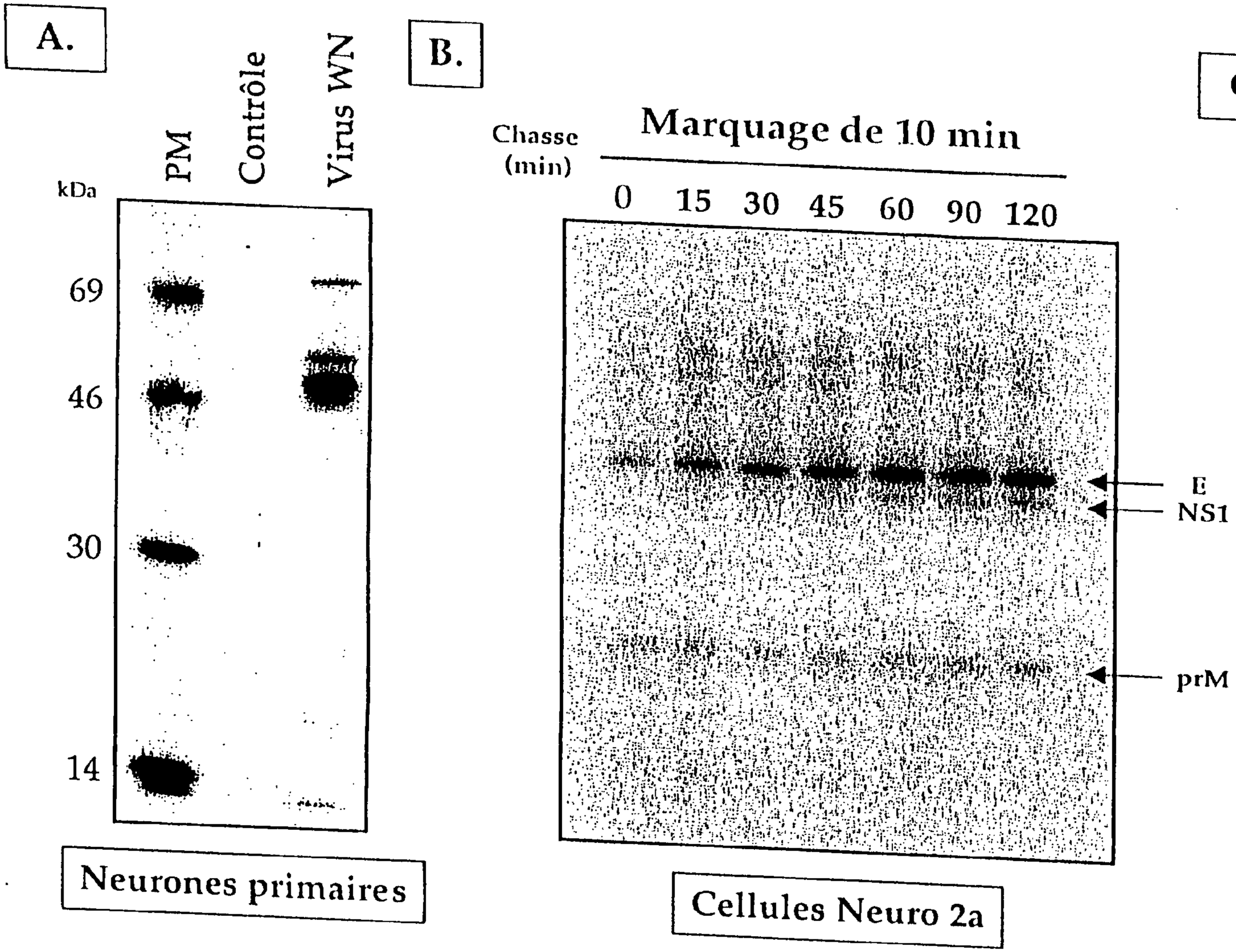
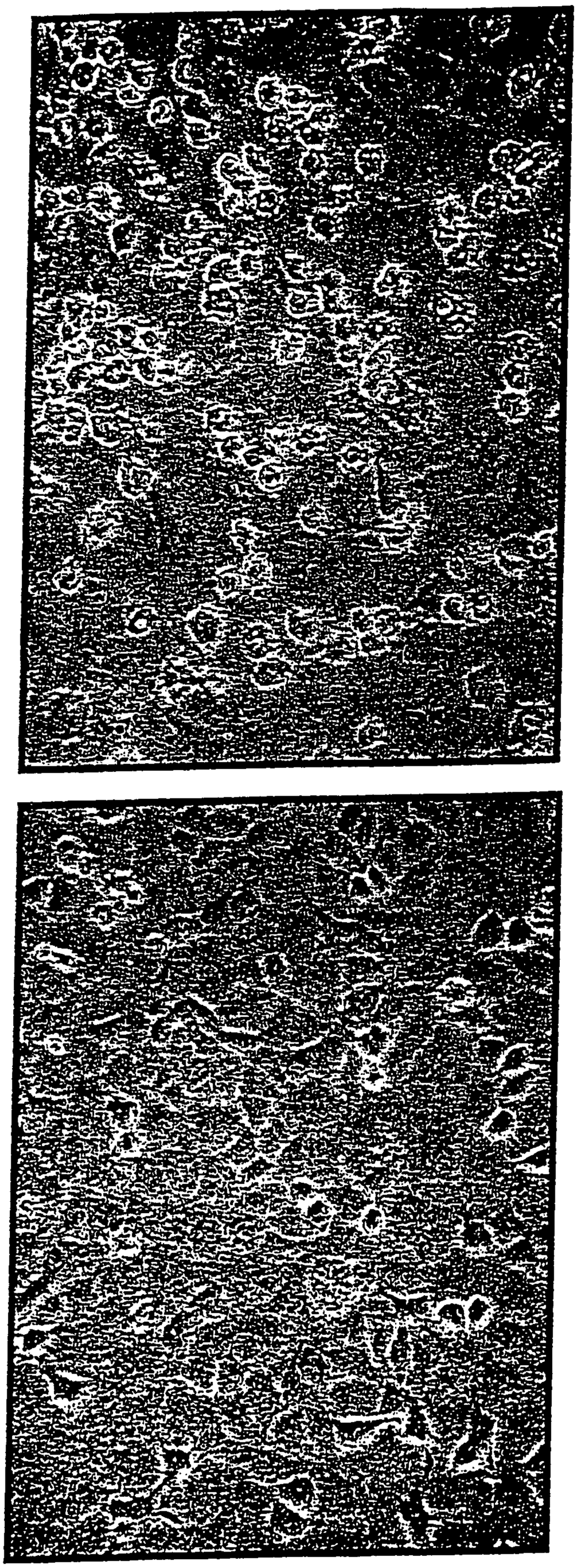

A.
PM
Contrôle
Virus WN
kDa
69
46
30
14
Neurones primaires
B.
Chasse (min)
Marquage de 10 min
0 15 30 45 60 90 120
E
NS1
prM
Cellules Neuro 2a
C.
Contrôle
Endo F
E
Cellules Neuro 2a

FIGURE 4



Souche IS-98-ST1 (m.i. de 4)
24 h d'infection

Contrôle

FIGURE 5

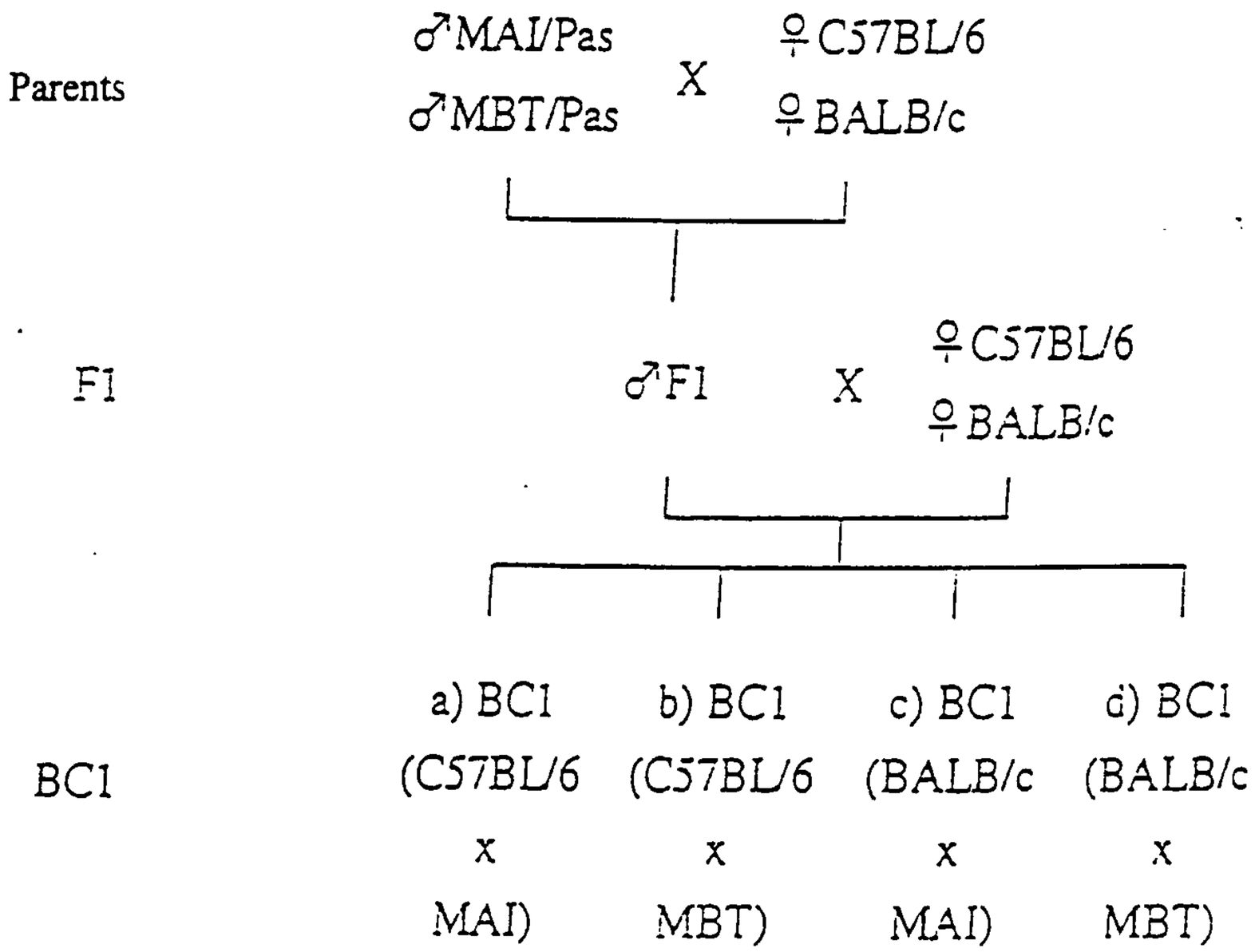
Souris
Lignées consanguines de laboratoire :

BALB/c, C57BL/6, DDK, 129, C3H et DBA/1
→ sensibles à l'infection par le virus WN

Souris sauvages :

SEG/Pas (*Mus spretus*), MAI/Pas, MBT/Pas (*Mus m. musculus*)
→ résistantes à l'infection par le virus WN

Génération de souris de premier croisement en retour (BC1)



Virus
Injection du virus West Nile (WN)
Souris âgées de 5 semaines
Observation des souris pendant les 14 jours suivant l'infection

Génotypage des allèles *Flv*
marqueurs flanquant le locus *Flv* sur le chromosome 5 de la souris

FIGURE 6

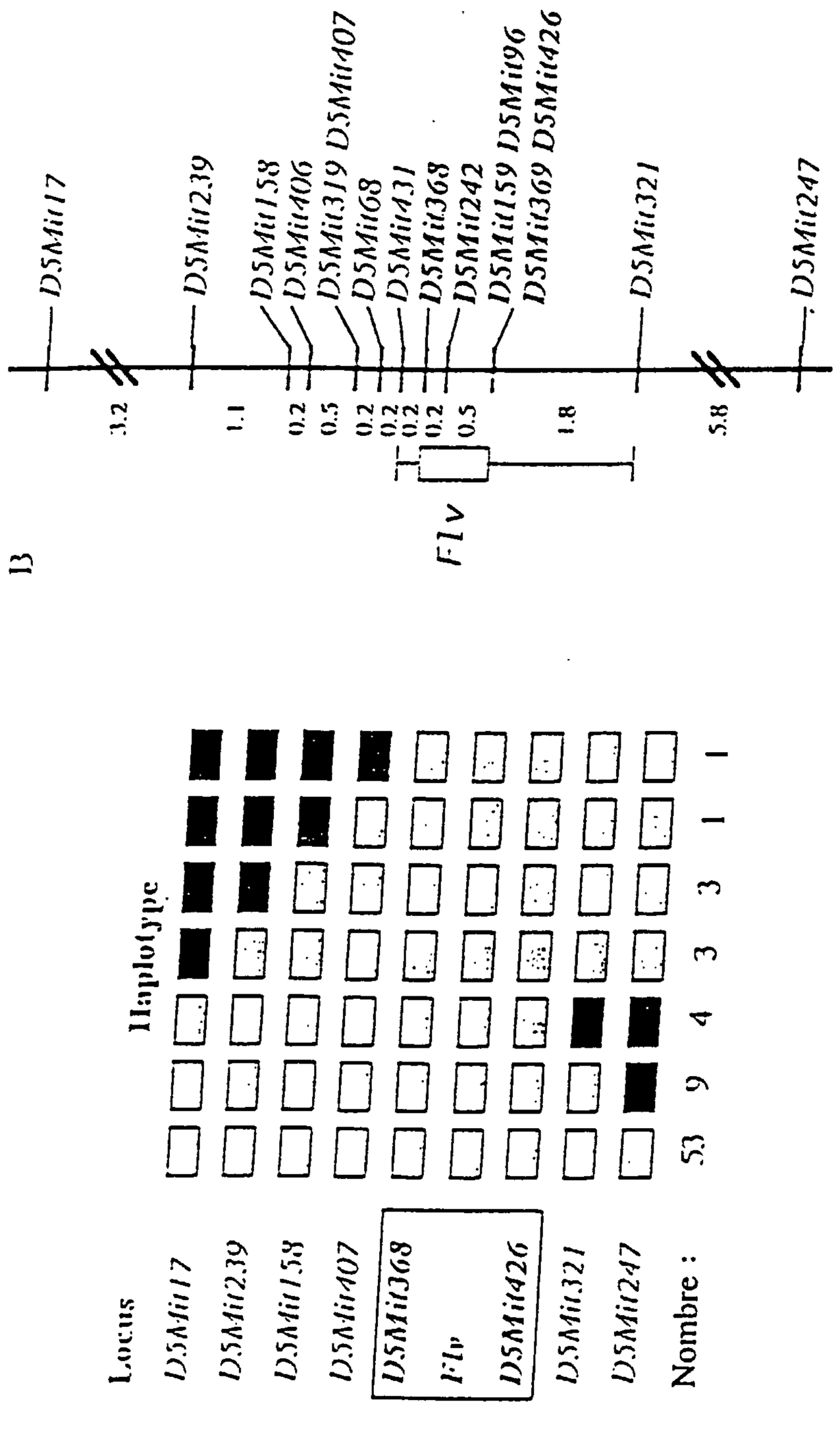

B
D5Mit17
D5Mit239
D5Mit158
D5Mit406
D5Mit319
D5Mit68
D5Mit431
D5Mit368
D5Mit242
D5Mit159
D5Mit369
D5Mit321
D5Mit247
3.2
1.1
0.2
0.5
0.2
0.2
0.2
0.2
0.5
1.8
5.8
Flv
A
Haplotype
Locus
D5Mit17
D5Mit239
D5Mit158
D5Mit407
D5Mit368
Flv
D5Mit426
D5Mit321
D5Mit247
Nombre :
53
9
4
3
3
1
1

FIGURE 7

Parents de la génération de premier croisement en retour (BC1)

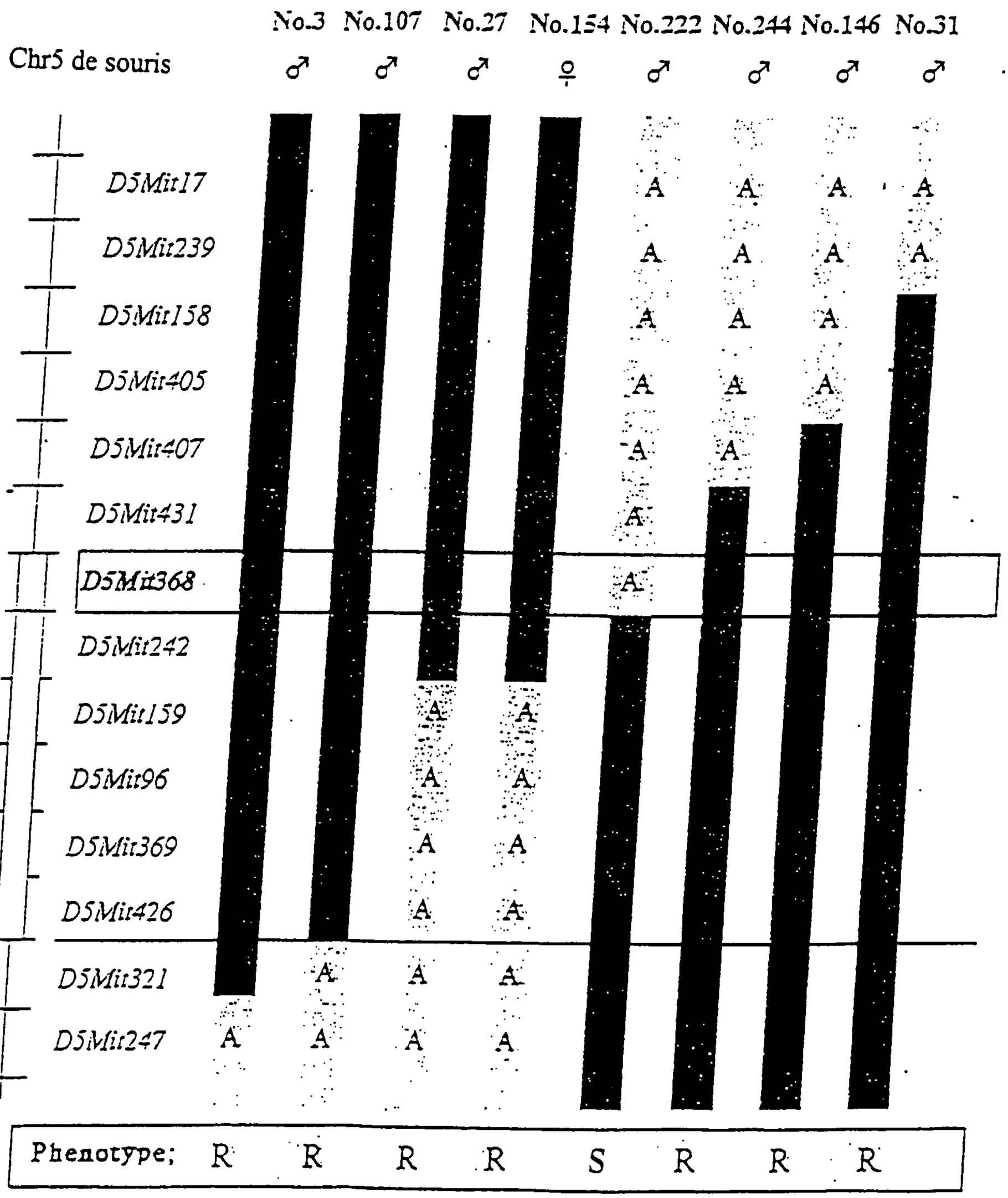


FIGURE 8

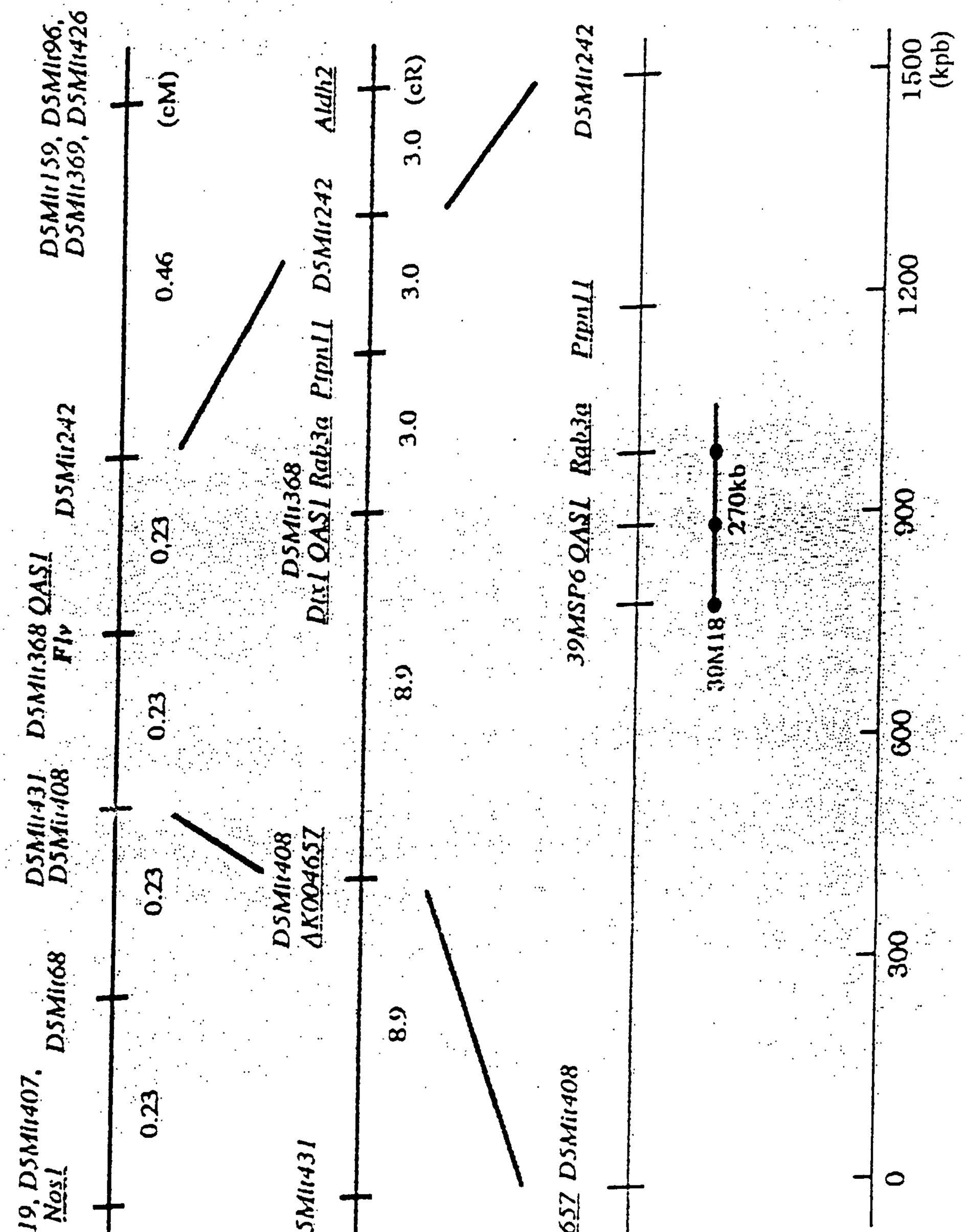

D5Mit159, D5Mit96,
D5Mit369, D5Mit426
(cM)
D5Mit242
0.46
0.23
0.23
D5Mit368 QAS1
Flv
0.23
D5Mit407,
D5Mit68
0.23
D5Mit319, D5Mit407,
Nos1
carte de liaison génique
Aldh2
3.0 (cR)
D5Mit242
3.0
D5Mit368
Dlx1 QAS1 Rab3a Pipn11
3.0
8.9
D5Mit431
D5Mit408
D5Mit408
AK004657
8.9
D5Mit431
carte des hybrides de radiation
D5Mit242
1500
(kpb)
1200
900
600
300
0
39MSP6 QAS1 Rab3a Pipn11
30M18
270kb
AK004657 D5Mit408
carte physique
clones BAC

FIGURE 9

Phénotype *Flv**	Survivants	Morts	Total
Résistant (*Flv*^{r}/*Flv*^{s})	108	0	108 (55%)
Sensible (*Flv*^{s}/*Flv*^{s})	21	74	95 (45%)
Total	129 (66%)	74 (34%)	203

* un allèle *Flv*^{r} est suffisant pour conférer la résistance

Figure 10