



Caractérisation des déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile

Steeve Lowenski

► To cite this version:

Steeve Lowenski. Caractérisation des déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. hal-01553679

HAL Id: hal-01553679

<https://ephe.hal.science/hal-01553679>

Submitted on 3 Jul 2017

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

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

Copyright



École Pratique des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté

Par

STEEVE LOWENSKI

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études en Sciences de la Vie et de la Terre

TITRE : Caractérisation des déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile.

Soutenu le 26 Juin 2017 devant le jury suivant :

RATINIER Maxime (EPHE) - Président

LECOLLINET Sylvie (ANSES) - Tuteur scientifique

DUPRESSOIR Thierry (EPHE) - Tuteur pédagogique

HADDAD Nadia (ENVA) - Rapporteur

LAMBRECHT Bénédicte (CERVA-CODA) - Examineur

Mémoire préparé dans l'UMR1161 de Virologie, INRA, ANSES, ENVA du Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort (ANSES). Directeur : Dr ZIENTARA Stephan

Sous l'encadrement de Céline Bahuon et Sylvie Lecollinet

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail dans le cadre de mon Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études en Sciences de la Vie et de la Terre.

Merci à Mesdames Nadia Haddad, Bénédicte Lambrecht et Monsieur Maxime Ratinier d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à mes encadrantes Mesdames Céline Bahuon et Sylvie Lecollinet.

Merci à Monsieur Thierry Dupressoir d'avoir accepté de reprendre la responsabilité de tuteur pédagogique suite au triste événement survenu.

Je tiens aussi à remercier l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) à travers la personne de Monsieur Pascal Boireau de m'avoir offert la possibilité de suivre cette formation et permis mon évolution.

Je remercie mon chef d'unité Monsieur Stéphan Zientara et ma responsable d'équipe Madame Sylvie Lecollinet pour m'avoir engagé en décembre 2008 et m'avoir encouragé et amené ici aujourd'hui.

Je remercie tout particulièrement les membres de mon équipe « Neurovirologie des zoonoses » pour m'avoir soutenu et accompagné sans faillir tout au long de ces années et de ce long voyage menant jusqu'à la matérialisation de ce rapport aujourd'hui entre vos mains. Et ce malgré les embûches rencontrées tout au long de ce projet ici présenté et qui n'en est encore qu'à ses débuts. Merci à vous d'avoir tenu bon dans toutes les situations.

Je remercie mes collègues et amis de l'UMR de Virologie d'avoir cru en moi et de m'avoir aidé à m'accomplir professionnellement et humainement. Un merci particulier à Françoise Gavard, Pascale Rivier et Aurélia Mamouni qui ne sont pas avares d'efforts permettant un fonctionnement optimum de l'unité au vu des conditions de travail parfois périlleuses inhérentes à de si grandes structures.

Merci de m'avoir aussi appris que le bon sens n'est pas le même pour tous et que s'y référer n'est que rarement une bonne solution.

Je remercie avec émotions mes amis qui m'accompagnent, me consolent, me poussent, me secouent, me soutiennent, me cajolent et m'ouvrent les yeux sur moi et sur le monde depuis tant d'années sans jamais m'abandonner, alors que nous le savons très bien....Dieu que c'est dur par moment.

Ces quelques lignes ne sont que si peu de choses à côtés de tout ce que vous m'avez apporté, et que je ne saurai jamais retranscrire avec des mots aussi fort soient-ils. « On ne choisit pas sa famille mais on choisit ses amis » parait-il, alors merci de m'avoir choisi tout autant que moi je vous ai choisi, mes amis...ma famille.

Merci aux femmes de ma vie, laissant des traces plus ou moins indélébiles et plus ou moins bonnes, merci à celles qui m'ont endurcie et merci surtout à celles qui me soutiennent et m'accompagnent encore ou étaient présentes pendant ce périple qui finalement ne m'ouvre aujourd'hui que des portes vers de nouvelles destinations plus loin encore. Je vous embrasse tendrement car vous avez aussi fait et faites toujours l'homme que je suis.

Grazie mia leonessa.

Enfin merci à ma famille qui me donne tant depuis ma naissance, et qui malgré la distance et le temps m'aime toujours autant. Merci à ma mère qui dans l'adversité a toujours fais face, qui a toujours espéré le meilleur pour moi, et m'y a toujours poussé.

Merci maman d'être là et d'avoir façonné les bases de l'homme que je suis aujourd'hui et de t'être assuré que je grandisse et m'accomplisse, merci d'avoir toujours été mon guide en pleine tempête, de n'avoir jamais vacillé quand j'ai eu besoin que tu sois forte pour nous deux. Merci...

Merci encore à tous, et merci à tous ceux que j'ai oublié ou simplement n'est pas pu citer car il me faudrait tant de pages et de temps.

« L'important ce n'est pas la destination, c'est le voyage »

Robert Louis Stevenson

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	19
I. LES ARBOVIRUS.....	19
II. LE VIRUS WEST NILE (VWN)	23
a. Epidémiologie	23
b. Classification virale	26
c. La particule virale	28
d. Le génome viral.....	29
e. Les protéines structurales.....	31
i. La protéine de capsid.....	31
ii. La protéine de membrane.....	31
iii. La protéine d'enveloppe.....	33
f. Les protéines non structurales	35
i. NS1	35
ii. NS2A et NS2B	35
iii. NS3	36
iv. NS4A, 2K et NS4B.....	36
v. NS5	37
g. Les régions non codantes	37
i. La région 5' non codante	37
ii. La région 3' non codante	37
III. LE CYCLE VIRAL	39
a. Entrée virale	39
b. Cycle cytoplasmique : Libération de l'ARN génomique et traduction de la polyprotéine	41
i. Réplication	43
ii. L'assemblage des particules virales	46
iii. Résumé.....	47

IV. CYCLE DE TRANSMISSION DU VIRUS	49
V. PATHOGENIE CHEZ LES HOTES VERTEBRES.....	53
VI. LA GÉNÉTIQUE INVERSE	54
PROJET	57
MATERIELS ET METHODES	59
I. CONSTRUCTION DU MUTANT NS3 P249T.....	59
II. CONSTRUCTIONS POUR LA PRODUCTION DE CHIMERES IS98/IT08	60
III. CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING : CPEC.....	64
a. Principe.....	64
b. Constructions.....	64
IV. PRODUCTIONS DES VIRIONS RECOMBINANTS	68
a. Production des virus issus des plasmides	68
V. DETERMINATION DE LA VIRULENCE <i>IN VITRO</i> (TITRAGES ET CINETIQUE DE REPLICATION VIRALE)	71
a. Culture cellulaire et infection par les différentes souches de virus.....	71
b. Cinétiques de réplication virale en cellules VERO	71
c. Titrage DECP ₅₀	72
d. Plages de lyse	74
VI. DETERMINATION DE LA VIRULENCE <i>IN VIVO</i> (EXPERIMENTATION ANIMALE).....	75
a. Infections et prélèvements : modèle murin.....	75
b. Infections et prélèvements : modèle aviaire	76
VII. EXTRACTION ET AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES.....	78
a. Extraction des acides nucléiques	78
b. Reverse Transcription-PCR quantitative (RT-qPCR)	79
RESULTATS	83

I. BILAN DES CONSTRUCTIONS.....	83
II. DETERMINATION DE LA VIRULENCE <i>IN VITRO</i>	85
a. Réplication virale et capacités de diffusion des particules infectieuses (Plages de Lyse)	85
b. Cinétiques d'infection	86
III. DETERMINATION DE LA VIRULENCE <i>IN VIVO</i> : EXPERIMENTATION ANIMALE.....	89
a. Importance du résidu 249 de NS3 dans la modulation de la virulence du VWN chez la souris	90
i. Suivi de mortalité des souris	90
ii. Virémie des souris	91
iii. Détermination des charges virales dans les cerveaux des souris décédées post-infection	92
b. Virulence des virus chimères Is98/It08 en modèle murin	95
i. Suivi de mortalité des souris	95
ii. Evaluation des capacités répliquatives périphériques et centrale	95
c. Résultats des expérimentations menées sur modèle aviaire pour l'étude des chimères Is98/It08	98
i. Suivi de mortalité des poulets SPF infectés à 10 ³ TCID50:	98
ii. Evaluation des capacités répliquatives périphériques et centrale	101
iii. Suivi du virus dans les écouvillons oraux	104
DISCUSSION	107
PERSPECTIVES	115
BIBLIOGRAPHIE	117
RESUME	125

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : CYCLE EPIDEMIOLOGIQUE D'UN ARBOVIRUS.....	19
FIGURE 2 : ETAPES DE LA DISSEMINATION D'UN ARBOVIRUS : EXEMPLE DU VIRUS DE LA DENGUE, CHEZ UN ARTHROPODE HEMATOPHAGE, LE MOUSTIQUE.....	20
FIGURE 3 : CINETIQUE DE MARQUEURS BIOLOGIQUES (VIROLOGIQUES ET SEROLOGIQUES) DE L'INFECTION A VIRUS ZIKA:	21
FIGURE 4 : NOMBRE DE CAS HUMAINS D'INFECTION A VWN (FORMES NEUROINVASIVES GRAVES) DECLARES PAR ANNEE EN EUROPE ET EN RUSSIE (SOURCE : ECDC) (28)	25
FIGURE 5 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DU VWN (COMMUNICATION ORALE S.LECOLLINET, INTERNATIONAL EQUINE INFECTIOUS DISEASE CONFERENCE, BUENOS AIRES, 2016)	27
FIGURE 6: (A) REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES PARTICULES VIRALES (D'APRES HTTP://VIRALZONE.EXPASY.ORG). (B) CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE PARTICULES DU VIRUS WEST NILE (D'APRES (16)).	28
FIGURE 7: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DU GENOME DU VWN ET DE LA TRADUCTION DES PROTEINES VIRALES AVEC UNE INDICATION DE LEUR FONCTION (D'APRES MURRAY <i>ET AL.</i> , 2010 (18))......	30
FIGURE 8: MATURATION DE LA NEO-PARTICULE VIRALE (D'APRES LINDENBACH <i>ET AL.</i> , 2007 (42)).	32
FIGURE 9: REPRESENTATION DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE D'ENVELOPPE (FORME HOMODIMERIQUE PRESENTE A LA SURFACE DES PARTICULES VIRALES MATURES) (57).	33
FIGURE 10: REPRESENTATION DE LA FORME TRIMERIQUE DE E (D'APRES HARRISON, 2008 (58)).	34
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CADRE DE LECTURE DE NS3, AINSI QUE DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA PROTEINE (84).	36
FIGURE 12: MECANISME DE FUSION DE LA MEMBRANE VIRALE A LA MEMBRANE CELLULAIRE PAR ENDOCYTOSE (D'APRES COSSET, 2010 (106)).	40
FIGURE 13 : STRUCTURE DU GENOME VIRAL ET EXPRESSION DE LA POLYPROTEINE (D'APRES LINDENBACH <i>ET AL.</i> , 2007 (42))	42

FIGURE 14: LE COMPLEXE DE REPLICATION VIRALE (RC) CONSTITUE DE NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B ET NS5.	43
FIGURE 15: COUPLAGE DE LA TRADUCTION, DE LA REPLICATION ET DE L'ASSEMBLAGE DES PARTICULES VIRALES (D'APRES WESTAWAY <i>ET AL.</i> , 2003 (107))	46
FIGURE 16: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE DU VWN (D'APRES HEINZ ET STIASNY, 2011 (109))......	48
FIGURE 17: CYCLE DE TRANSMISSION DU VIRUS WEST NILE (D'APRES HUHN <i>ET AL.</i> , 2003 (143)).	52
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRATEGIE DE CLONAGE.....	61
FIGURE 19 : SCHEMA DE LA STRATEGIE DE CLONAGE DU CLONE INFECTIEUX IS98 (D'APRES BAHUON <i>ET AL.</i> , 2012 (176)).	63
FIGURE 20 : SCHEMA DU PRINCIPE DU CPEC (D'APRES QUAN ET TIAN, 2009 (180))	64
FIGURE 21: SCHEMA DU POLYLINKER (UTR-LINKER) UTILISE POUR LA CONSTRUCTION DU CLONE INFECTIEUX PAR LA TECHNIQUE CPEC (D'APRES SETOH <i>ET AL.</i> , 2015 (181)).	65
FIGURE 22 : EXEMPLE DE TRANSFECTION D'ARN DANS DES CELLULES VERO PAR ELECTROPORATION.....	69
FIGURE 23: EXEMPLE DE PLAQUE DE 96 PUIITS POUR UN TITRAGE DE PARTICULES VIRALES INFECTIEUSES D'IS98 A UNE MOI DE 1 ET DE 0.1 EN DECP ₅₀	73
FIGURE 24 : OBSERVATION DES PLAGES DE LYE OBTENUES 3 JOURS POST INFECTION DE CELLULES VERO AVEC LES DIFFERENTES PRODUCTIONS VIRALES A 100 PFU PAR PUIITS (CES RESULTATS SONT REPRESENTATIFS DE 2 ESSAIS INDEPENDANTS).	85
FIGURE 25 : CINETIQUE D'INFECTION DE CELLULES VERO AVEC 0.1 MOI DES DIFFERENTS VIRUS PRODUITS.....	87
FIGURE 26: PRODUCTION DE PARTICULES INFECTIEUSES APRES INFECTION DE CELLULES VERO PAR LES VIRUS IS98, IT08, CHIMERES 3 ET 4 (CH3 ET 4) A J1 (A) ET J2 (B) POST-INFECTION. **** POUR P<0.01 (1 SEUL ESSAI, AVEC ANALYSES DES CONDITIONS EXPERIMENTALES EN TRIPLICAT).....	88
FIGURE 27 : CHARGE VIRALE MOYENNE PAR μ L D'ARN EXTRAIT DANS DES SERUMS A 4 JPI CHEZ DES SOURIS BALB/CBYJ INFECTEES PAR 0.1, 1, 10 OU 100 PFU VIA LA VOIE	

IP (A) ET 0.01, 0.1 OU 1 PFU VIA LA VOIE IC (B), SOIT AVEC LE VIRUS WT PRO (BARRES NOIRES) SOIT AVEC LE MUTANT THR (MUT THR) (BARRES BLANCHES) ESTIME PAR QRT-PCR SPECIFIQUE DE LA REGION 3'NC..... 92

FIGURE 28 : CHARGE VIRALE MOYENNE PAR μ L D'ARN EXTRAIT DE CERVEAUX DE SOURIS BALB/CBYJ FEMELLES INFECTEES PAR 0.1, 1, 10 OU 100 PFU VIA LA VOIE IP (A) ET PAR 0.01, 0.1 OU 1 PFU VIA LA VOIE IC (B) DE WT PRO (BARRES NOIRES) OU MUT THR (BARRES BLANCHES) TELLE QU'ESTIMEE PAR QRT-PCR SPECIFIQUE DE LA REGION 3'NC. 93

FIGURE 29 : COURBES DE SURVIE SUR 16 JOURS DE LA POPULATION DE SOURIS SURVIVANTES APRES PRIMO INFECTION AVEC LES VIRUS WT PRO ET MUT THR ET EPROUVEE 21 JOURS P.I AVEC 10^4 PFU DU VIRUS SAUVAGE IS-98-ST1. 94

FIGURE 30 : VIREMIE DANS LE SANG DES SOURIS INFECTEES AVEC LES VIRUS IS98, IT08, CHIMERES 3 ET 4 A DES DOSES DE 1, 10 OU 100 PFU ET DES GROUPES TEMOINS (PBS ET TEMOIN NEGATIF), MESUREE PAR RT-QPCR. 96

FIGURE 31 : QUANTIFICATION PAR RT-QPCR DES CHARGES VIRALES DANS LES CERVEAUX DES SOURIS DECEDEES SUITES A L'INFECTION PAR LES VIRUS IS98, IT08, CHIMERE 3, OU CHIMERE 4 A DES DOSES DE 1, 10 OU 100 PFU..... 97

FIGURE 32 : COURBES DE SURVIE SUR 14 JOURS DE LA POPULATION DE POULETS SPF DE 1J INFECTES PAR LES VIRUS IS98, IT08, CHIMERE 3, OU CHIMERE 4..... 99

FIGURE 33 : RESULTATS DE LA QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL PAR RT-QPCR POST-INFECTION PAR LES VIRUS IS98, IT08, CHIMERE 3, OU CHIMERE 4 CHEZ LES POUSSINS SPF DE 1J SELON LA VOIE D'INOCULATION (INTRA CRANIEENNE (IC) OU SOUS-CUTANEE (SC))...... 103

FIGURE 34 : QUANTIFICATION VIRALE PAR RT-QPCR DANS LES ECOUVILLONS ORAUX REALISES A 3, 7 ET 14 JOURS POST INFECTION PAR LES VIRUS IS98, IT08, CHIMERE 3, OU CHIMERE 4 SUR LES POULETS SPF DE 1J INFECTES PAR VOIE INTRA CRANIEENNE (IC) OU SOUS-CUTANEE (SC). 104

FIGURE 35 : TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS ET CONCLUSIONS POUR LES VIRUS IS98, IT08, CHIMERE 3 ET 4. 112

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : TABLEAU NON EXHAUSTIF DES TRAVAUX EFFECTUES SUR DES OISEAUX PRESENTS EN EUROPE ET INFECTES PAR LE VIRUS WEST NILE (115, 117-119, 121-123, 125-127). NA = NON APPLICABLE	50
TABLEAU 2: TABLEAU NON EXHAUSTIF DE TRAVAUX EFFECTUES SUR DES CLONES INFECTIEUX DU VIRUS WEST NILE.....	55
TABLEAU 3 : AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DES FRAGMENTS D'INTERET DE LA SOUCHE IT08.....	62
TABLEAU 4: SITES DE DIGESTION ENZYMATIQUES UTILISES POUR L'INSERTION DES FRAGMENTS IT08 DANS LE CLONE INFECTIEUX IS98.	62
TABLEAU 5 : RECAPITULATIF DES SEQUENCES D'AMORCES DES DIFFERENTS FRAGMENTS	65
TABLEAU 6 : RECAPITULATIF DES MATRICES UTILISEES POUR LA GENERATION DES DIFFERENTS FRAGMENTS.....	65
TABLEAU 7 : RECAPITULATIF DU MELANGE REACTIONNEL POUR L'AMPLIFICATION INDIVIDUELLE DE CHAQUE FRAGMENT POUR UN TUBE DE REACTION	66
TABLEAU 8 : RECAPITULATIF DES TAILLES ATTENDUES POUR LES DIFFERENTS FRAGMENTS	66
TABLEAU 9 : RECAPITULATIF DU MELANGE REACTIONNEL POUR UN TUBE DE REACTION POUR L'ASSEMBLAGE DES QUATRE FRAGMENTS ET DU POLYLINKER.	67
TABLEAU 10 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTS GROUPES DE SOURIS.....	75
TABLEAU 11 : RECAPITULATIF DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LES INFECTIONS SUR POULETS SPF DE 1 JOUR.....	77
TABLEAU 12 : RECAPITULATIF DES VOLUMES POUR UN Puits POUR UNE EXTRACTION D'ARN PAR LE ROBOT KINGFISHER	79
TABLEAU 13 : REACTIFS NECESSAIRES A LA RT-QPCR POUR UN TUBE. LES REACTIFS SONT ASSEMBLES DANS LA GLACE.	81
TABLEAU 14 : RECAPITULATIF DES CONSTRUCTIONS OBTENUES PAR APPROCHE CLASSIQUE DE CLONAGE	84

TABLEAU 15 : RECAPITULATIF DES AMPLIFICATIONS ET PLASMIDES UTILISES POUR LA PRODUCTION DES CHIMERES 1 ET 2 PAR APPROCHE CPEC. CI = CLONE INFECTIEUX IS98.	84
TABLEAU 16 : MALADIE CLINIQUE CHEZ DES SOURIS BALB/CBYJ AGEES DE 5 SEMAINES INFECTEES PAR LES VIRUS WT PRO ET MUTANT THR (MUT THR) VIA LA VOIE IP (A) OU LA VOIE IC (B).	91
TABLEAU 17 : SYNTHÈSE DES RESULTATS DES ELISA IGG WEST NILE (ID SCREEN WEST NILE COMPETITION (IDVET)) REALISES A J18 POST INFECTION SUR LES SOURIS INOCULEES AVEC LES VIRUS WT PRO ET MUTANT THR PAR VOIE IP ET AYANT SURVECU.	94
TABLEAU 18 : VIRULENCE DES VIRUS IS98, IT08, CHIMERES 3 ET 4 CHEZ LA SOURIS BALB/CBYJ.	95
TABLEAU 19 : VIRULENCE DES VIRUS IS98, IT08, CHIMERES 3 ET 4 CHEZ LE POULET SPF DE 1J.	99
TABLEAU 20 : SEROCONVERSION DES SURVIVANTS A J14 P.I	100

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMCR : AMerican Crow (Corbeaux américains)

Amorce F : Amorce « sens »

Amorce R : Amorce « antisens »

Arbovirus : ARthropod-BORne viruses (virus ayant pour vecteur un arthropode)

ARN : Acide Ribonucléique

B

B956 : souche Ouganda B956 du virus West Nile

BAGV : virus Bagaza

C

C : Protéine de Capside

C3: Protéine du complément C3

Ca et Mg : Calcium et magnésium.

CD : Cluster de différenciation ; Antigène cellulaires du système immunitaire

CERVA CODA : Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques, Belgique

CI : Clone infectieux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV: Cytomégalovirus

CPEC: Circular Polymerase Extension Cloning

CT: Cycle Threshold

C-terminal : Extrémité se terminant par un acide aminé avec une fonction carboxyle (-COOH).

D

DC-SIGN et DC-SIGNR : récepteurs localisés à la surface des cellules dendritiques

DENV : virus de la Dengue

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

dNTPs : désoxyribonucléotides

E

E : Protéine d'enveloppe

eIF4B/ eIF4F : facteur eucaryotique d'initiation de la traduction 4B ou 4F.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

F

FR : Forme répllicative

H

HDVr : Ribozyme du virus de l'hépatite delta

HEK293T : cellule de rein embryonnaire humain

I

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule ; Molécule d'adhésion inter cellulaire

IFN: Interferon

Ig(M ou G) : immunoglobulines (M ou G)

IS-98-ST1: souche Israël 98, lignage 1

It08 : souche Italie 2008

J

JEV : virus de l'encéphalite japonaise

K

KN3829: souche Kenya 3829

kV: kilovolt, mille Volt

M

Ma03 : souche Maroc 2003

MVEV : virus de l'encéphalite de Murray Valley

N

NS : Protéine Non Structurale

NS3-249: Protéine NS3, acide aminé en position 249

NS3-P249T : Mutation de substitution d'une Proline par la Thréonine en position 249 sur la protéine NS3

N-terminal : Extrémité se terminant par un acide aminé avec une fonction amine (-NH₂).

NY99 : souche New York 99

O

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

P

P0, P1: Passage initial, Passage initial plus un

PABP : Poly(A) binding protein, protéine de liaison au Poly (A)

PBS : Tampon phosphate

PFU : Plaque-Forming Unit, Unité formant plaque.

pH : Potentiel Hydrogène, valeur indiquant la propriété acido-basique (acide, neutre, basique).

PrM/M : Protéine de Membrane

Pro : Proline

R

RE : Réticulum Endoplasmique

Rpm: « Round per minute », tour par minute

RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (transcription inverse - réaction de polymérisation en chaîne)

RT-qPCR: Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction, (Reverse transcription- PCR quantitative)

S

SLEV : virus de l'encéphalite de Saint-Louis

SP07 : souche Espagne 2007

SVF : Sérum de veau fœtal

T

Thr : Thréonine

TLR : « Toll Like Receptor», Récepteur de type Toll

U

USUV : virus Usutu

V

VERO : cellules immortelles dérivant de cellules tumorales de reins de singes verts africains.

VWN : West Nile virus (virus du Nil occidental)

W

WT: Wild Type (type sauvage)

Y

YFV : virus de la fièvre jaune

Autres :

μF : microfarad, un millionième de Farad

μL : microlitre, un millionième de litre

2K : Peptide

3' NC : Extrémité 3' non codante de l'ARN (3' : Carbone en position 3 du sucre)

5' NC : Extrémité 5' non codante de l'ARN (5' : Carbone en position 5 du sucre)

INTRODUCTION

I. Les arbovirus

Le virus West Nile (VWN) est un arbovirus, mais qu'est-ce un « arbovirus » ? Le terme « Arbovirus » provient de la contraction de l'anglais « ARthropod-BORne VIRUSes ». Ce terme rassemble des virus classés dans différentes familles comme les agents de la fièvre jaune, de la dengue (famille des *Flaviviridae*) et du chikungunya (famille des *Togaviridae*). Un arbovirus est donc un virus ayant pour vecteur un arthropode, souvent hématophage tel que les tiques, les moustiques et d'autres insectes piqueurs (exception faite des insectes suceurs de sève et autres phytophages).

Ces arthropodes hématophages jouent le rôle de vecteurs biologiques, c'est-à-dire permettant la multiplication du virus avant de le transmettre au cours d'un repas sanguin.

Les arbovirus sont donc par définition forcément associés à un arthropode et capables d'infecter des hôtes très variés (arthropode et hôte vertébré réservoir au minimum) (figure 1). Ils semblent avoir une grande facilité à franchir la barrière d'espèce (1).

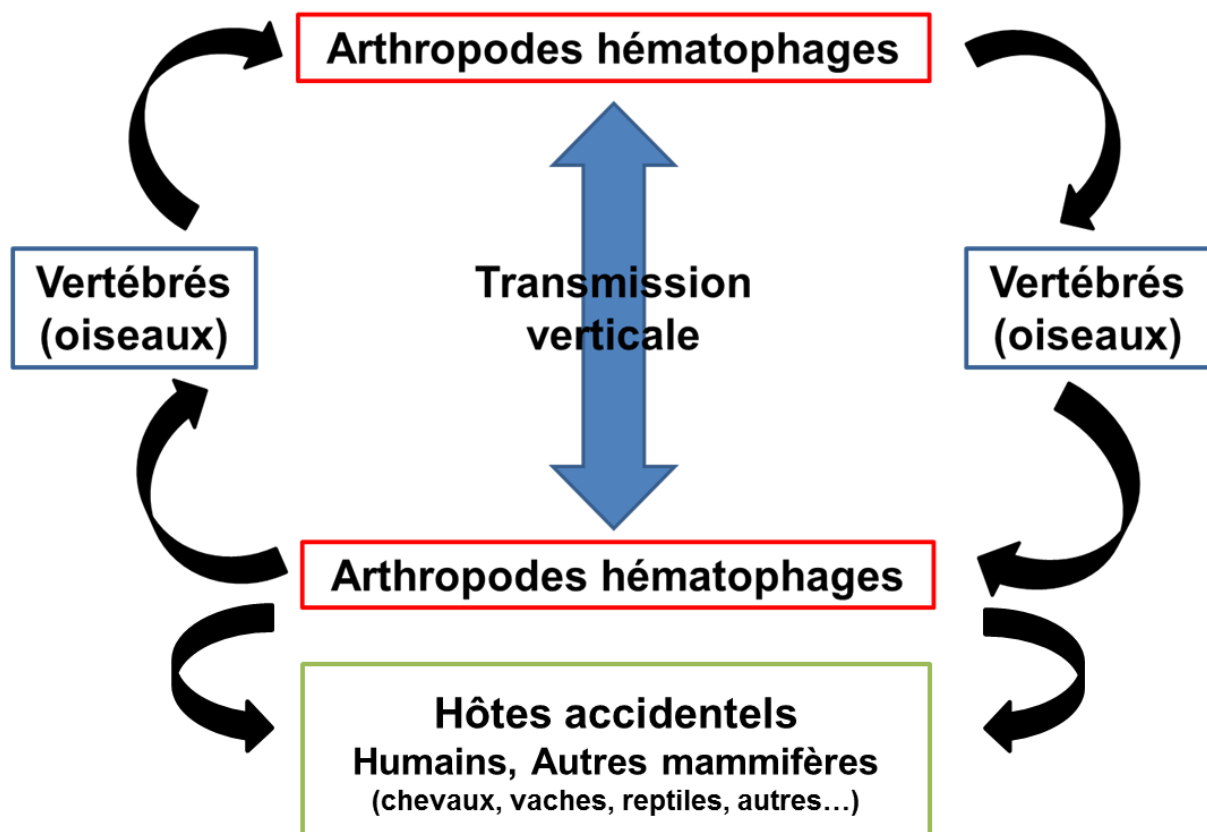
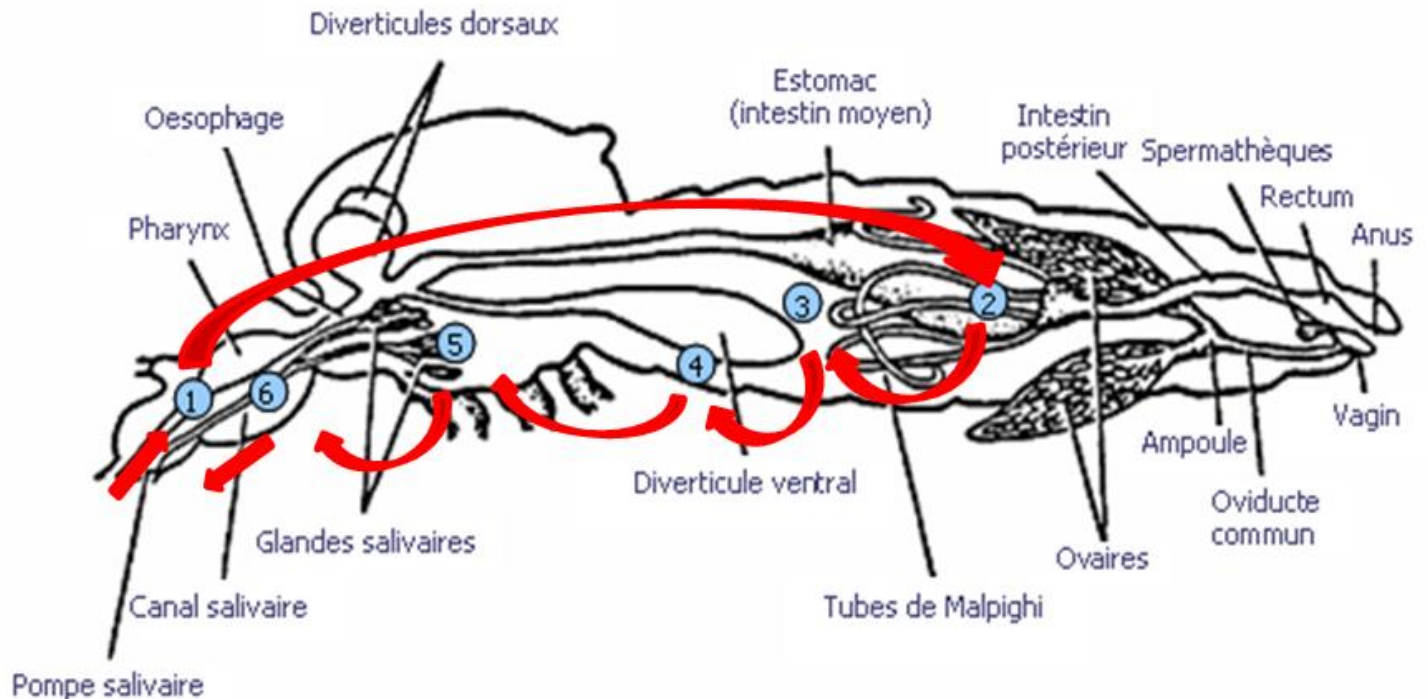


Figure 1 : Cycle épidémiologique d'un arbovirus

La relation virus vecteur est complexe comme le montre l'exemple ci-dessous (figure 2).



- 1) Le repas de sang infectant est ingéré
- 2) Le virus infecte et se réplique dans les cellules épithéliales de l'estomac;
- 3) Le virus quitte les cellules épithéliales de l'estomac;
- 4) Le virus infecte et se réplique dans les cellules du tissu adipeux;
- 5) Le virus infecte et se réplique dans les cellules épithéliales des glandes salivaires (et dans d'autres tissus);
- 6) Le virus est libéré dans la salive avec laquelle il sera transmis lors du prochain repas sanguin

Figure 2 : Etapes de la dissémination d'un arbovirus : exemple du virus de la dengue, chez un arthropode hématophage, le moustique.

Une condition pour qu'un virus puisse être transmis par un vecteur hématophage est de provoquer une phase de virémie chez le vertébré. Celle-ci doit répondre à deux critères : être suffisamment élevée et prolongée dans le temps (figure 3).

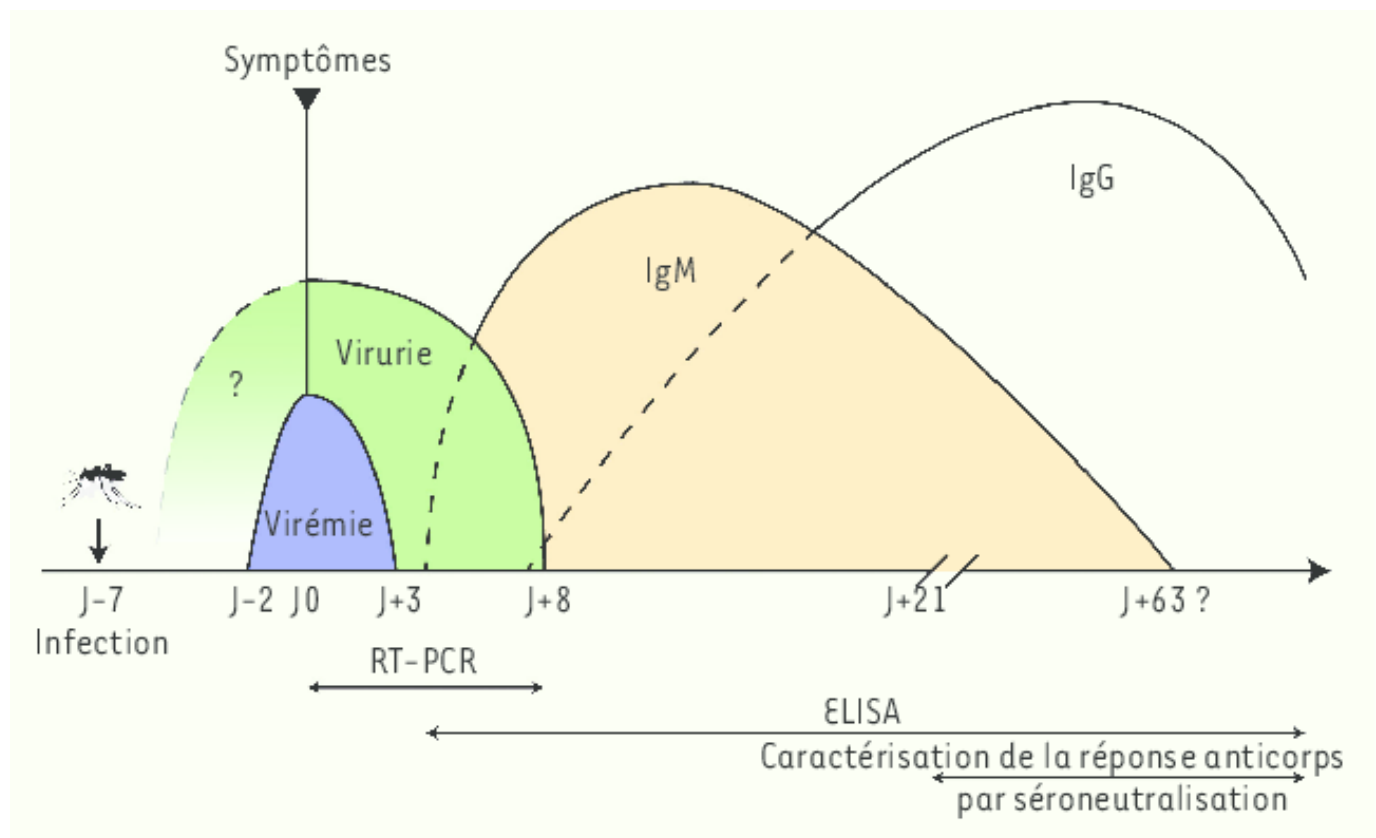


Figure 3 : Cinétique de marqueurs biologiques (virologiques et sérologiques) de l'infection à virus Zika:
 Support diagnostique (adapté du Centre National de Référence). Ig(M ou G) : immunoglobulines (M ou G) ; J ± n : jour par rapport à l'apparition des symptômes ; RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction (2).

Mais la bonne réalisation des phénomènes décrits en figure 2 demande du temps : après s'être gorgé sur un vertébré virémique, l'arthropode ne sera infectant (c'est-à-dire que sa salive contiendra des virions) que 6 à 8 jours plus tard - cette période d'incubation dite extrinsèque est variable suivant le virus, l'arthropode, et les conditions environnementales. Cela signifie que, pour avoir une bonne capacité vectorielle, l'insecte en question devra survivre suffisamment longtemps (3). L'infection du moustique par le VWN affecte la reproduction du moustique de manière négative mais augmente son appétit favorisant ainsi sa capacité vectorielle (4). De même, *Plasmodium spp.* réduit la survie et la fécondité des moustiques vecteurs, suggérant un effet direct du pathogène sur son vecteur (5, 6). Cependant, Anderson et al. (2000) (7) ont montré que les *Anopheles gambiae* porteurs de *P. falciparum* ont une augmentation de leur taux de mortalité. En effet les moustiques porteurs de *P. falciparum* passent plus de temps à se nourrir sur un nombre d'hôtes plus important, s'exposant ainsi à plus de risque d'être écrasé par l'hôte incommodé. Pour un virus donné, des populations différentes d'un même moustique peuvent présenter des degrés variés de compétence vectorielle (aptitude intrinsèque d'un arthropode à acquérir un virus lors d'un repas sanguin, en assurer la multiplication et/ou le développement et le transmettre à un hôte vertébré).

Il s'agit, en fait, d'une modulation de l'infection virale chez l'insecte, aboutissant à l'installation d'un certain état d'équilibre. Si la compétence est trop forte, il y a risque d'emballement du système; si elle est trop faible, on aboutit à l'arrêt de la transmission.

L'ensemble de ces relations intrinsèques et extrinsèques est aussi appelé « fitness » de l'hôte par rapport au virus.

On conçoit alors que le rôle de l'insecte ne se limite pas à la simple transmission du virus. L'insecte peut assurer aussi son amplification, son passage d'une espèce-hôte à une autre, sa maintenance dans le foyer, sa persistance durant l'hiver ou la saison sèche.

Les arbovirus sont actuellement des virus d'importance majeure en santé publique au niveau mondial. On estime qu'aujourd'hui plus de 70 % des virus de plantes et quelque 40 % des virus de mammifères ont des arthropodes comme vecteurs. Les arbovirus semblent tirer parfaitement profit des possibilités offertes par leurs vecteurs que ce soit en termes de propagation multi espèces ou de maintien dans le temps et l'écosystème. Une étude suggère même que les premières relations entre les virus et les arthropodes remonteraient à quelques 200 millions d'années (8).

Les virus font souvent montre d'une adaptation extrême qui les rend spécifiques d'un hôte ou d'un type d'hôte, ainsi certains virus ne touchent que les mammifères, les oiseaux, ou les insectes sans jamais franchir la barrière d'espèce. C'est le cas pour certains flavivirus récemment découverts (9, 10), limités à l'espèce d'arthropode hôte où ils ont été découverts.

Certains flavivirus arrivent cependant à franchir la barrière d'espèce (DENV, VWN, ZIKA, etc..) qui peuvent passer de l'arthropode à l'oiseau, ou au mammifère (11). Franchir la barrière d'espèce et s'adapter à un nouvel hôte a un coût, nécessite du temps et le franchissement de nombreux obstacles, tels que l'interaction avec de nouvelles cellules cibles, l'échappement au système immunitaire et aux mécanismes de défense cellulaire (12). Avoir un vecteur permettant au virus de multiplier ses tentatives d'adaptation est important pour faciliter la réussite d'événements d'infection chez une nouvelle espèce hôte. Au vu des découvertes récentes sur l'existence de flavivirus exclusivement limités à des arthropodes, et de l'existence de nombreux flavivirus pouvant infecter plusieurs espèces vertébrées et invertébrées, on peut émettre l'hypothèse que les arbovirus sont à l'origine des virus d'insectes qui ont réussi à s'adapter et franchir la barrière d'espèce avec le concours de leurs vecteurs hématophages ou phytopages.

Il est important de noter l'émergence et/ou une réémergence de divers arbovirus sur des territoires où ils n'avaient pas encore été identifiés ou dont ils avaient apparemment disparu

depuis des décennies. Ces virus circulent au sein d'un réservoir animal sauvage et beaucoup d'entre eux peuvent être transmis accidentellement à des animaux domestiques et à l'homme.

Chez l'homme, bien qu'elles soient le plus souvent asymptomatiques, les arboviroses peuvent provoquer, plus ou moins fréquemment, des encéphalites avec de graves séquelles neurologiques, des arthralgies handicapantes ou des fièvres hémorragiques. Les premières peuvent se traduire également par des affections neurologiques chez les équidés avec un taux de létalité relativement élevé.

Leur expansion s'inscrit dans le cadre plus large de celle de nombreuses maladies à transmission vectorielle qui affectent de façon croissante les populations animales et humaines depuis une trentaine d'années, parallèlement au développement des transports modernes, de l'urbanisation et à la mondialisation, ainsi qu'aux changements climatiques.

Les récentes épizooties apparues à travers le monde ces dernières années et en 2015, tels que la dengue, Zika, West Nile, en sont de parfaits exemples (13, 14).

Nous allons nous intéresser tout particulièrement au virus West Nile.

II. Le virus West Nile (VWN)

a. Epidémiologie

Le virus West Nile (VWN) est un arbovirus transmis par piqûre de moustique.

Il appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus* et est responsable de la fièvre West Nile ou fièvre du Nil occidental. Le VWN est transmis principalement par des moustiques du genre *Culex* et amplifié selon un cycle enzootique moustiques-oiseaux. Le réservoir naturel du VWN est composé par la faune aviaire sauvage. Il peut infecter une grande variété d'espèces animales mais les hôtes mammifères représentent souvent un cul-de-sac épidémiologique, c'est à dire qu'ils ne sont infectés qu'occasionnellement et qu'il n'y a pas de transmission secondaire.

Le VWN a été identifié pour la première fois en 1937, lorsqu'il a été isolé en Ouganda, dans la province du Nil Occidental (15), à partir du sang d'une malade (16). Initialement, la fièvre West Nile était considérée comme une arbovirose mineure, responsable chez l'homme d'infections asymptomatiques ou d'un syndrome pseudo-grippal et plus rarement d'encéphalites pouvant être mortelles. Son statut est remis en cause à la fin des années 1990 avec des épidémies incluant de nombreux cas humains, comme en Algérie (1994), en Roumanie (1996), en Tunisie (1997), en Israël (2000), et des cas équins au Maroc (1996), Italie (1998), Israël et France (2000) (17). Une épidémie majeure éclate à New York en 1999, sur un territoire vierge de VWN. Après bientôt 20 ans, le VWN est endémique sur tout le territoire nord-américain et à la frontière

canadienne. Près de 46000 cas humains de méningites ou d'encéphalites dont plus de 2000 infections fatales y ont été répertoriés. Une mortalité massive de la faune aviaire locale y a aussi été observée (18). La souche isolée à New York est très proche de celle isolée en 1998 sur une cigogne en Israël, elle diffère par 28 changements nucléotidiques impliquant 10 changements d'acides aminés (19). Récemment, des virus proches et transmis par des moustiques *Culex* ont été identifiés en Europe: le virus Usutu (USUV), rencontré jusque-là en Afrique, a été isolé en Europe centrale (Autriche, Hongrie,...) et occidentale (Espagne) et a récemment causé des épizooties associées à des épisodes de mortalité dans l'avifaune sauvage et de parc zoologique en France (20-25); un nouveau virus émergent, le virus Bagaza (BAGV), a été identifié en Espagne en 2010 (26).

Parmi les mammifères, l'Homme et les équidés sont les plus sensibles à l'infection par le VWN, il peut causer chez eux dans 1-10% des cas des infections neurologiques graves. Il circule de façon enzootique en Afrique, en Australie et en Asie, alors que dans le reste du monde, notamment en Europe et en Amérique du Nord, il provoque régulièrement des cas chez l'homme et le cheval.

En Europe, même si la situation n'a rien de comparable avec la spectaculaire épidémie/épizootie nord-américaine enregistrée à partir de 1999, la circulation du VWN s'est intensifiée depuis 2008 avec des cas cliniques humains enregistrés dans 11 pays en 2012 (27) (figure 4).

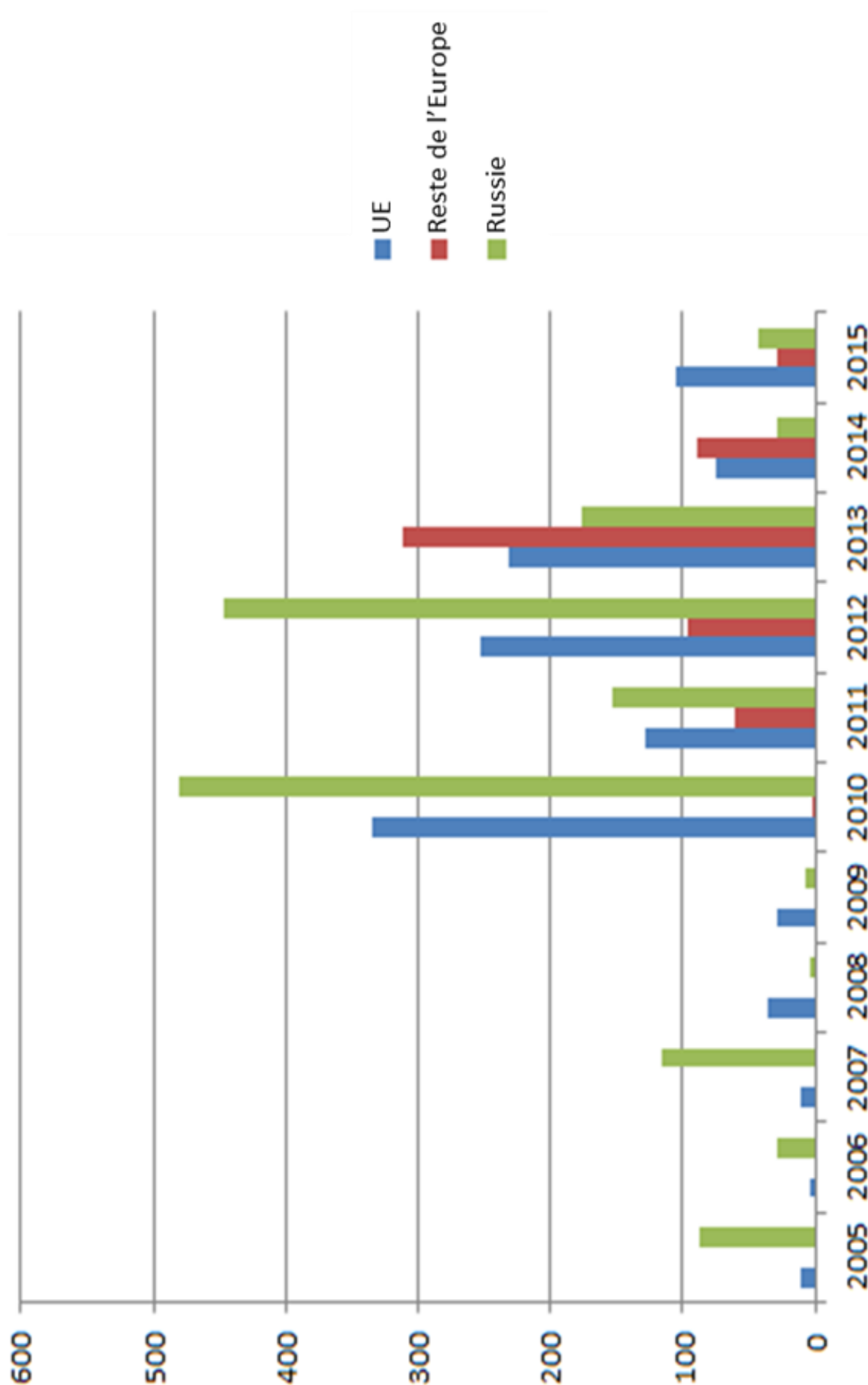


Figure 4 : Nombre de cas humains d'infection à VWN (formes neuroinvasives graves) déclarés par année en Europe et en Russie (Source : ECDC) (28)

b. Classification virale

Une grande diversité de souches est responsable des foyers répertoriés en Europe (les souches pathogènes appartiennent au lignage 1 et 2 et l'ensemble des souches répertoriées appartiennent à plus de 5 lignages génétiques différents), à l'opposé du territoire américain où une seule souche de lignage 1 a été importée (29) (figure 5).

Chaque année entre 2008 et 2014, de nouveaux territoires européens ont été trouvés infectés, en Italie, en Grèce et plus largement dans la région des Balkans. L'émergence de nouvelles souches virales pathogènes, de lignage 1 et de lignage 2, sur ces dernières années, semble indiquer une intensification des introductions de virus West Nile en Europe (28).

L'épidémiologie du virus West Nile en Europe a donc récemment évolué avec l'émergence de souches de lignage 2 (Hongrie, 2004 et Roumanie, 2010), associées à l'expansion des aires de distribution de ces virus, et l'endémisation de virus de lignage 1 en Europe occidentale (Italie, Espagne) (28). Longtemps considéré faiblement pathogène, le lignage 2 est depuis 2008 associé à un nombre croissant de cas neuroinvasifs équins et humains (Hongrie 2008, Grèce 2010, Russie 2010,...)(30-32).

c. La particule virale

Le VWN est un virus enveloppé avec une capside formée d'une seule protéine, la protéine C, contenant une molécule d'ARN de polarité positive (ARN(+)) d'environ 11kb (kilobase). L'enveloppe virale empruntée aux membranes internes de la cellule hôte (membranes du réticulum endoplasmique (RE)) comporte deux protéines structurales : une protéine d'enveloppe (E) et une protéine de membrane (M). Ci-dessous la représentation schématique de la structure des particules virales dont l'agencement confère une apparence lisse au virion mature (figure 6A), ainsi que des images de cryo-microscopie électronique révélant des particules virales de symétrie icosaédrique de 50 nm de diamètre, sans spicules à leur surface (figure 6B) (16).

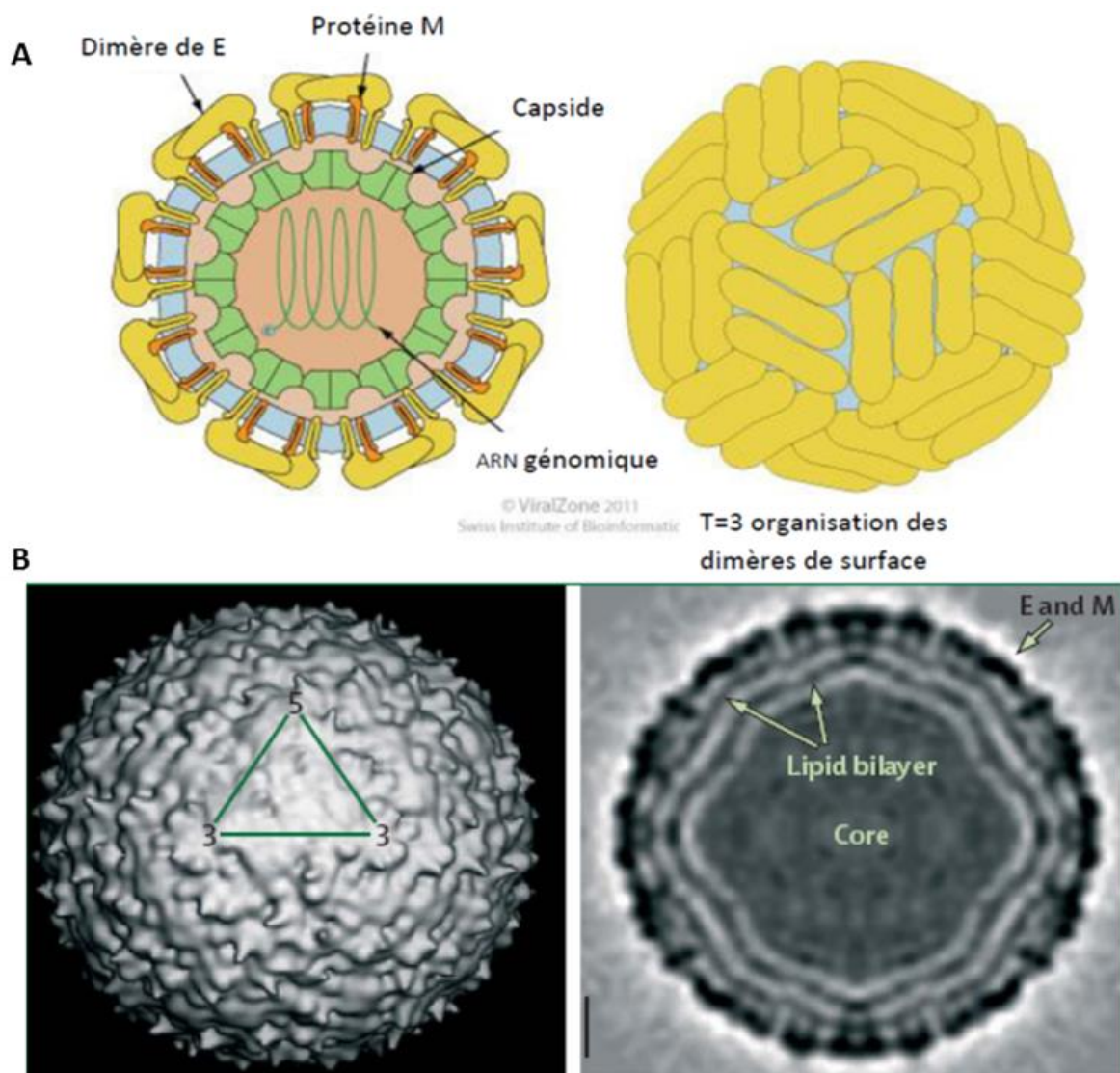


Figure 6: (A) Représentation schématique de la structure des particules virales (d'après <http://viralzone.expasy.org>). (B) Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile (d'après (16)).

A gauche, la représentation des protéines d'enveloppe et de membrane à la surface de la particule virale. Les protéines de capside forment une structure protégeant l'ARN viral. La structure du virion est reconstituée d'après les données de cryo-microscopie électronique. Le triangle à la surface de la structure indique une unité asymétrique d'icosaèdre. A droite, la représentation de l'organisation des dimères d'enveloppe à la surface du virion. La reconstruction de la section centrale montre des couches concentriques de densité de masse correspondant à l'enveloppe (16).
Lipid bilayer : bicouche lipidique ; Core : noyau ; E and M : E et M.

d. Le génome viral

Le génome du VWN est constitué d'un ARN simple brin de 11 kb coiffé à son extrémité 5' (7-méthylguanosine) et non polyadénylé en 3' (figure 7). Les régions non codantes (NC) 5' et 3' sont conservées. Elles forment des structures secondaires en épingle à cheveux qui interviennent dans la transcription mais aussi dans la traduction et l'empaquetage de l'ARN viral (33). Le génome est traduit en une polyprotéine de 3400 acides aminés environ. Celle-ci est clivée durant et après la traduction par des protéases cellulaires et virales en 10 protéines virales. Les trois protéines structurales que sont la protéine de capsid (C), la protéine de pré-membrane (prM) et de membrane (M), la protéine d'enveloppe (E) sont en partie N-terminale de la polyprotéine, la partie C-terminale de celle-ci code les sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Il existe une protéine non structurale NS1' qui est une forme plus longue de NS1, elle est souvent détectée lors d'infections par les membres du séro-groupe de l'encéphalite japonaise (18) (figure 7). L'encapsidation de l'ARN viral (par la protéine C), l'interaction et la fusion avec la cellule cible *via* les protéines de surfaces (M et E) (34) nécessitent les protéines structurales. Ces protéines de surfaces (M et E) sont aussi à l'origine de la stimulation de la réponse lymphocytaire B et T (35, 36). La protéine d'enveloppe est la plus immunogène et induit la majorité des anticorps neutralisants (36). Les protéines non structurales interviennent dans la réplication virale, l'assemblage des virions et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte (37-41).

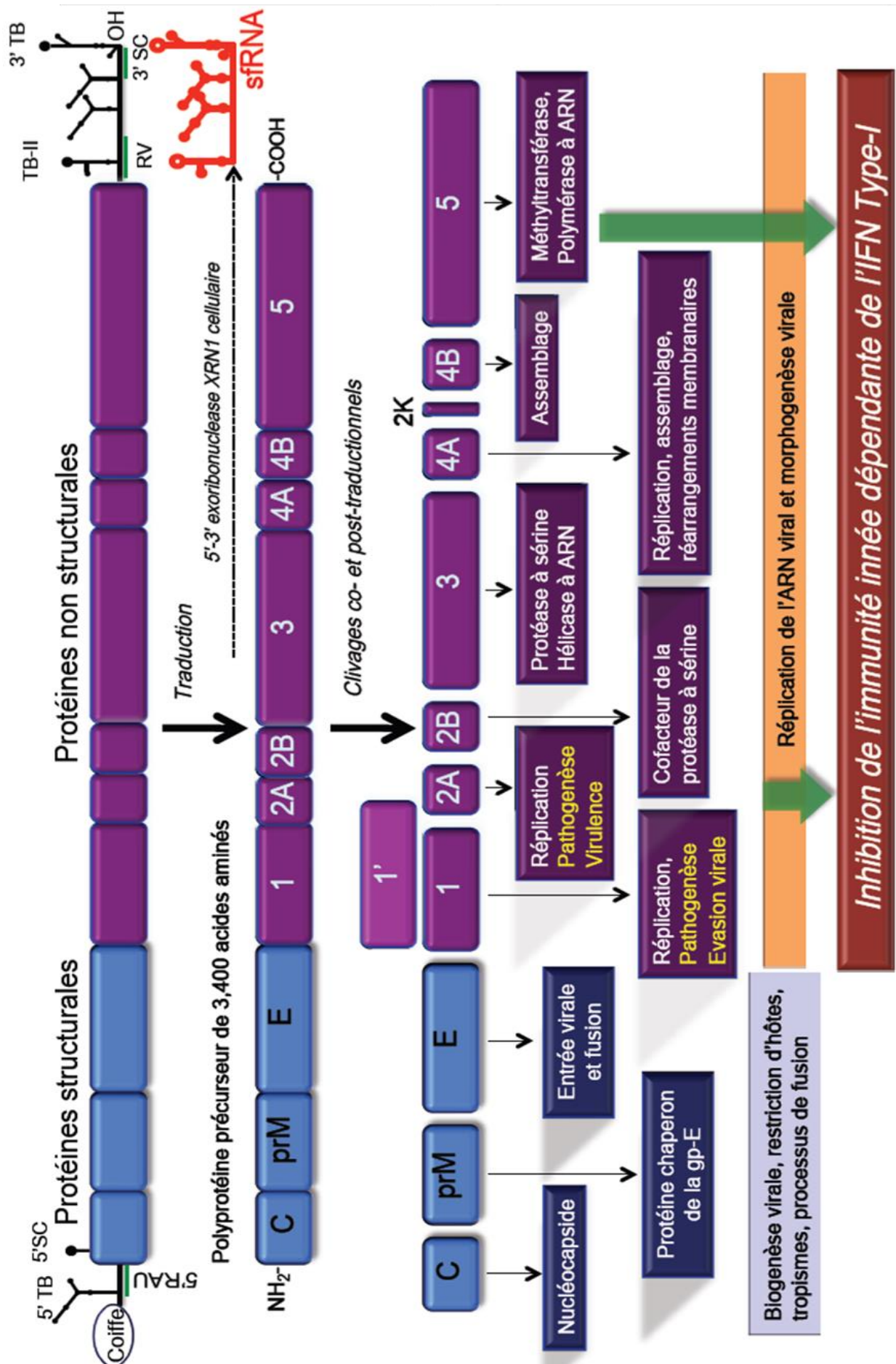


Figure 7: Représentation schématique de l'organisation du génome du VWN et de la traduction des protéines virales avec une indication de leur fonction (d'après Murray et al., 2010 (18)).

e. Les protéines structurales

i. La protéine de capsid

La protéine de capsid (C) fait 11 kDa (42). Les régions N- et C-terminales sont séparées par une région interne hydrophobe impliquée dans la structuration de la capsid (43). Ce domaine est clivé de la protéine de capsid mature par la sérine protéase virale (NS3) (44).

ii. La protéine de membrane

Le précurseur glycoprotéique de 26 kDa (prM) de la protéine de membrane (M) est adressé au réticulum endoplasmique (RE) via le domaine C-terminal hydrophobe de C. La région N-terminale contient 1 à 3 sites de glycosylation, et 6 résidus cystéine conservés qui forment tous des ponts disulfure (42). prM se replie et participe au repliement correct de E (45, 46). L'un des rôles majeur de prM est de permettre le réarrangement pH-dépendant de E lors de son transport dans la voie sécrétoire pendant la libération des nouvelles particules virales. La maturation des particules virales est liée au clivage de prM en pr et M par la furine du Golgi (47). Ce clivage entraîne la séparation des hétérodimères prM-E et la formation des homodimères de E (figure 8). Des mutations modifiant le nombre de résidus cystéine dans le fragment pr entraînent la formation de virions sensibles à la température possédant des prM intacts ce qui provoque une perte significative de virulence liée à un blocage de la maturation des virions (48).

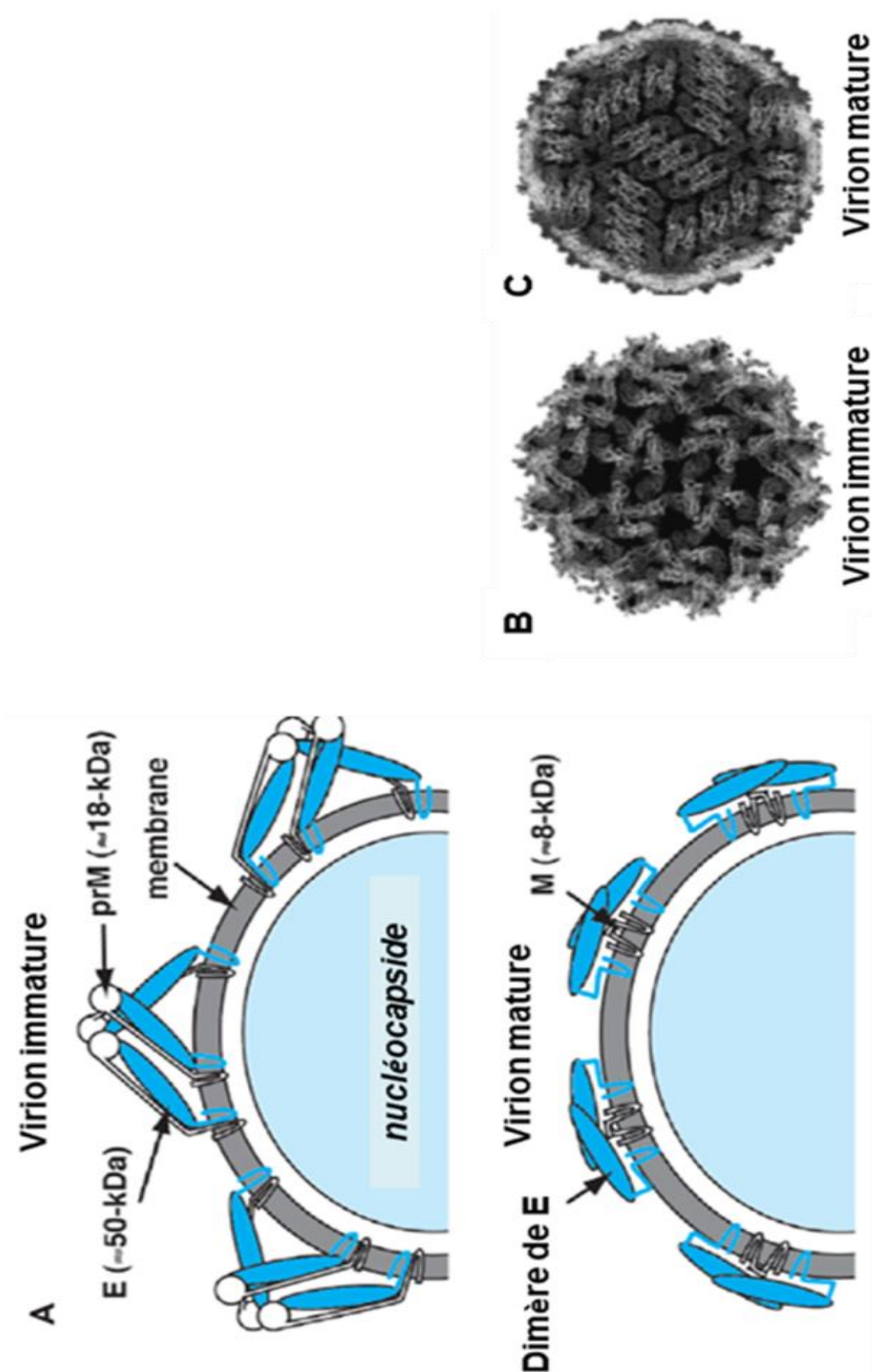


Figure 8: Maturation de la néo-particule virale (d'après Lindenbach *et al.*, 2007 (42)).

A : Dissociation de prM et E suite au clivage de prM en deux fragments, pr et M. Formation des homodimères de E.

B : Virion immature avant clivage de prM

C : Virion mature après clivage de prM

iii. La protéine d'enveloppe

Principale protéine à la surface du VWN, la protéine d'enveloppe (E) de 53 kDa joue un rôle dans la reconnaissance du récepteur chez les mammifères et la fusion à la membrane plasmique. E est constituée de domaines glycosylés (DI, DII, DIII) renfermant une boucle hydrophobe, et le peptide de fusion, qui permet l'entrée virale. Des récepteurs potentiels du VWN ont été identifiés tel que le TLR3 (49), DC-SIGN et DC-SIGNR (50-52). Des récepteurs distincts et agissant selon des modèles différents ont été impliqués dans l'infection des cellules de moustiques et des cellules de mammifères (53, 54). E est constitué de 12 résidus cystéines conservés. La protéine E a un haut degré de glycosylation et cela est un facteur déterminant dans la neuroinvasion du VWN (55). Dans sa conformation native E se replie en une structure allongée, et forme des homodimères disposés tête bêche (42). Les sous-unités de E se comportent alors comme suit : DI et DII se projettent le long de la surface du virion tandis que DIII maintient la conformation de l'ensemble (figure 9). Le domaine III est impliqué dans la liaison au récepteur et représente la cible principale des anticorps neutralisants (56).

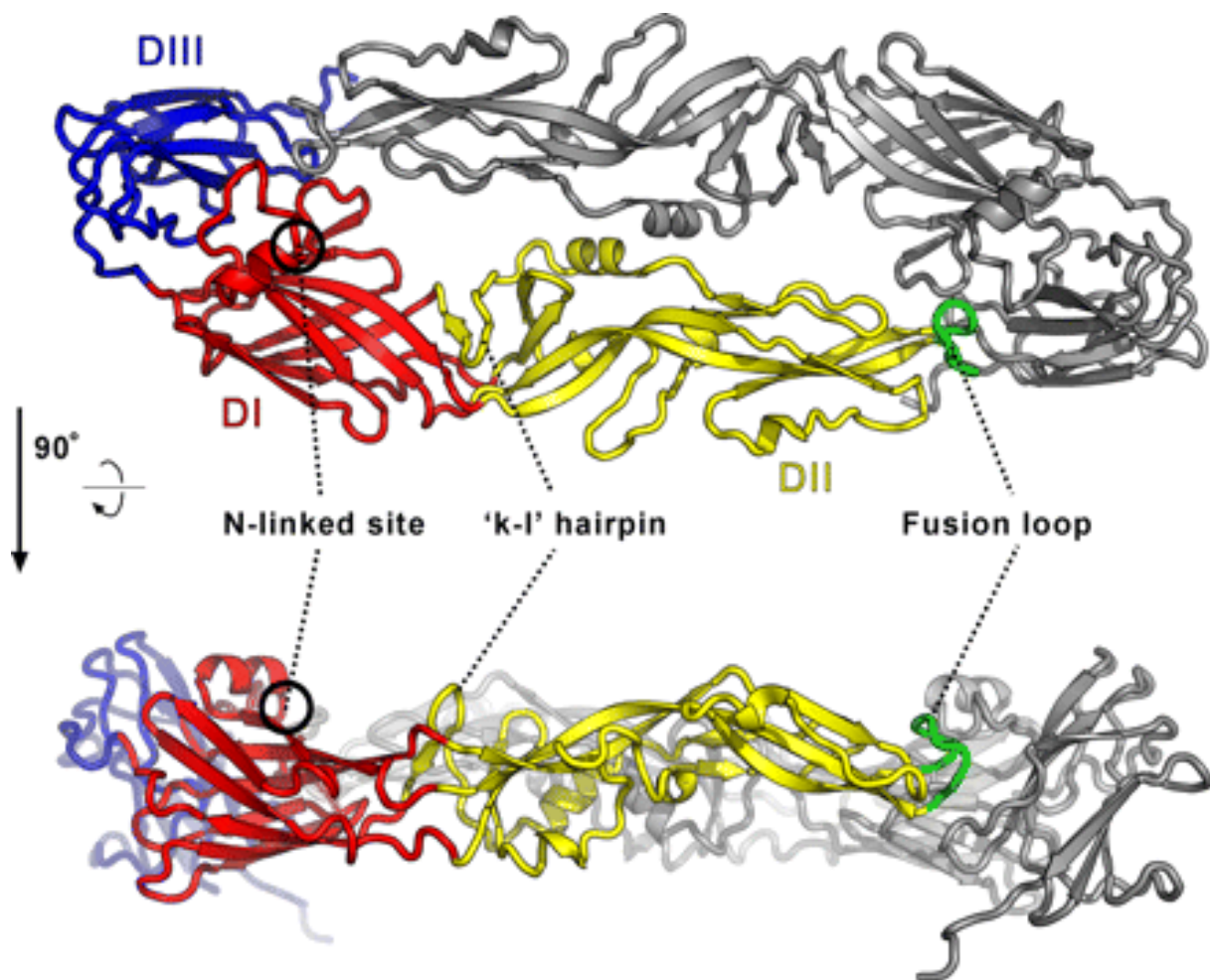


Figure 9: Représentation de la structure de la protéine d'enveloppe (forme homodimérique présente à la surface des particules virales matures) (57).

La figure montre une vue du dessus et de côté de la protéine. La protéine d'enveloppe possède trois domaines dont le domaine II contenant le peptide de fusion. Fusion loop : boucle de fusion, Hairpin : structure en épingle à cheveu

A pH acide (vésicule d'endocytose par exemple), les dimères se dissocient en monomères et s'organisent ensuite en trimères dans lesquels les peptides de fusion du domaine II sont entièrement exposés vers la membrane avec laquelle la particule virale doit fusionner (figure 10). La trimérisation s'opère par une rotation du domaine III et son repliement d'un se traduit par un déplacement de 30 Å par rapport au domaine I et par une rotation du domaine II par rapport au domaine I (42).

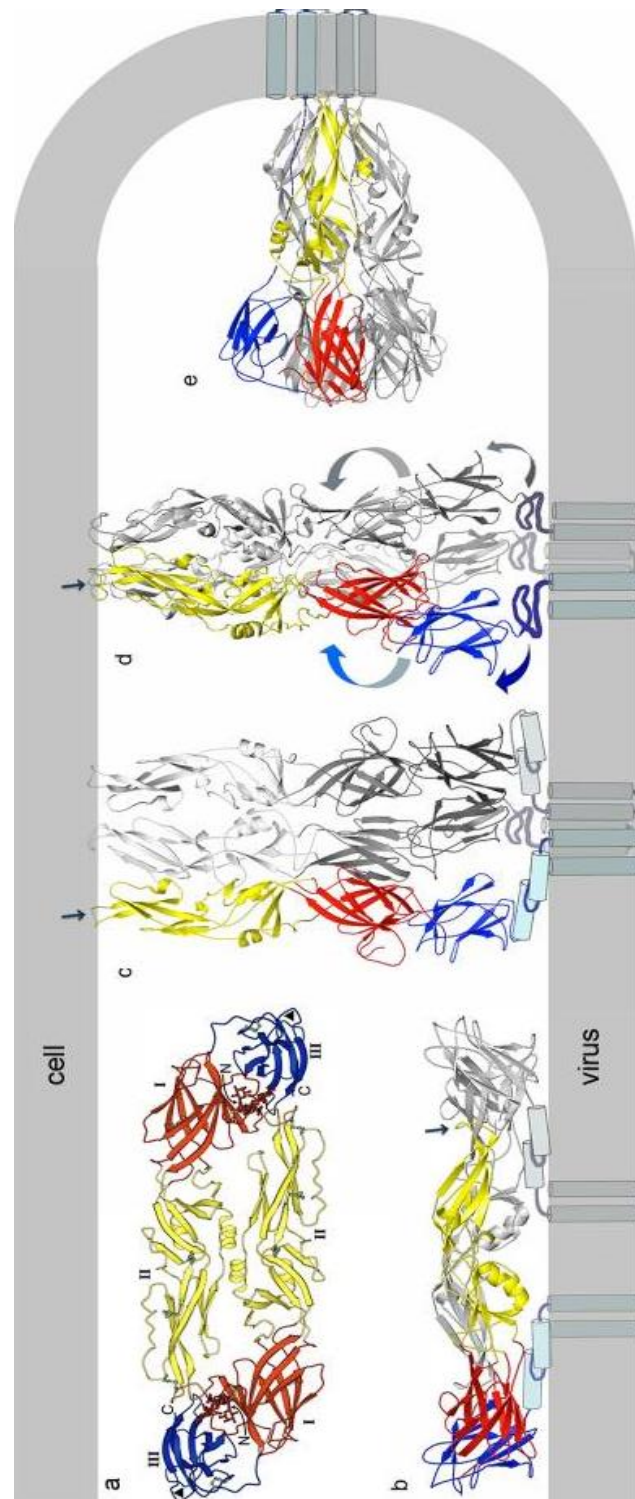


Figure 10: Représentation de la forme trimérique de E (d'après Harrison, 2008 (58)).

La protéine d'enveloppe est représentée lors de l'étape de fusion, lorsque les dimères se dissocient en monomères suite à l'exposition au pH acide de l'endosome et exposent leurs peptides de fusion (désigner par une flèche) vers la membrane plasmique de la cellule cible. Cell : cellule.

f. Les protéines non structurales

i. NS1

NS1 est une glycoprotéine de 46 kDa internalisée dans le RE, séparée de E par une signal-peptidase cellulaire au cours de sa synthèse et qui voit une fois dans le RE sa jonction NS1/NS2A clivée par une peptidase cellulaire non définie (59-61). NS1 est majoritairement séquestrée dans les cellules infectées mais elle peut aussi être localisée à la surface cellulaire ou être sécrétée des cellules de mammifère (62).

NS1 a été localisée dans les sites de réplication de l'ARN viral (63-65). Des études suggèrent son implication dans la réplication de l'ARN, et il a été observé que des mutations sur son site de glycosylation entraînaient des défauts dans la réplication de l'ARN viral (66). La fonction de la forme extracellulaire de NS1 n'est pas connue mais elle est particulièrement immunogène (56). De plus, NS1 est impliquée dans l'inhibition de la réponse innée antivirale :

-via l'inhibition du complément par un mécanisme de recrutement du facteur H qui est un régulateur de la voie alterne du complément dont la forte concentration empêche la formation de la C3 convertase et accélère sa dissociation, ce qui induit aussi une diminution de la réponse inflammatoire associée (67, 68).

-via l'inhibition de la transduction du signal induit par le TLR3. L'expression de NS1 inhibe aussi la production TLR3-dépendante de l'interleukine 6, et donc la mise en place d'un état antiviral (69).

ii. NS2A et NS2B

NS2A est une protéine hydrophobe de 22 kDa dont le clivage NS2A/NS2B est effectué après association de NS3 à NS2B. NS2A est impliquée dans l'assemblage des particules virales (38). Elle est localisée dans les sites de réplication et interagit avec NS3 et NS5, ainsi qu'avec la région 3' non codante (70).

NS2A pourrait assurer la coordination entre l'empaquetage de l'ARN et sa réplication (71). NS2A est aussi impliquée dans l'inhibition de la réponse interféron α/β (72, 73).

NS2B est une protéine de 14 kDa associée aux membranes internes (74). NS2B forme un complexe stable avec la partie sérine protéase de NS3 (75) et agit comme co-facteur de NS3.

iii. NS3

NS3, protéine de 70 kDa, prend part à la réplication et au clivage de la polyprotéine virale. NS3 possède une activité sérine protéase dans son domaine N-terminal et des activités ATPase et hélicase en C-terminal (figure 11) (18, 76). L'activité protéase permet le clivage entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4B/NS5 (42) et joue un rôle dans la maturation des régions C-terminales de la protéine de capsid (77, 78) et de NS4A (79). NS3 permet aussi de déphosphoryler la partie 5' de l'ARN avant l'ajout de la coiffe (80). NS3 en association avec NS5 (81) se lie aux structures en épingle de la région 3' non codante du génome et NS5 augmente l'activité NTPase de NS3 (82). NS3 semble avoir un rôle dans l'effet cytopathique après infection par le VWN, par induction de la mort par apoptose (83)

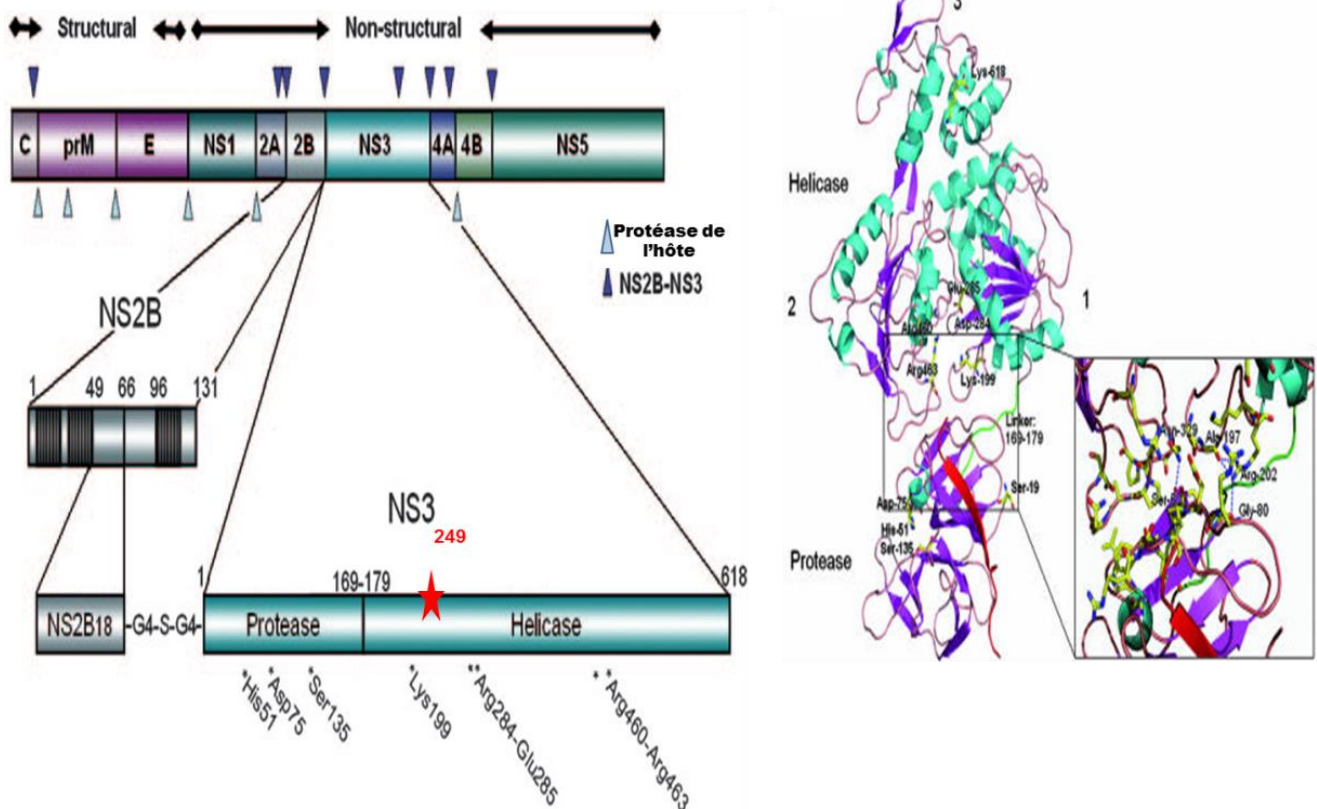


Figure 11 : Représentation schématique du cadre de lecture de NS3, ainsi que de la structure tridimensionnelle de la protéine (84).

NS3 possède une activité sérine protéase dans son domaine N-terminal et des activités ATPase et hélicase en C-terminal, l'activité de cette dernière pouvant être modifiée par une mutation du résidu en position 249 qui influencera la virulence du virus (85).

iv. NS4A, 2K et NS4B

NS4A et NS4B sont des protéines hydrophobes de respectivement 16 et 27 kDa, séparées par le peptide 2K. NS4A a été localisée dans les complexes de réplication (70). 2K est composé d'acides aminés hydrophobes. Il sert de séquence signal pour la translocation de NS4B dans la

lumière du réticulum endoplasmique (79). 2K joue par ailleurs un rôle dans la synthèse de l'ARN viral (86).

Des études ont montré que les clivages NS4A/2K/NS4B étaient nécessaires pour l'induction des réarrangements des membranes internes par NS4A (87). NS4B appartient au complexe de réplication virale (88). NS4B est co-localisée avec NS3 et l'ARN génomique dans des structures membranaires dérivées du RE, lieu de la réplication virale (89). Une mutation dans la partie C-terminale de NS4B réduit la vitesse de réplication et la quantité d'ARN synthétisé, ce qui suggère que cette région de NS4B est importante pour la réplication virale (90). NS4B est également impliquée dans l'échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte vertébré en inhibant la voie interféron α/β (91, 92).

v. NS5

NS5 est une protéine de 103 kDa, très conservée. NS5 est l'ARN-polymérase-ARN-dépendante, nécessaire pour la réplication de l'ARN viral au sein de complexes faisant intervenir des protéines d'origine à la fois virale et cellulaire (18). NS5 participe également à la suppression de la réponse innée de l'hôte en empêchant l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 (pY-STAT1) et en inhibant l'expression des gènes sous contrôle des interférons de type I (93).

g. Les régions non codantes

i. La région 5' non codante

La région 5' non codante (5' NC) possède une coiffe m⁷GpppA reconnue par la protéine cytoplasmique eIF4B (facteur eucaryotique d'initiation de la traduction) et par le facteur eIF4F du complexe d'initiation (94, 95). Ce complexe recrute la petite sous-unité ribosomale pour la traduction de la polyprotéine virale.

ii. La région 3' non codante

La région 3' non codante (3' NC) possède une structure en épingle à cheveux très conservée qui sert de promoteur à la synthèse du brin ARN(-) (96), ainsi qu'une séquence de cyclisation. Cette séquence induit l'interaction entre les parties 5' et 3' NC du génome viral, ce qui est nécessaire pour la réplication (97-100). C'est l'action de la protéine PABP (poly(A) binding protein) qui interagit avec la région 3'NC et eIF4F (101) qui permet la réussite de la cyclisation, le génome du VWN n'étant pas polyadénylé (cf. II.d).

La structure en épingle à cheveux se lie à de nombreuses protéines cellulaires, permettant d'initier la synthèse du brin d'ARN(-) (96, 98, 102-104).

III. Le cycle viral

a. Entrée virale

L'entrée virale débute par l'endocytose du VWN suite à l'interaction de l'enveloppe virale avec les récepteurs. L'abaissement du pH dans l'endosome entraîne la fusion entre l'enveloppe et la membrane endosomale libérant ainsi la capsid dans le cytoplasme (figure 12).

L'exposition à un pH acide entraîne un changement de conformation de la protéine E, notamment sa trimérisation et un réarrangement de sa surface exposant le peptide de fusion vers la membrane cible (II, protéine structurale, protéine d'enveloppe ; figure 10) (51, 105). Ce peptide s'insère alors dans les membranes cellulaires et se replie en épingle à cheveux permettant de rapprocher les deux membranes, ce qui entraîne la formation d'un pore permettant le passage de la capsid.

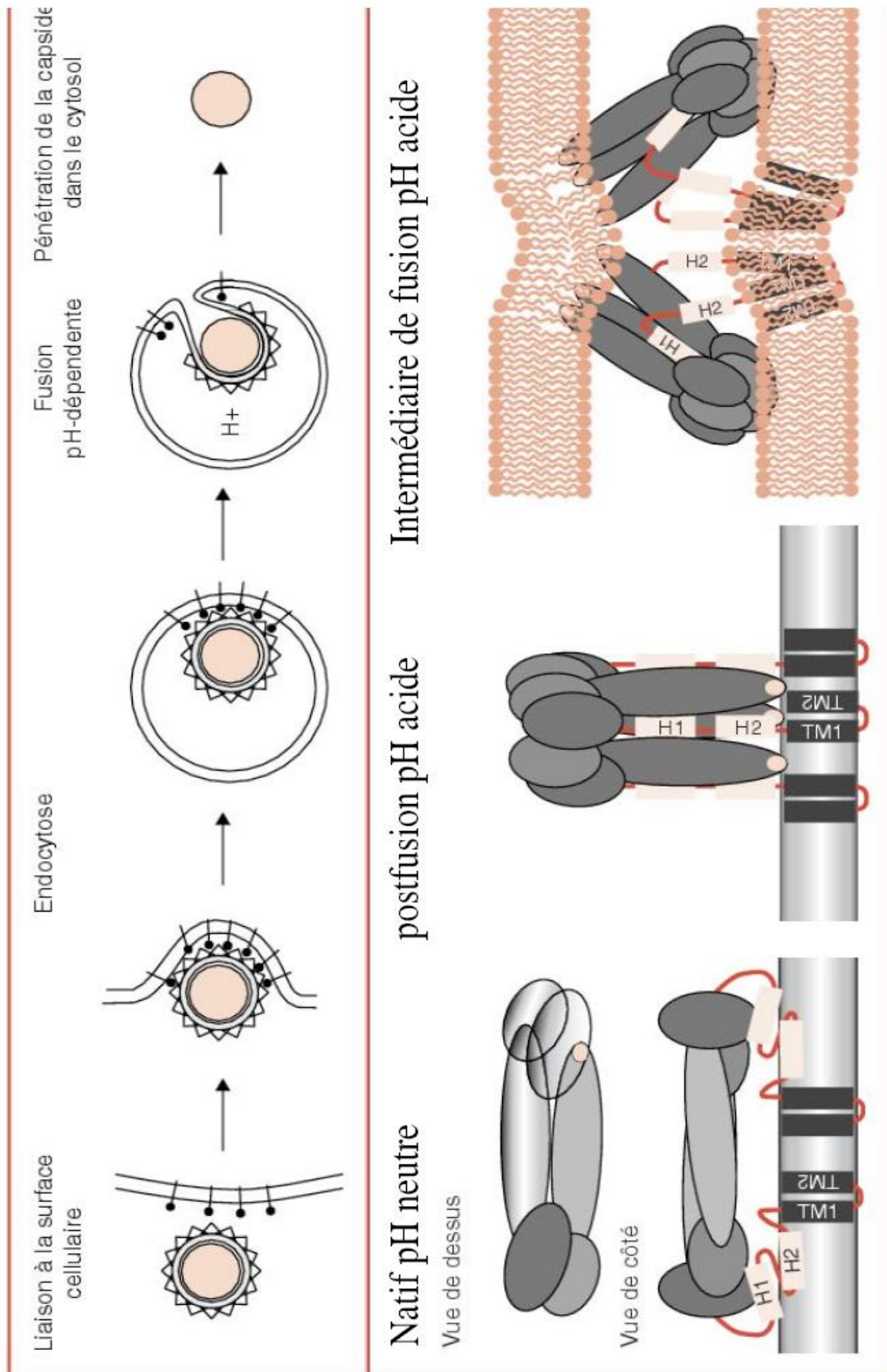


Figure 12: Mécanisme de fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire par endocytose (d'après Cosset, 2010 (106)).

La protéine d'enveloppe se lie à son récepteur à la surface de la cellule cible, la particule virale est ensuite endocytée. Lors de l'acidification de l'endosome, la protéine E change de conformation, exposant ainsi le peptide de fusion. La capside est alors libérée dans le cytoplasme.

b. Cycle cytoplasmique : Libération de l'ARN génomique et traduction de la polyprotéine

L'ARN(+) génomique est coiffé en 5' mais ne possède pas de queue polyA en 3'. La région 3' NC possède une structure en épingle à cheveux très conservée. L'ARN(+) peut être directement traduit en protéine par la machinerie cellulaire comme les ARN messagers cellulaires. Les clivages protéiques sont co-translationnels et se font grâce à des protéases virales et cellulaires (figure 13). Les protéines d'enveloppe doivent être glycosylées. Pour cela, elles doivent transiter dans le RE et le Golgi. En cours de synthèse, des signaux d'adressage envoient les régions prM, E et NS1 de la polyprotéine dans le RE (figure 13). Les séquences signal sont ensuite clivées par des signalases cellulaires. Les protéines prM et E restent ancrées dans la membrane, la protéine NS1 est libérée dans la lumière du RE et sera excrétée. La protéine prM est clivée plus tard dans le trans-Golgi par les furines du Golgi (42).

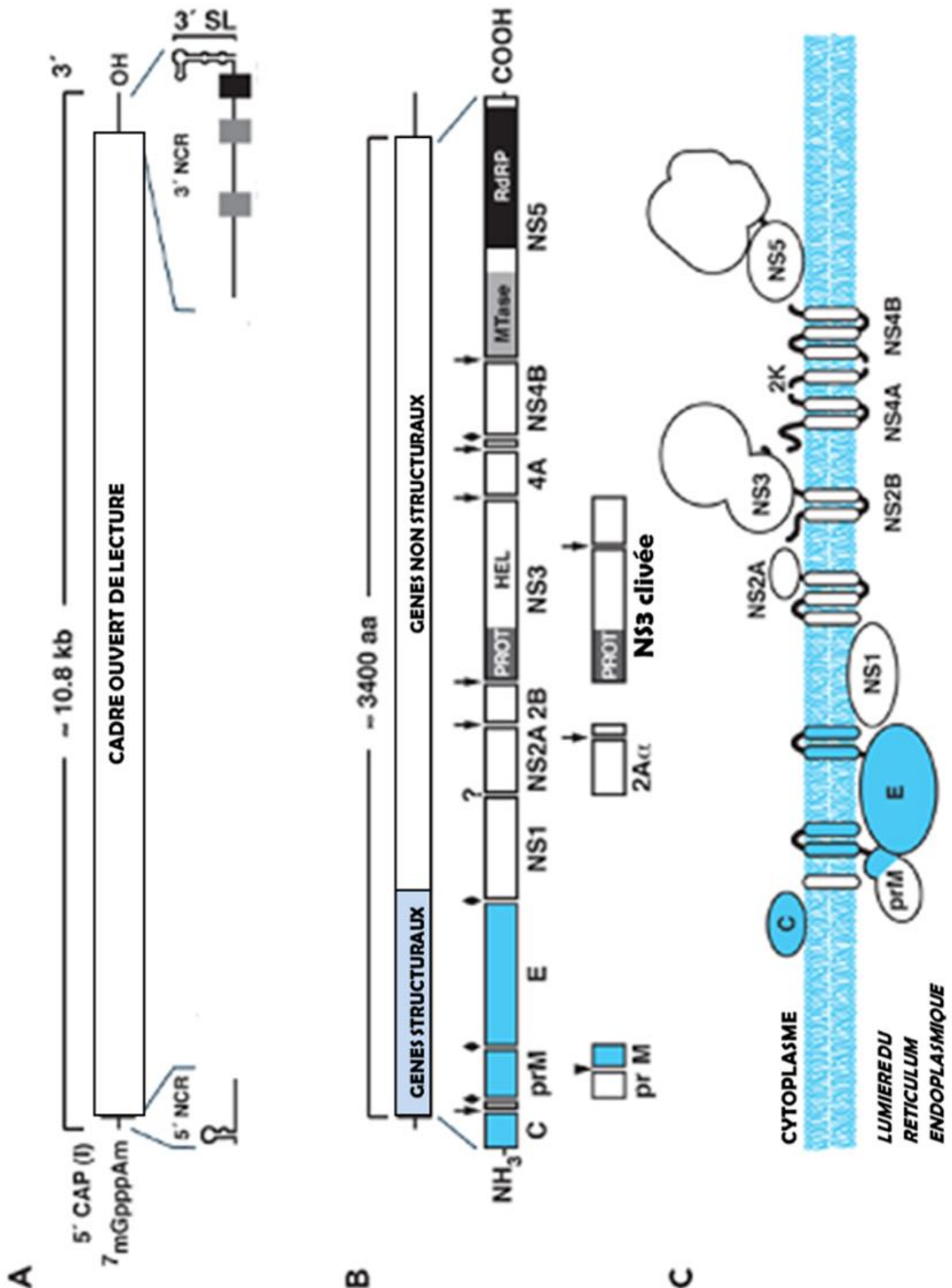


Figure 13 : Structure du génome viral et expression de la polyprotéine (d'après Lindenbach *et al.*, 2007 (42))
A : structure du génome (protéines structurales et non structurales) et des éléments ARN (coiffe, régions 5' et 3' NC).
B : Traitement de la polyprotéine par les protéases cellulaires ♦, virale (↓), furines (▼) ou inconnues (?).
C : topologie des produits de clivage de la polyprotéine. NCR (Non Coding Region) : région non codante, 3'SL (Stem Loop) : structure secondaire en épingle à cheveux.

i. Réplication

La réplication s'effectue dans le cytoplasme, en étroite liaison avec le RE au sein des complexes de réplication virale (RC) constitués de NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (figure 14).

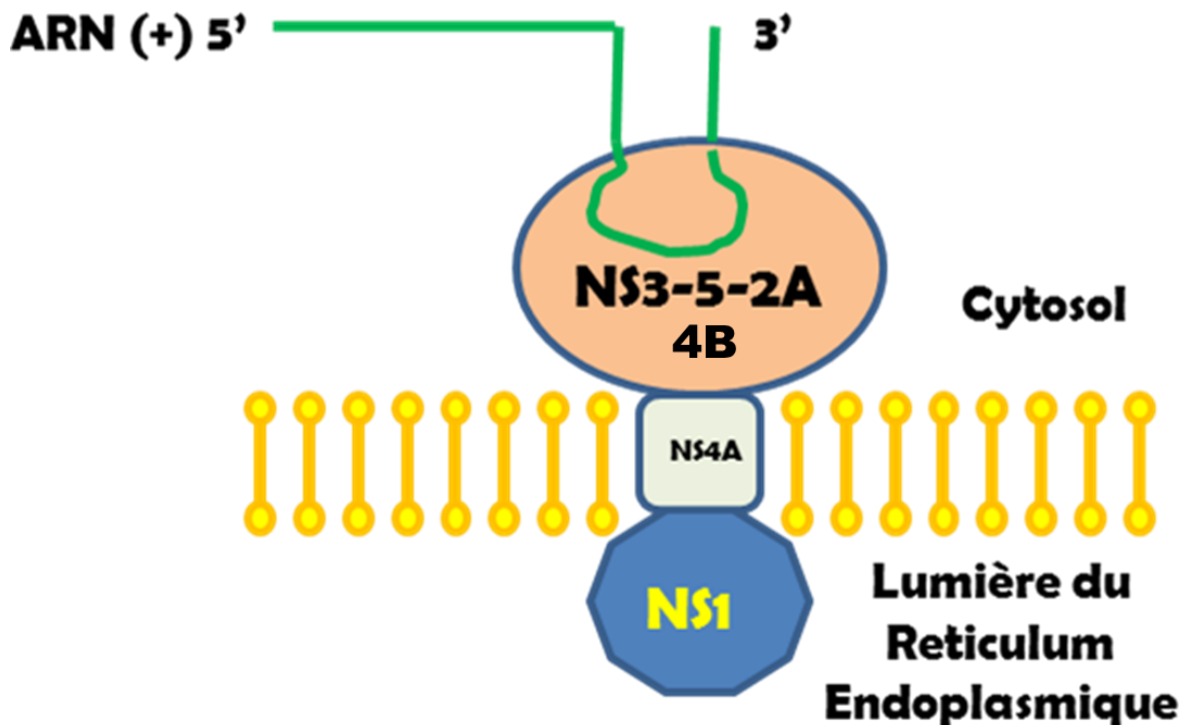
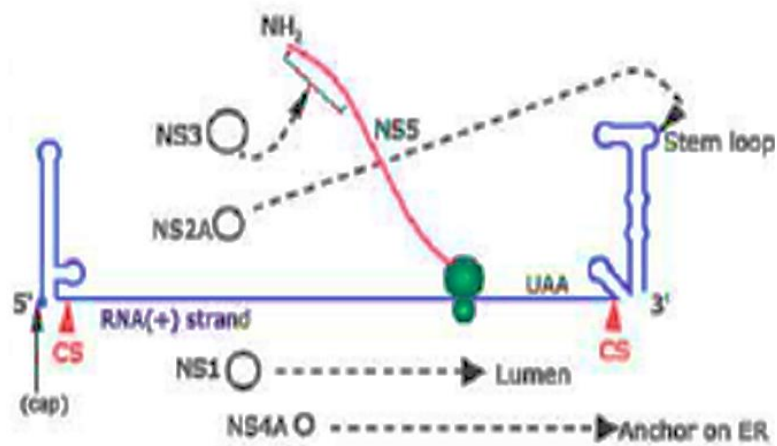


Figure 14: Le complexe de réplication virale (RC) constitué de NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B et NS5.

La réplication débute par la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative (ARN-) qui sert de base pour la synthèse d'un ARN génomique positif sous un mode semi-conservatif et asymétrique. La réplication est couplée à la traduction et à l'assemblage (figure 15). Le complexe de réplication s'assemble avec les protéines néo traduites. La réplication est couplée à l'encapsidation.

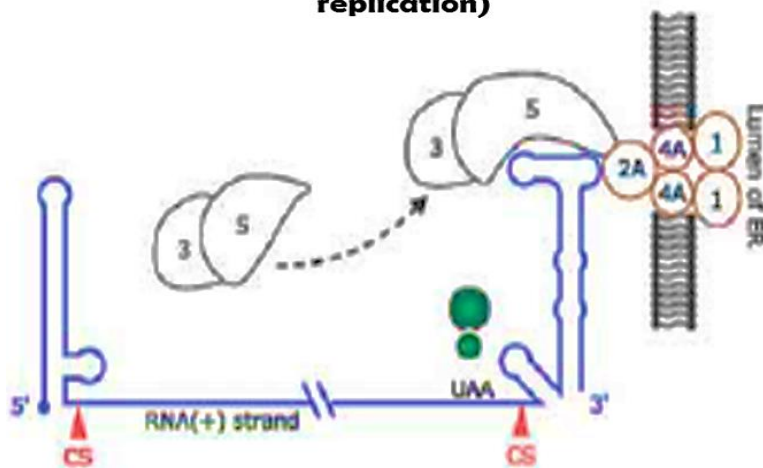
1

Traduction de l'ARN(+)



2

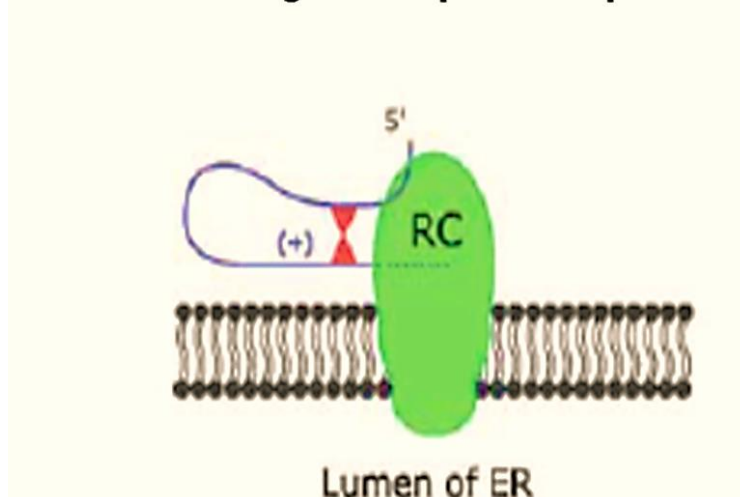
Traduction de NS5 terminée (17 min) et début de l'assemblage du RC (complexe de réplication)



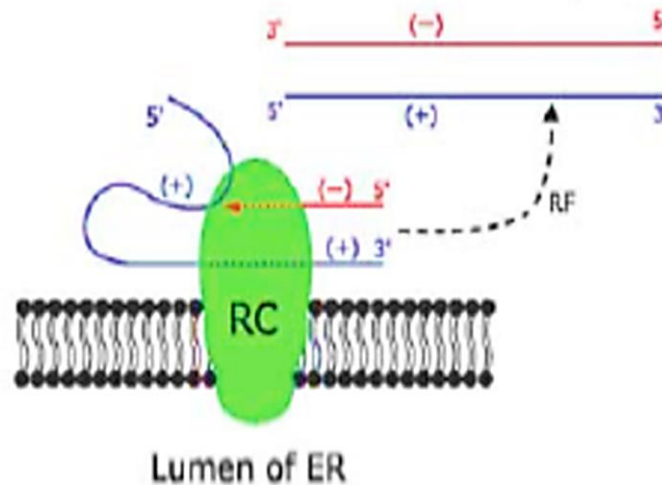
(1) Stem loop : structure secondaire en épingle à cheveux ;
 RNA (+) strand : brin d'ARN (+) ; Lumen : lumière
 Anchor on ER : ancrage sur le RE ; Lumen of ER : lumière du RE

3

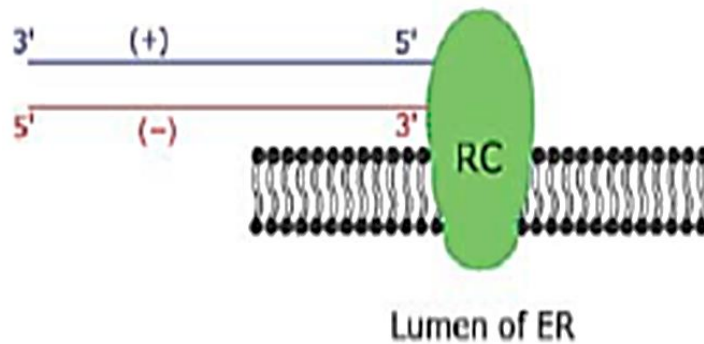
Circularisation du brin d'ARN (+) et fin de l'assemblage du complexe de réplication



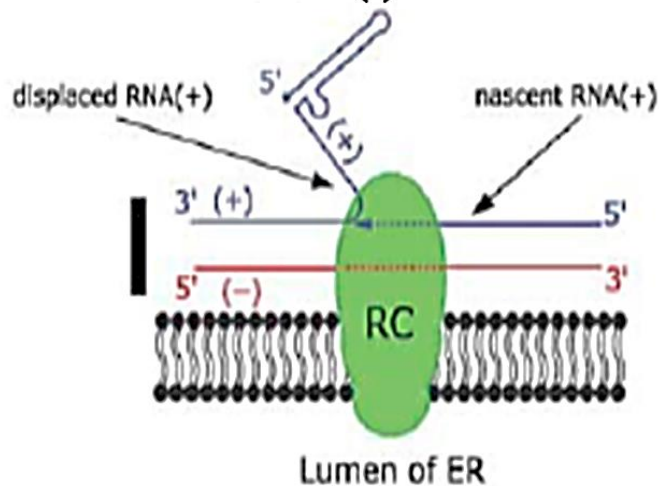
4 Le complexe de réplication transcrit l'ARN(+) en ARN(-) aboutissant à la forme répliquative (FR)



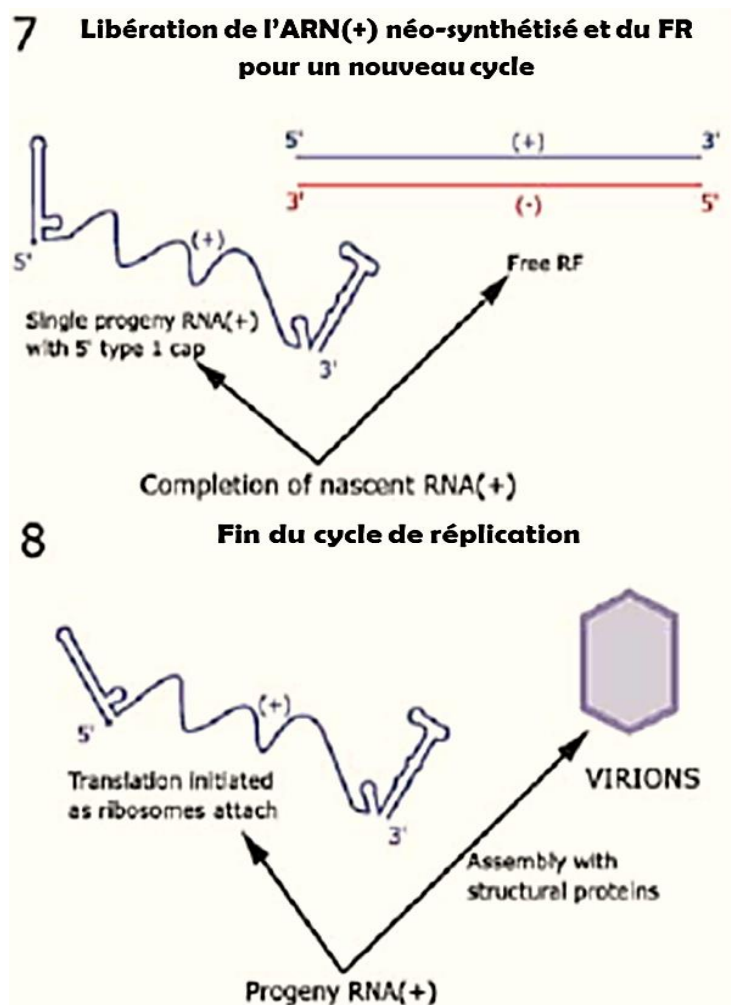
5 Le FR se réattache au complexe de réplication pour l'initiation de la synthèse de l'intermédiaire de réplication (IR)



6 Réplication semi-conservative asymétrique de l'ARN (+)



(6) displaced RNA(+) : ARN (+) déplacé
nascent RNA (+) : ARN (+) naissant
FR : Forme répliquative



(7) Single progeny RNA(+) with 5'type 1 cap : copie unique d'ARN (+) coiffé

Completion of nascent RNA (+) : maturation de l'ARN (+)

FR : Forme répllicative

Free RF : FR libre

(8) Translation Initiated as ribosomes attach : initiation de la traduction lorsque les ribosomes s'attachent

Progeny RNA (+) : ARN(+) néo-synthétisé

Assembly with structural proteins : Assemblage avec les protéines structurales

Figure 15: Couplage de la traduction, de la réplication et de l'assemblage des particules virales (d'après Westaway et al., 2003 (107))

La traduction de l'ARN (+) est suivie par la formation des complexes de réplication où l'ARN(+) est transcrit en ARN (-). Le brin d'ARN (-) sert de matrice pour la néo-synthèse de brins d'ARN (+). L'ARN (+) néoformé va alors être traduit et de nouvelles particules virales vont pouvoir se former.

ii. L'assemblage des particules virales

L'assemblage des particules virales consiste en l'association de l'ARN avec les protéines de capsid. L'acquisition de l'enveloppe s'opère lors du bourgeonnement au niveau du RE.

La protéine prM maintient la conformation de E pour éviter l'exposition du peptide de fusion. Post-bourgeonnement, il y a formation de particules virales immatures présentant un aspect hérissé correspondant aux hétérodimères prM-E présents dans l'enveloppe virale. Le clivage de prM en M se déroule dans l'appareil de Golgi permettant la maturation de la particule virale (voir II,e,ii) (108).

iii. Résumé

Le VWN se lie à sa cellule cible via le domaine de liaison au récepteur de la protéine d'enveloppe (figure 16). La particule virale est endocytée. Le pH acide de l'endosome provoque un changement de conformation de la protéine d'enveloppe, qui permet l'exposition du peptide de fusion. Ensuite la capside est libérée dans le cytoplasme, qui va libérer l'ARN viral qu'elle contient. L'ARN de polarité positive (ARN+) est immédiatement traduit. Les protéines virales issues de la traduction s'assemblent pour former un complexe de réplication. Les ARN néo-synthétisés sont encapsidés et les néo-virions transportés via la voie d'exocytose. De nouveaux virions sont libérés.

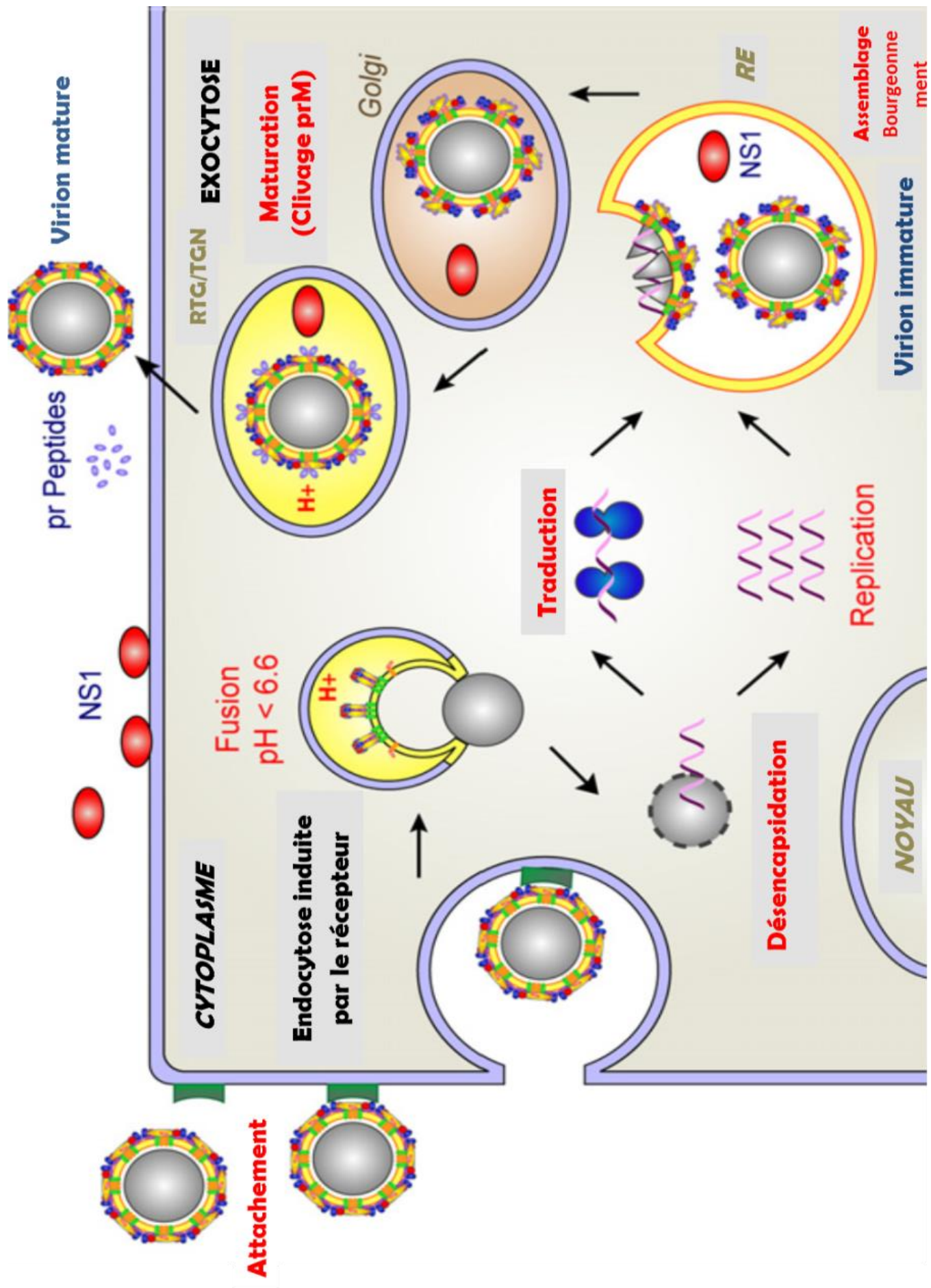


Figure 16: Représentation schématique du cycle de multiplication virale du VWN (d'après Heinz et Stiasny, 2011 (109)).

IV. Cycle de transmission du virus

Des études réalisées en Egypte ont permis de préciser le cycle de transmission du VWN (33, 110) au cours des années 50, identifiant le rôle des oiseaux comme hôtes réservoirs, et celui de certains moustiques comme vecteurs (figure 16). Ces études ont permis à l'époque de définir des zones de circulation endémique du virus et des zones de transition où le virus ne s'installe pas, ce qui comme précédemment évoqué n'est plus tout à fait le cas aujourd'hui.

Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin (figure 16). Après passage de la barrière intestinale, le virus se réplique localement puis atteint les glandes salivaires pour ensuite être transmis lors d'un repas sanguin ultérieur. La dissémination est directement liée aux conditions climatiques (température, hygrométrie...), qui sont déterminantes pour l'activité des vecteurs et la transmission du virus. De nombreuses espèces de moustiques, de genres différents (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*...) ont été trouvées porteuses du VWN (111).

Des études expérimentales ont permis d'identifier certaines espèces impliquées dans le cycle de transmission du virus (112) tel que les *Culex pipiens* et *Culex modestus*. Présents dans les zones urbaines ou dans les zones humides, ils semblent particulièrement impliqués dans la transmission du virus en Europe.

L'intensité de la virémie varie selon les espèces d'oiseaux mais sa durée reste assez courte (de l'ordre de quelques jours), certaines développent une virémie généralement suffisante pour infecter la plupart des moustiques alors que d'autres développent une virémie faible (113, 114).

La virulence d'un isolat nord-américain a été évaluée sur 25 espèces aviaires américaines. Les passériformes (passereaux), et particulièrement les corvidés ont été identifiés comme très sensibles à l'infection, avec de forts taux de mortalité et ont permis une amplification efficace du virus : le corbeau américain (AMCR, pour AMERICAN CRow) et le geai bleu (*Cyanocitta cristata*), ont présenté une forte virémie comprise entre 8 et 10 log₁₀ PFU/mL (Plaque Forming Unit/mL) (114). Des infections expérimentales réalisées sur de jeunes oies avec un isolat nord-américain ont permis d'observer des taux de mortalité similaires à ceux observés dans la nature avec des virémies suffisantes pour infecter les moustiques (115). Aux Etats-Unis, de nombreuses espèces d'oiseaux ont été sévèrement touchées par l'épidémie/épizootie à VWN, et les effectifs de ces espèces ont diminué après 1999 (111, 116). Paradoxalement la baisse d'une population aviaire peut tendre à augmenter la transmission du VWN au lieu de la diminuer.

Différents types de rapaces (117) ont été plus récemment trouvés comme sensibles à l'infection à VWN en Europe (118-120). Des infections expérimentales sur des espèces aviaires européennes, ont permis de montrer que la perdrix rouge (*Alectoris rufa*) de l'ordre des galliformes est susceptible à une infection par des souches de lignage 1a identifiées à l'Ouest du

bassin méditerranéen (souches Maroc 2003 (Ma03) et Espagne 2007 (SP07)) (121). Le moineau domestique (*Passer domesticus*) est un bon réservoir pour des souches européennes de lignage 1 et 2 isolées en 2007-2009 (122, 123). Le pigeon (*Columbia livia*) et la corneille (*Corvus corone*) sont des hôtes réservoirs pour les souches de lignage 1 du VWN, avec une sensibilité à l'infection virale plus marquée pour la corneille (au minimum, 33% de létalité observée avec une souche de lignage 1 peu virulente, France 2000) (124-126). De plus, un modèle expérimental d'infection aviaire a été développé chez le poulet de 1 jour (*Gallus gallus domesticus*)(124).

Espèce oiseau	Souche	Lignage	Voie d'administration	Dose	Mortalité	Virémie
Oie d'Emden (<i>Anser anser domesticus</i>)	WN 9/99 (NY)	1	Sous cutané	10 ^{3,3} TCID ₅₀	75%	10 ⁴⁻⁶ TCID ₅₀
Oie d'Emden (<i>Anser anser domesticus</i>)	Hun03	1	Infection naturelle	NA	NA	NA
Épervier d'Europe (<i>Accipiter nisus</i>)	Hun04 and Hun05	2	Infection naturelle	NA	NA	NA
Autour des palombes (<i>Accipiter gentilis</i>)	Hun04 and Hun05	2	Infection naturelle	NA	NA	NA
Aigle ibérique (<i>Aquila adalberti</i>)	Sp07	1	Infection naturelle	NA	NA	NA
Perdrix rouge (<i>Alectoris rufa</i>)	Mar03 / Sp07	1	Sous cutané	10 ⁴ PFU	70% / 30%	10 ^{7.2} PFU/mL / 10 ^{6.9} PFU/mL
Moineau domestique (<i>Passer domesticus</i>)	It08 / It09 / Sp07 / NY99	1	Sous cutané	10 ⁴ PFU	15% - 25%	10 ⁵ PFU/mL à 10 ⁹ PFU/mL
Moineau domestique (<i>Passer domesticus</i>)	Aut08 / NY99	2 / 1	Sous cutané	10 ⁴ PFU	0%	10 ^{6,72} / 10 ^{9,62}
Pigeon biset (<i>Columba livia</i>)	It09/11/12	1	Sous cutané	10 ⁶ TCID ₅₀	0%	10 ^{1,99} - 10 ^{5,39} TCID ₅₀ /mL
Corneille noire (<i>Corvus corone</i>)	Is98 / Fr2000	1	Sous cutané	10 ^{3,5} TCID ₅₀	100% / 33%	10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Faucon gerfaut (<i>Falco rusticolus</i>)	NY99/ Aut08	1 / 2	Sous cutané	(LD) 500 TCID ₅₀ , (MD) 10 ⁴ TCID ₅₀ , (HD) 10 ⁶ TCID ₅₀	NY99:HD 100% NY99:MD,LD 0% Aut08:LD100% Aut08:MD50% Aut08:HD0%	10 ^{2,5} - 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL

Tableau 1 : Tableau non exhaustif des travaux effectués sur des oiseaux présents en Europe et infectés par le virus West Nile (115, 117-119, 121-123, 125-127). NA = non applicable

Les oiseaux migrateurs sont considérés comme de bons agents disséminateurs du VWN car ils peuvent migrer sur de grandes distances (128). Ce sont sans doute les oiseaux qui sont à

l'origine de l'introduction du VWN à partir de l'Afrique sub-saharienne vers l'Europe et la région méditerranéenne (129-131). Depuis la découverte du virus en 1937, aucune mortalité aviaire naturelle n'avait été rapportée (132), jusqu'aux foyers de la fin des années 1990 en Israël et aux Etats-Unis (115, 133, 134). En 1998, le VWN est isolé à partir d'une cigogne moribonde trouvée en Israël (135). Des mortalités élevées chez les jeunes oiseaux de 3 à 8 semaines étaient observées dans des populations de cigognes et d'oies (136).

Des cas de transmission directe par voie alimentaire (prédation de petits oiseaux ou rongeurs infectés par le VWN) ou par contacts directs entre oiseaux ont été décrits (137). Une transmission directe pourrait jouer un rôle épidémiologique non négligeable dans le contexte nord-américain (infection de corbeaux) ou en Hongrie (infection de rapaces par des virus de lignage 2) (138). L'apparition de cas chez l'homme et le cheval est liée à une circulation importante du virus dans l'avifaune, via des vecteurs ornithophiles, et à la présence de moustiques vecteurs, à la fois ornithophiles et mammophiles, capables de s'infecter à partir d'oiseaux virémiques et de piquer ultérieurement un hôte sensible (figure 17) (18). De très nombreuses espèces animales peuvent être infectées dont des reptiles, des amphibiens, des mammifères....

Le VWN provoque des signes cliniques essentiellement chez l'homme et le cheval. Les signes cliniques objectivés consistent en des atteintes pseudo-grippales avec fièvre, céphalées, douleurs musculaires et articulaires. Il y a aussi plus rarement, des atteintes neuroméningées, pouvant être mortelles, associées ou non à une encéphalite. Des cas de paralysies flasques aiguës semblables à celles rencontrées dans la poliomyélite ou des cas évoquant un syndrome de Guillain-Barré, ont été rapportés aux Etats-Unis chez l'homme (139). Contrairement aux oiseaux, ces espèces ne développent généralement pas une virémie suffisante pour permettre la transmission du virus à des vecteurs compétents, lors d'un repas sanguin.

Chez le cheval, le niveau de virémie est au maximum de 10^3 particules virales/mL (140). Pour infecter un moustique *Culex*, il faut une dose minimale d'environ 10^5 PFU/mL (114). L'homme et le cheval sont ainsi considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques (141) (figure 17). Par contre, d'autres mammifères ainsi que des reptiles peuvent contribuer à la persistance du virus dans un environnement donné par la virémie soutenue qu'ils développent (142).

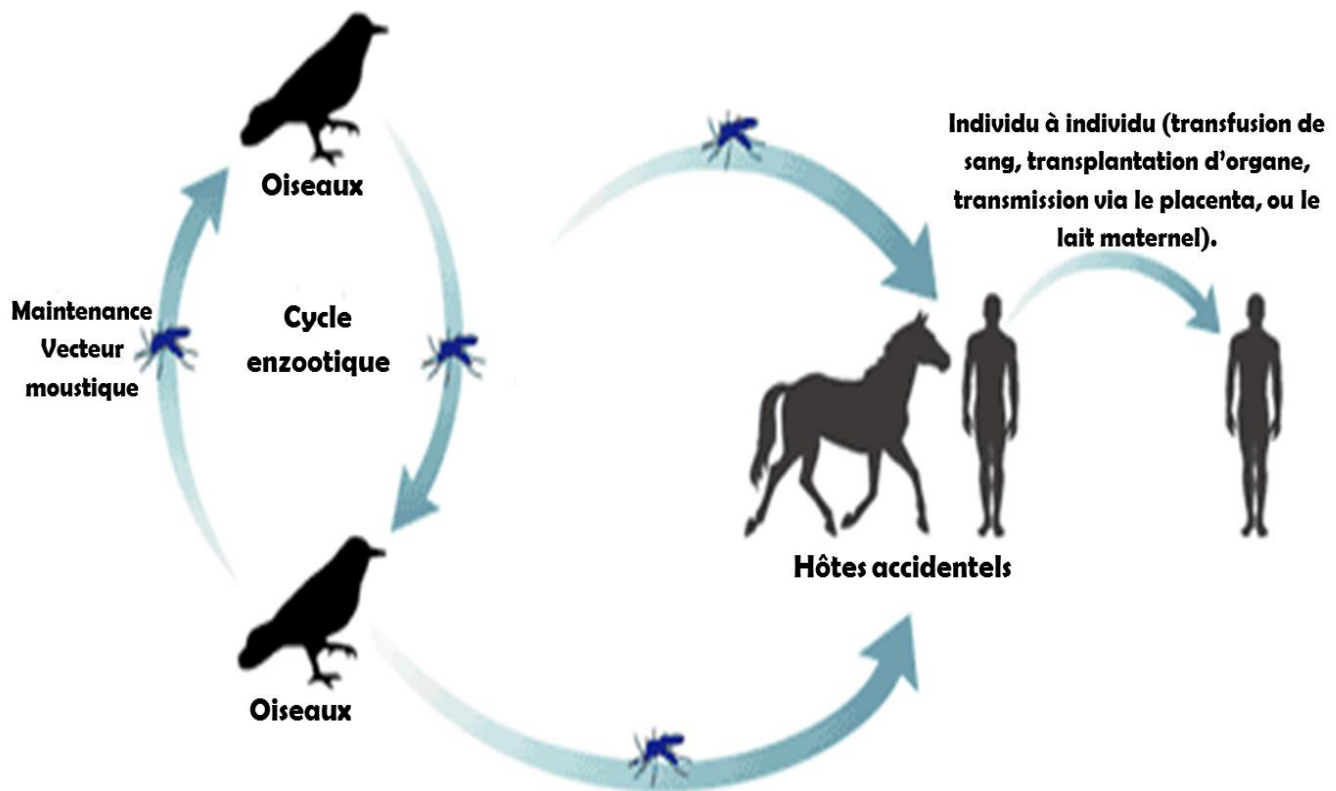


Figure 17: Cycle de transmission du virus West Nile (d'après Huhn et al., 2003 (143)).

Les oiseaux sont les hôtes réservoirs du virus. Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin. La présence de moustiques vecteurs, à la fois ornithophiles et mammophiles, est responsable de la transmission du virus à des mammifères sensibles dont l'homme et le cheval. Ces hôtes ne développent pas une virémie suffisante pour permettre la transmission du virus à des vecteurs compétents, lors d'un repas sanguin et sont des culs de sac épidémiologiques. En revanche, des cas de transmission directe suite à une transfusion sanguine, des greffes d'organes, par voie transplacentaire ou par le lait maternel ont été rapportés.

Les mécanismes de la persistance du virus lors de la période d'inactivité des vecteurs restent peu investigués. La transmission transovarienne du virus à la descendance est décrite pour certains flavivirus, comme ceux de la dengue ou de la fièvre jaune, chez des vecteurs du genre *Aedes*. Elle existe pour certaines espèces de *Culex* avec des taux bien moindres, et les moustiques *Culex* sont considérés comme des vecteurs peu efficaces en terme de transmission verticale pour le VWN (144). Malgré tout le phénomène de persistance hivernale du VWN chez les moustiques est décrit dans les conditions naturelles (145). L'hiver rigoureux dans les zones infectées américaines en 1999 n'a pas enrayé l'épidémie, le virus a persisté et a gagné peu à peu l'ensemble du territoire en 3-4 ans. Durant l'hiver 1999-2000, des vecteurs adultes en hibernation ont été trouvés infectés. Le rôle des tiques dans la persistance du virus a aussi été évoqué, la transmission ayant été démontrée expérimentalement chez certaines espèces de tiques (146). Des études ont montré que des phénomènes de persistance de l'infection virale chez les arthropodes seraient liés à des mécanismes d'ARN interférence mis en place chez le vecteur et modulés par les flavivirus (147-149). Alors que la virémie chez les oiseaux s'avère être relativement courte (de l'ordre d'une semaine), le virus West Nile a pourtant été isolé sur des

rapaces en hiver. Ce qui laisserait supposer un état latent du virus associé possiblement à des phénomènes de réactivation (150).

Le développement de modèles animaux d'infection par le VWN a permis de mieux comprendre la pathogénie du VWN *in vivo*. L'apparition des modèles murins avec leurs qualités propres (coût, entretien, reproduction et fond génétique connu et plus aisé à manipuler) a permis d'explorer plusieurs hypothèses biologiques *in vivo* et d'obtenir des modèles pertinents d'infection au VWN. Nous savons ainsi comme décrit plus haut que les espèces aviaires n'ont pas toute la même sensibilité au VWN et que la réponse immunitaire est cruciale dans le contrôle de la pathogénèse virale. Par exemple certains auteurs comme Diamond *et al.*, (2003) (151, 152), ont montré que la réponse humorale est importante dans le contrôle des premières phases de l'infection virale ainsi que pour assurer la survie à l'infection chez l'hôte mammifère. D'autres équipes (153) ont corroboré ces résultats en montrant que la réponse humorale anti-VWN est de longue durée et protectrice chez le moineau domestique (*Passer domesticus*), espèce résistante à l'infection à VWN ou encore certains ont montré l'importance de l'âge dans la sensibilité à l'infection, liée à l'immaturité du système immunitaire à l'éclosion du poussin. Ainsi, la très faible réponse immunitaire observée chez le poulet de moins de 2 semaines est due à l'immaturité de la réponse lymphocytaire T (154) ce qui en fait un modèle pertinent pour les essais d'infections, et Dridi *et al.*, 2013 (124) ont montré qu'il était possible d'utiliser ce modèle de façon plus fine pour étudier la virulence dans l'avifaune des différentes souches de VWN en évaluant les paramètres cliniques et virologiques de l'infection sur des poussins de un jour.

Ces modèles dans leur ensemble ont ainsi permis de mieux comprendre les mécanismes d'infection.

V. Pathogénie chez les hôtes vertébrés

L'infection débute par une piqûre de moustique. Suite à l'injection du virus au niveau de la peau, celui-ci circule dans le sang. De là, deux schémas sont possibles:

- **Une multiplication périphérique, à l'origine d'une phase virémique courte pouvant aboutir à l'infection du système nerveux central.**

Des cellules des tissus cutanés tels que les cellules de Langerhans ou des cellules dendritiques pourraient être le point de départ de la réplication du VWN après l'inoculation par le moustique. Dans l'épiderme, les cellules de Langerhans infectées deviennent des cellules fonctionnelles présentatrices d'antigène (CPA) (155). Elles migrent aux nœuds lymphatiques dans les 24 à 48h post-inoculation, induisant l'expression de cytokines antivirales, de chémokines, l'activation du complément, l'expansion leucocytaire, la préparation de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes T (156). Cette migration des CPA infectées entraîne une virémie et l'infection des tissus périphériques.

Ce scénario a pu être validé grâce à des modèles rongeurs. A six jours post-infection, le virus n'est plus décelé dans le sérum ni les organes périphériques, et peut entrer dans le SNC, provoquant des troubles neurologiques (157).

- **Le virus arrive au SNC via les motoneurones.**

Le VWN est transporté à la fois de façon antérograde et rétrograde dans des neurones en culture (158).

En laboratoire il a été montré qu'en infectant directement le nerf sciatique de hamsters *in vivo* le VWN infecte plus particulièrement les motoneurones plutôt que les neurones sensoriels (158). L'infection des motoneurones de la moelle épinière chez le hamster entraîne des faiblesses musculaires et des paralysies flasques (158).

Chez l'Homme, des données cliniques obtenues sur des patients atteints de paralysie ont permis de montrer la présence de lésions dans la corne antérieure de la moelle épinière (16). A ce jour, aucune démonstration n'a été faite de l'entrée du VWN dans le cerveau par cette voie.

VI. La génétique inverse

La biologie moléculaire permet de modifier le génome du VWN pour étudier le rôle des différentes protéines virales. Cela repose sur l'utilisation de « clones infectieux » ou « outils de génétique inverse » qui sont des outils facilitant l'appréhension des différentes fonctions des protéines et structures génomiques du VWN. Ceci permet de créer des clones dans lesquels sont insérés des mutations, des délétions ou encore des chimères entre différentes souches pour étudier l'intérêt fonctionnel de certaines mutations (tableau 2).

Mutation/Chimère	Gène	Clone Infectieux	Conclusion	Modèle	Auteur
Mutations/délétions multiples	Région 3' non codante, sur les boucles	B956	Altération de l'interaction de la région 3'NC avec les protéines cellulaires TIA-1 et TIAR, affectant la réplication de l'ARN viral	Culture cellulaire	Emara et al., 2008 (159)
Délétions	C, délétion de fragments plus ou moins longs dans sa région hydrophobe	NY99	Région hydrophobe indispensable à l'assemblage des virions	Culture cellulaire	Schlick et al., 2009 (160)
Mutation	E _{N154S}	NY99	Perte de la glycosylation. Altération de la neuroinvasion	Souris	Beasley et al., 2005 (55)
Mutations	E	NY99	Rôle de certains résidus (notamment Y329) dans la formation d'une boucle nécessaire pour la viabilité du virus et le repliement du domaine III, et donc influence sur l'antigénicité de E. Importance des résidus G331 et D333 dans l'infectivité du virus	Culture cellulaire et souris	Zhang et al., 2010 (161)
Mutation	NS2A _{A30P}	Kunjin	Induit une augmentation de la réponse IFN Atténuation de la neuro-invasion et de la neuro-virulence	Cellules BHK Souris	Liu et al., 2006 (73)
Mutations	NS2A _{R175K} et NS3 _{T518H}	Kunjin	Identification d'acides aminés clés dans le rôle de NS2A dans l'assemblage des particules virales et de NS3 dans la réplication de l'ARN	Culture cellulaire	Liu et al., 2003 (38)
Mutation	NS3 _{T249P}	NY99 et Kenya (KN-3829)	Atténuation de la virulence du virus NY99 et augmentation de la virulence du virus KN-3829	AMCR (Corbeaux Américains)	Brault et al., 2007 (85)
Mutation	NS5 _{S653F}	Kunjin	Antagonisme de la voie de signalisation JAK/STAT de l'interféron	Culture cellulaire	Laurent-Rolle et al., 2010 (93)
Mutations	Régions 5' et 3' non codante, nucléotides impliqués dans la cyclisation	B956	Diminution de l'efficacité de la réplication	Culture cellulaire	Basu et Brinton, 2011 (162)
Chimères	prM et E	Echanges de gènes NY99/ souches Mexico (TM171-03-ppp1)	Augmentation de la virulence de la souche mexicaine	AMCR, moineaux et roselin du Mexique	Langevin et al., 2011 (163)

Tableau 2: Tableau non exhaustif de travaux effectués sur des clones infectieux du virus West Nile.

Projet

La virulence des souches européennes du VWN, qu'elles proviennent des foyers récents ou plus anciens, est encore mal caractérisée (164). Des différences de virulence dans les souches circulantes du VWN ont été suggérées et pourraient expliquer des situations épidémiologiques et cliniques contrastées entre l'Europe et le continent nord-américain. Des travaux récents semblent indiquer que des souches européennes de lignage 1 du VWN seraient moins pathogènes pour l'hôte aviaire (124, 125) mais aussi virulentes que la souche nord-américaine chez un hôte mammifère modèle, la souris (165, 166). Malgré les schémas épidémiologiques bien décrits du VWN en Amérique du Nord, la base de l'émergence de la pathologie aviaire associée est encore imparfaitement caractérisée. Il a été montré précédemment que la présence d'une substitution d'acide aminé T249P (Thréonine en position 249 remplacée par une Proline) dans l'hélicase NS3, identifiée chez les isolats nord-américains (lignage 1), augmenterait la virulence chez l'oiseau (85). Cette mutation a également été observée dans les souches récemment apparues en Europe aussi bien de lignage 1 que 2, en particulier en Europe de l'Est, mais aussi en Italie (lignage 1) en 2008 (167) et en Grèce (lignage 2) en 2010 (31). De plus, des analyses comparatives de séquences de génomes complets de VWN ont démontré que le même site (NS3-249) était sujet à une évolution adaptative (168). Ces résultats phénotypiques et évolutifs fournissent des preuves convaincantes de la sélection positive d'une mutation codant pour un potentiel de virémie et de virulence accrue chez certaines espèces d'oiseaux. Cependant, différentes études remettent en question le rôle central de la mutation NS3 249 (169)

De nombreuses études se sont attachées à la compréhension de la pathogénicité du VWN et de ses mécanismes/déterminants en utilisant des clones infectieux de souches africaines, B956 (170), australiennes, Kunjin (38, 171) et surtout de la souche new-yorkaise, NY99 (55, 160, 172-175), mais peu à partir de souches européennes ou méditerranéennes. A ce jour, seuls les clones infectieux de la souche israélienne hautement virulente de lignage 1, IS-98-ST1 (176) et d'une souche (578/10) d'Europe centrale de lignage 2 (177) sont documentés.

L'objectif de mon travail était de caractériser les déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile. Pour atteindre cet objectif, je me suis appuyé sur le travail antérieur du laboratoire, à savoir la production d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 (appelée Is98) (176). Cette souche est une souche hautement pathogène du virus West Nile ayant circulé dans le bassin méditerranéen en Israël en 1998 et ayant provoqué 35 cas chez l'homme et 18 chez le cheval en 1998, 417 cas chez l'homme et 76 chez

le cheval en 2000. Nous avons aussi utilisé la souche Italie 2008 (souche 229892, GENBANK : FJ483549). La souche Italie 2008 (It08) est réputée peu pathogène. Cette souche a été isolée lors d'une épidémie de faible envergure ayant eu lieu en Italie en 2008 et ayant provoqué 11 cas humains et 78 cas équins (121, 178). Des différences de virulence ont été observées lors d'infections expérimentales sur le poulet de 1 jour (124). Sur ce modèle la souche Is98 s'est révélée significativement plus létale que la souche It08. Les souches Is98 et It08 sont représentatives des différents sous-groupes de lignage 1 présents en Europe (179) et sont donc de bons modèles pour étudier les différences en terme de virulence du VWN. Qui plus est ces deux souches présentent elles aussi la mutation NS3 249 P et ont une homologie de séquence nucléotidique de 96% et protéique de 99,7%. Après un travail de comparaison des séquences nucléotidiques, onze mutations non synonymes ont ainsi été identifiées entre Is98 et It08.

Afin de pouvoir étudier et modifier à façon les propriétés biologiques d'un virus, des approches de génétique inverse peuvent être utilisées. Pour des virus à ARN simple brin de polarité positive, j'ai donc utilisé un clone infectieux contenant l'intégralité du génome viral d'une souche hautement pathogène du VWN au sein d'une construction plasmidique et permettant la synthèse d'ARN viraux et la production *in vitro* de virus infectieux de séquence connue.

Mon projet de diplôme EPHE consista en un travail de biologie moléculaire, faisant appel à la construction de virus chimères (par échange de fragments génomiques entre les souches Is98 et It08 du VWN) et d'un mutant (NS3 249 P→T) à partir du clone infectieux Is98 disponible au laboratoire et en la caractérisation de leurs propriétés biologiques dans des lignées cellulaires *in vitro* et dans des modèles *in vivo* (souris, modèle mammifère permettant l'évaluation de la virulence du virus West Nile, et oiseaux : poussin de 1 jour en partenariat avec le CERVA CODA, Belgique). Il a été décidé de choisir deux modèles différents pour mimer le comportement de nos virus à la fois chez leur hôte réservoir (modèle aviaire sensible) et chez un hôte mammifère sensible. Les deux présentant des différences comme explicité dans l'introduction. Les interactions avec l'hôte vertébré uniquement ont été investiguées ici.

Le clone infectieux Is98 a été modifié afin d'intégrer la mutation NS3-P249T (85) ou d'échanger les fragments génomiques provenant de la souche Italie08 (It08) comportant des mutations non synonymes entre Is98 et It08. En fonction des sites de restriction uniques disponibles pour les constructions, quatre chimères ont été envisagées au début de mon travail.

Pour rappel l'infection à virus West Nile chez le cheval est un danger sanitaire de catégorie 1 (de par son caractère zoonotique et la sévérité de l'infection chez le cheval et l'homme) et doit faire l'objet d'une déclaration auprès de la DDPP concernée ainsi qu'une manipulation en P3.

Matériels et Méthodes

Afin de pouvoir étudier et modifier à façon les propriétés biologiques d'un virus, on peut utiliser une construction clone infectieux contenant l'ensemble du génome viral et permettant la synthèse d'ARN viraux et la production *in vitro* de virus infectieux de séquence connue. Des virus chimères (par échange de fragments génomiques entre différentes souches du VWN) ou de mutants à partir du clone infectieux Is98 ont été obtenus au sein du laboratoire (176).

La caractérisation de leurs propriétés biologiques a été réalisée dans des lignées cellulaires *in vitro* et *in vivo* (modèle mammifère et modèle aviaire). L'étude *in vivo* a pour finalité d'appréhender plus finement les déterminants moléculaires de la virulence des souches européennes du VWN et d'améliorer la pertinence et la rapidité de caractérisation de ces déterminants de virulence. L'objectif à long terme est de pouvoir déterminer rapidement le potentiel épidémique d'une souche de VWN émergent sur la base de sa caractérisation génétique et évaluer l'impact de nouveaux changements génomiques identifiés sur sa virulence et son potentiel endémique ou épidémique.

I. Construction du mutant NS3 P249T

Nous avons utilisé le clone infectieux dérivant d'une souche sauvage de VWN (IS-98-STD1, Genbank accession no: AF481864) développé par Bahuon *et al.*, 2012 (176). Le clone infectieux de type sauvage est caractérisé par un génotype NS3-249Pro et est donc appelé par la suite "WT Pro". Un mutant NS3-249Thr a été généré en remplaçant le codon CCC (nucléotides 5357-5359) par un codon ACC sur le clone infectieux de type sauvage en utilisant le kit de mutagenèse dirigée par site QuickChange® (Stratagene®, La Jolla, Ca). Le clone infectieux mutant est caractérisé par un génotype NS3-249Thr et est donc appelé ici "mutant Thr". Un site de restriction Sac II a également été généré (par insertion d'une mutation silencieuse) afin d'identifier facilement les virions Thr mutants après RT-PCR en utilisant les amorces ci-dessous, suivis d'une digestion enzymatique SacII sur les amplicons:

- 5053F 5'-GGGCTTTATGGCAATGGAGTCA-3'
- 5396R 5'-TGGGTGAGGGTAGCATGACA-3'.

Les virus recombinants ont été recueillis et titrés comme décrit dans Bahuon *et al.*, 2012 (176) après une période d'incubation de 3 jours pour WT Pro et 5 jours pour les virus Thr mutants.

II. Constructions pour la production de chimères Is98/It08

J'ai construit des chimères entre la souche IS-98-ST1 (GenBank : AF481864) et la souche It08 ; Italie 2008, 229892 (15803) (GenBank : FJ483549) : les chimères des régions du génome les plus variables entre les deux souches mentionnées, à savoir l'enveloppe (E), NS2A, NS4A-NS4B et NS5 ont été générées (figure 18). Toutes les constructions virales mentionnées dans ce rapport ont fait l'objet d'un dépôt de dossier auprès du HCB (dossier d'agrément n°251, avec autorisation de manipulation des productions virales en laboratoire confiné de classe 3 obtenue en date du 11 mai 2015).

Seule une partie des chimères a pu être obtenue à temps et a été caractérisée comme présenté ultérieurement (chimères 3 et 4).

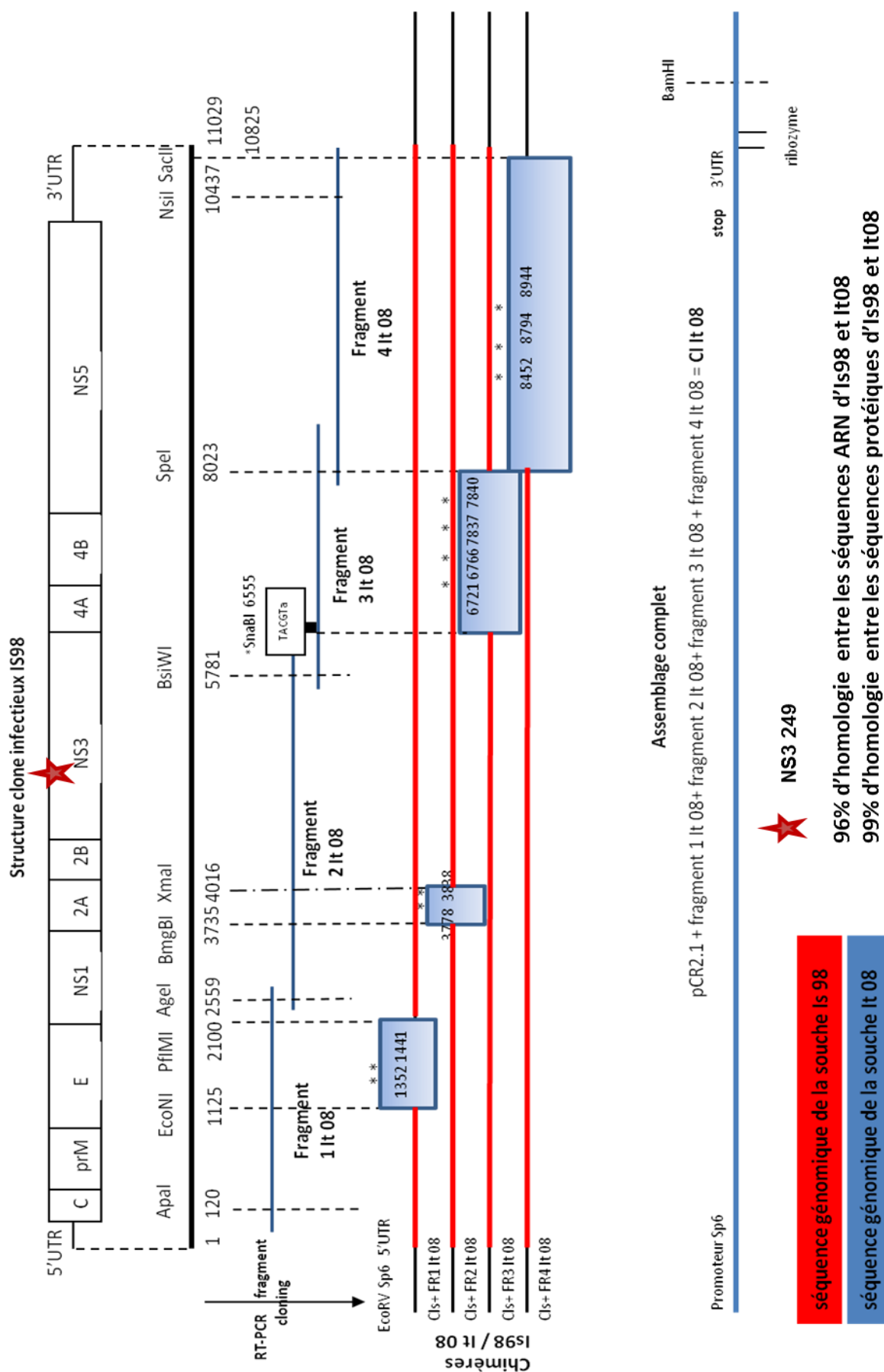


Figure 18 : Représentation schématique de la stratégie de clonage.

Le génome est approximativement à l'échelle. Cls= Clone infectieux Is98, FR= Fragment. Les mutations non silencieuses entre les souches Is98 et It08 sont matérialisées par des astérisques.

Afin d'obtenir ces chimères, les fragments It08 ont été amplifiés à partir d'un extrait d'ARN en utilisant les amorces rapportées dans le tableau 3 :

Fragment	Amorce Sens (5' → 3')	Amorce Anti-sens (5' → 3')
1	113F CGATGTCTAAGAAACCAGGAG	2605 R GTGGCGTTTCAGGGTAATAC
2	2557 F GATGTGGAGGCTTGGATGGAC	5822 R CATTTTGGGTACTCCGTCTCG
3	5761 F CGTGCTGGAAAGAAAGTAGTC	8100 R GTAGAACACATCCACTCCACTC
4	7993 F GAAGTCAGAGGGTACACAAAGG	10894 R TCCTTCCCCTGACCTACA

Tableau 3 : amorces utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt de la souche It08.

Les conditions d'amplification sont celles décrites dans Bahuon et al. (2012). Les fragments obtenus ont été clonés en plasmide pCR2.1 (Invitrogen). Les échanges de fragments entre les génomes It08 et IS98 ont été faits en procédant à une digestion enzymatique (tableau 4), suivie d'une ligation comme décrit dans Bahuon *et al.*, 2012 (176).

Fragment	Enzymes	Positions
1	EcoNI et PflMI	1125-2100
2	BmgBI et XmaI	3735-4008
3	SnaBI et SpeI	6551-8025
4	SpeI et SacII	8025-10825

Tableau 4: Sites de digestion enzymatiques utilisés pour l'insertion des fragments It08 dans le clone infectieux Is98.

Les fragments 1 et 2 ont été clonés dans le plasmide A (figure 19), car les sites de restrictions utilisés n'étaient pas uniques dans le plasmide clone infectieux. Le génome complet est ensuite reconstitué en apportant la partie 3' du génome présente sur le plasmide B, voir figure 19 (176). En revanche les fragments 3 et 4 ont été clonés directement dans le plasmide clone infectieux.

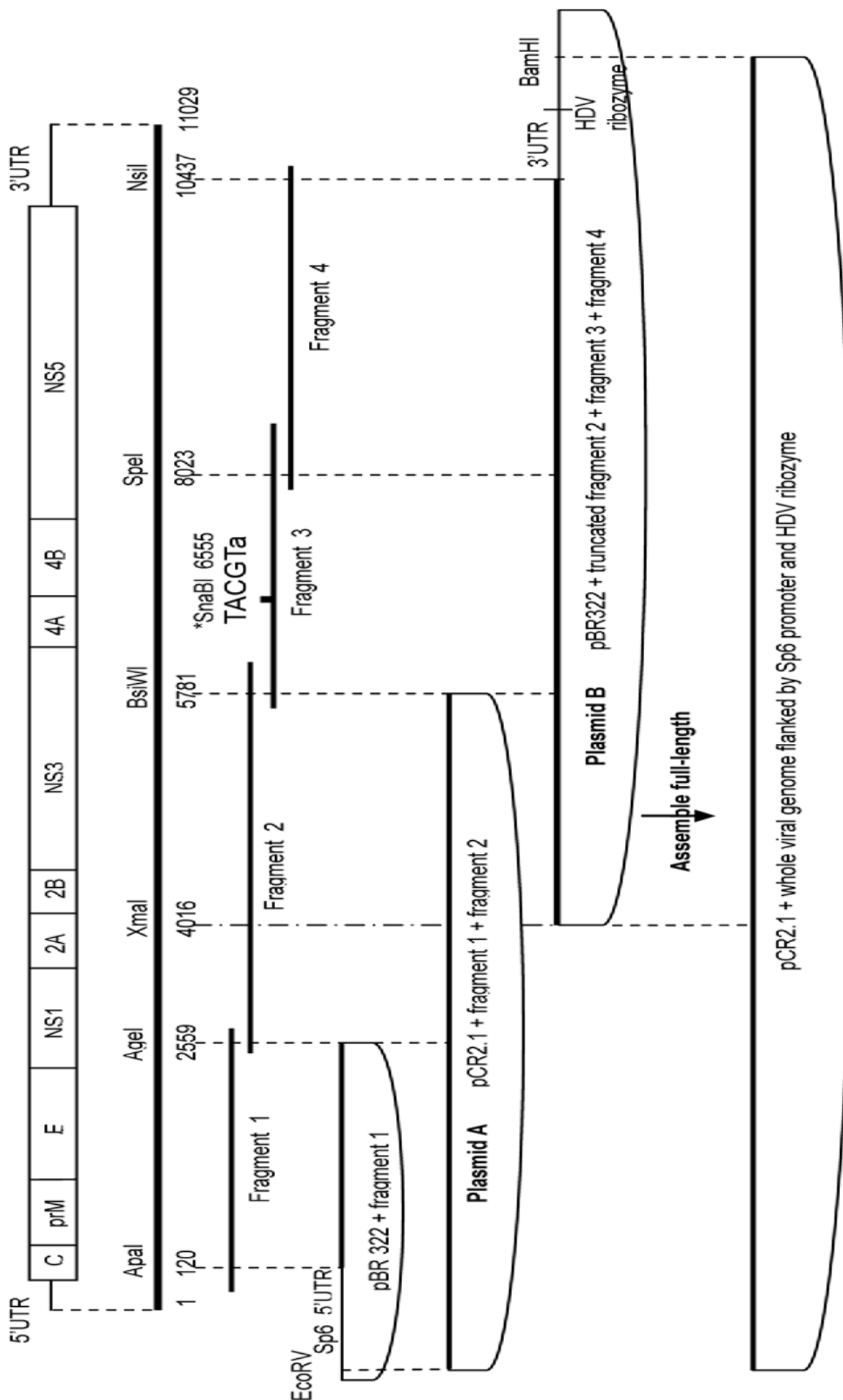


Figure 19 : schéma de la stratégie de clonage du clone infectieux Is98 (d'après Bahuon *et al.*, 2012 (176)).

III. Circular Polymerase Extension Cloning : CPEC

a. Principe

Le but du CPEC est de rassembler plusieurs amplicons obtenus après RT-PCR dans le bon ordre dans un vecteur (180). Pour déterminer cet ordre les fragments de RT-PCR sont conçus pour avoir des extrémités chevauchantes entre un fragment et celui qui le suit dans l'ordre de la construction voulue. Le premier et le dernier fragment de RT-PCR ont des extrémités chevauchantes avec le vecteur. Lorsque les fragments sont en solution, ils s'apparient et l'ADN polymérase fait l'élongation de l'ensemble apparié (figure 20).

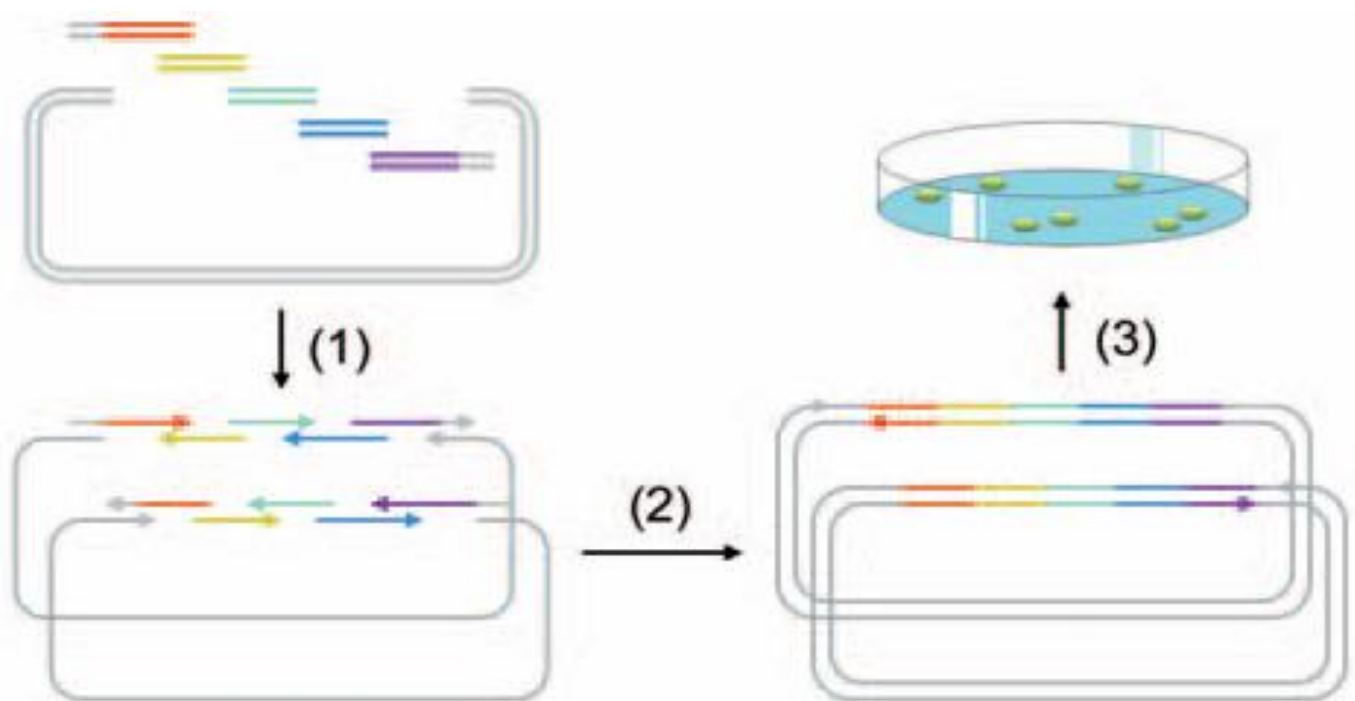


Figure 20 : Schéma du principe du CPEC (d'après Quan et Tian, 2009 (180))

b. Constructions

Nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un polylinker (figure 21), obtenu par synthèse de gène auprès de la société Genecust, pour la création des chimères (181). Celui-ci facilitera l'expression des constructions qui sont transfectées dans des cellules eucaryotes, ici dans des cellules HEK 293T : cellule de rein embryonnaire humain.

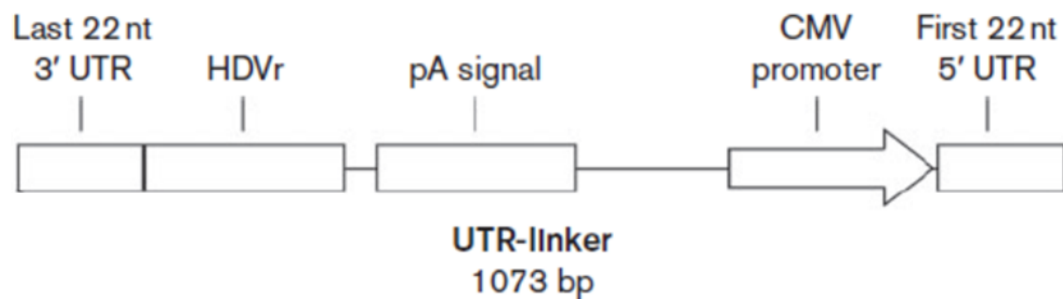


Figure 21: Schéma du polylinker (UTR-linker) utilisé pour la construction du clone infectieux par la technique CPEC (d'après Setoh et al., 2015 (181)).

Ce polylinker assure l'expression de la polyprotéine virale sous contrôle du promoteur fort du cytomégalovirus (CMV) et permet la coupure des ARN viraux à la fin de la région 3'NC par coupure autocatalytique du ribozyme du virus de l'hépatite delta (HDVr).

J'ai donc d'abord procédé à la synthèse des fragments nécessaires avec des amorces spécifiques (tableau 5) :

Fragment	1/ Fragment1 CPEC	2 / Fragment 2 CPEC	3 / Fragment 3 CPEC	4 / Fragment 4 CPEC	Polylinker
Séquence amorce F	5'-AGTAGT TCGCCTGTGT GAGCTG-3'	5'- TACAAGTATTAC CCTGAAACGCC AC-3'	5'- CGTACGAGACGG AGTACCCAAAAT G-3'	5'- CATGAAGAGT GGAGTGGATG TGTTCTAC-3'	5'- GTGGTGCGA GAACACAGG A-3'
Séquence amorce R	5'- GTGGCGTTTC AGGGTAATAC TTGTA-3'	5'- CATTTTGGGTAC TCCGTCTCGTA CG-3'	5'- GTAGAACACATC CACTCCACTCTTC ATG-3'	5'- TACTACTATAA AACTACACTTT TATGC-3'	5'- CAGCTCACA CAGGCGAAC TACT-3'

Tableau 5 : Récapitulatif des séquences d'amorces des différents fragments

Les fragments ont été amplifiés en utilisant les matrices ADN adéquates (tableau 6) :

	<u>Fragment 1</u>	<u>Fragment 2</u>	<u>Fragment 3</u>	<u>Fragment 4</u>	<u>Polylinker</u>
<u>Chimère 1</u>	<u>Plasmide A</u> <u>Chimère 1</u>	<u>CI</u>	<u>CI</u>	<u>CI</u>	<u>x</u>
<u>Chimère 2</u>	<u>CI</u>	<u>Plasmide A</u> <u>Chimère 2</u>	<u>CI</u>	<u>CI</u>	<u>x</u>

Tableau 6 : Récapitulatif des matrices utilisées pour la génération des différents fragments.

CI = Clone infectieux Is98 (176). Plasmide A Chimère 1 ou 2 = voir partie II, matériel et méthode.

Pour synthétiser les fragments, nous avons utilisé le kit “Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase®” (New England Biolabs) selon le protocole suivant:

Les réactifs utilisés sont listés dans le tableau 7:

Réactifs	Volume en μL pour 1 tube 20 μL
Eau	18.5 μL
dNTPs (10 mM)	1 μL
Tampon 5X	10 μL
Amorce F	5 μL
Amorce R	5 μL
Q5 Hot Start	0.5 μL
ADN 0.1 ng. μL^{-1}	10 μL

Tableau 7 : Récapitulatif du mélange réactionnel pour l'amplification individuelle de chaque fragment pour un tube de réaction

Nous avons ensuite réalisé les cycles suivants :

Cycles:

98°C pendant 30 secondes	} 35 cycles	T°X : - Fragment 1: 69°C
98°C pendant 10 secondes		- Fragment 2: 68°C
X°C pendant 30 secondes		- Fragment 3 : 63°C
72°C pendant 2 minutes et 30 secondes		- Fragment 4 : 57°C
72°C pendant 2 minutes		- Polylinker : 66°C
+ 8°C indéfiniment		

Les tailles attendues sont résumées dans le tableau 8:

Polylinker	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
1076pb	2500pb	3200pb	2300pb	3000pb

Tableau 8 : Récapitulatif des tailles attendues pour les différents fragments

Après l'obtention des différents fragments j'ai assemblé ceux-ci pour obtenir les plasmides modifiés reconstitués. Nous avons utilisé 1ng de chaque fragment par réaction. La composition du mélange réactionnel pour l'assemblage des fragments est indiquée dans le tableau 9.

Réactifs	Volume en μL pour 1 tube 20 μL
Eau	QSP 50 μL
dNTPs (10 mM)	1 μL
Tampon 5X	10 μL
Fragment 1	X μL QSP 1ng
Fragment 2	X μL QSP 1ng
Fragment 3	X μL QSP 1ng
Fragment 4	X μL QSP 1ng
Polylinker	X μL QSP 1ng
Q5 Hot Start	1 μL

Tableau 9 : Récapitulatif du mélange réactionnel pour un tube de réaction pour l'assemblage des quatre fragments et du polylinker.

Les cycles suivants ont ensuite été réalisés :

Cycles:

98°C pendant 2 minutes
 98°C pendant 30 secondes
 60°C pendant 30 secondes
 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes

} 35 cycles

98°C pendant 30 secondes
 60°C pendant 30 secondes
 72°C pendant 5 minutes

} 35 cycles

98°C pendant 30 secondes
 60°C pendant 30 secondes
 72°C pendant 8 minutes
 + 8°C indéfiniment

} 35 cycles

Les trois étapes successives présentent des temps d'élongation différents permettant de synthétiser des fragments assemblés de plus en plus grands jusqu'à l'obtention d'un plasmide comportant le génome viral complet.

Une fois les constructions obtenues, nous les avons transfectées en cellule HEK 293T pour obtenir des virus recombinants (voir plus bas paragraphe IV.b).

IV. Productions des virions recombinants

a. Production des virus issus des plasmides

Des transcrits ARN ont été produits à partir des constructions obtenues avec les méthodes classiques de clonage à l'aide d'un kit Sp6 (Ambion Megascript Sp6®) selon les recommandations du fournisseur. Les ARNs ainsi obtenus ont ensuite été électroporés dans des cellules VERO (cellules permissives pour le virus West Nile, déficiente en interféron provenant de reins de singes verts africains, et immortelles car dérivant de cellules tumorales), selon le protocole suivant.

Les cellules ont été lavées deux fois en PBS (-Ca -Mg, qualité culture cellulaire, Thermo Fisher Scientific), puis trypsinées et resuspendues dans 10 mL final avec du milieu complet (DMEM High Glucose, 5%SVF, 1% pénicillin/streptomycine) et enfin transférées dans un tube falcon de 50mL.

Les cellules sont gardées sur la glace.

Les cellules ont été comptées sur cellules de Malassez, puis centrifugées à 4°C et 1500 rpm, pendant 5 min. Le surnageant a été retiré puis les cellules ont été resuspendues dans 50 mL de PBS et l'opération a été répétée trois fois.

Finalement les cellules ont été resuspendues à 1.5×10^7 cellules/mL en PBS froid.

Les cuvettes d'électroporation (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad) sont conservées à température ambiante (cuvettes 0.4 mm) et une électroporation à la fois est réalisée.

Les ARN sont ajoutés sur les cellules, juste avant l'électroporation. Deux témoins sont systématiquement réalisés, pour chaque série d'électroporation, à savoir un témoin sans ARN et 1 témoin sans cellules (20µL d'ARN et 400µL de milieu). J'ai disposé 400 µL de cellules VERO par cuvette d'électroporation auxquels j'ai ajouté 20 µL d'ARN, en assurant un bon mélange de la réaction par pipetage.

L'appareil d'électroporation a été réglé à 25 µF, 0.29 kV, puis 4 pulses ont été appliqués à 4 secondes d'intervalle.

Les cellules ont été transférées dans 10 mL de milieu complet avec 2% Sérum de Veau Foetal, SVF, puis dans une flasque de culture 25cm².

Les flasques ont été transférées en laboratoire confiné de niveau 3, dans une étuve CO₂, à 37°C. Ces boîtes correspondaient au passage 0 (P0). Après 24h de nouvelles flasques 25cm² de

cellules VERO ont été préparées, puis 24h plus tard j'ai prélevé le surnageant des P0 (les 2 flasques P0 effectuées pour un plasmide donné ont été regroupées), centrifugé les surnageants 5 min à 2500 rpm et réalisé des aliquots de 500 µL et de 50 µL (x20).

Les productions P0 ont été stockées à -80°C. Les P0 ont été amplifiés par un passage supplémentaire sur cellules VERO (cf.fig22).

Trois nouvelles flasques 25cm² (P1) (passage de travail) ont été lavées avec 1 mL DMEM puis infectées avec un mélange de 500 µL P0 et 500 µL de milieu DMEM sans SVF. Les flasques P1 ont été incubées pendant 1h30 à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO₂.

Deux lavages de 5 min ont été effectués avec 2 mL DMEM puis 5 mL de milieu complet (2% SVF) ont été ajoutés dans chaque flasque. Après 72h, les surnageants P1 ont été prélevés et des aliquots de 50 µL ont été constitués. Ces surnageants ont été titrés sur cellules VERO.

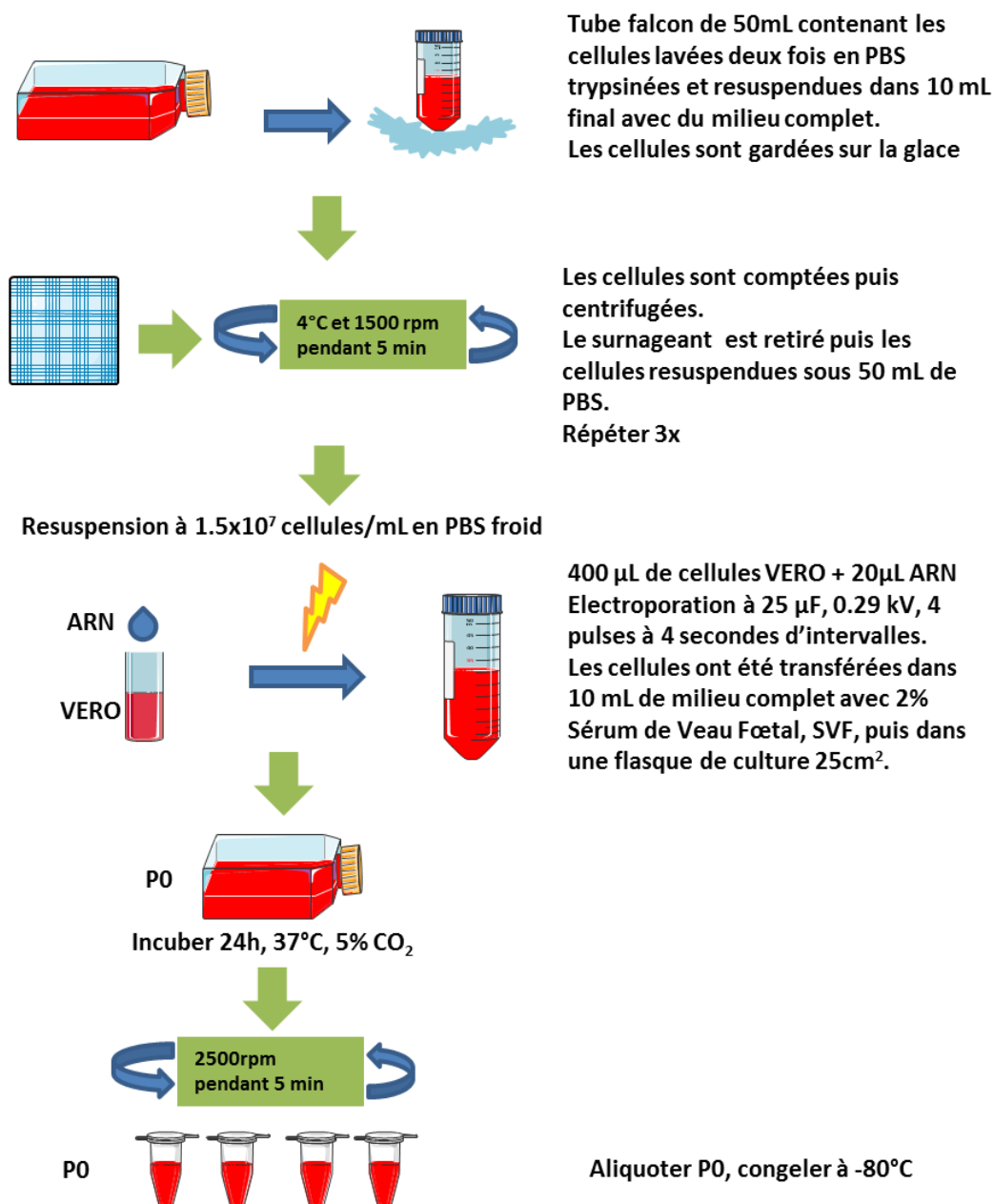


Figure 22 : Exemple de transfection d'ARN dans des cellules VERO par électroporation

Les constructions obtenues avec la méthode CPEC ont été transfectées avec la Lipofectamine LTX et Plus reagent® (Thermo Fisher Scientific) selon la méthodologie suivante.

A J-1, des plaques 6 puits ont été préparées par l'ajout de 600 000 cellules/puits de cellules HEK 293T sous 3-4mL de milieu.

J0 : J'ai réalisé la dilution du Lipofectamine LTX Reagent en Opti-MEM (solution A) :

Pour un puits : -140µL d'opti-MEM

-10 µL de LTX

Parallèlement j'ai réalisé la dilution de l'ADN à transfecter dans le plus Reagent en Opti-MEM (solution ADN) :

Pour un puits : -2500ng ADN

-2.5µL Plus Reagent

-Opti-MEM qsp 150µL

Puis j'ai mélangé volume à volume la solution A et la solution d'ADN :

Pour un puits : -150µL solution ADN

-150µL solution A

Les mélanges ont été incubés 5 min à température ambiante puis déposés dans un puits d'une plaque 6 puits (300µL).

Les plaques 6 puits ont été transférées en laboratoire confiné de niveau 3, dans une étuve à CO₂, à 37°C. Des ECP ont pu être visualisés dans les puits avec plasmide après 2 à 4 jours de culture. A leur apparition j'ai récolté et aliquoté les surnageants (4mL) par 100µL, 500µL et 1mL.

Les virus chimères ainsi produits ont ensuite été amplifiés sur cellules VERO comme décrit dans la section « a » (P1).

Tous les virus chimériques obtenus ont été titrés sur cellules Vero et les titres infectieux ont été calculés en DECP₅₀ selon la méthode Reed et Muench décrite plus bas.

Afin de déterminer les différences de virulence entre nos différentes productions de virus, des essais en culture cellulaire (*in vitro*) et des méthodes de détermination de virologie classique ont été utilisés tels qu'une RT-qPCR et un titrage DECP₅₀ (titrage de la suspension virale en particules infectieuses) permettant de confirmer la capacité répliquative du virus. Dans le même but, un essai d'infection de cellule avec visualisation des plages de lyse formées après infection d'une cellule par une particule infectieuse et diffusion de proche en proche des néovirus produits a été effectué. Ensuite, des essais *in vivo* (évaluation dans un modèle murin et aviaire) ont été réalisés afin de voir si les observations faites *in vitro* étaient corrélées ou non avec des différences de virulence *in vivo*.

V. Détermination de la virulence *in vitro* (titrages et cinétique de réplication virale)

a. Culture cellulaire et infection par les différentes souches de virus

Les cellules VERO ou HEK 293T ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 5% ou 10 % de SVF (cellules VERO et HEK 293T respectivement), 1% de pénicilline/streptomycine (antibiotiques), 1 % L-Glutamine (acide aminé rajouté pour les cultures de cellules HEK 293T uniquement) et 1% de pyruvate (apport énergétique : sucre) (Thermo Fisher Scientific). Lors des passages bi-hebdomadaires, les cellules ont été lavées avec du PBS stérile, trypsinées (désagrégation du tapis adhérent sous l'action de la trypsine) et remises en culture dans du milieu neuf.

Ces différentes cultures cellulaires nous ont servis pour les différents essais *in vitro* cités ci-après.

b. Cinétiques de réplication virale en cellules VERO

Les infections virales ont été réalisées dans des plaques de culture cellulaire 12 puits. Les cellules trypsinées sont re-suspendues dans un volume de 10 mL de milieu complet, et diluées au 1/10ème dans un colorant vital, le bleu Trypan, afin de pouvoir les quantifier en cellule de Malassez (10µL de culture cellulaire dans 90µL de bleu de trypan, les cellules mortes apparaissent bleues au microscope). Puis une suspension cellulaire à 4×10^6 cellules/mL a été réalisée et 4×10^5 cellules/puits ont été distribuées sous 1mL de milieu complet. Les plaques ont ensuite été placées à l'étuve pendant 24h à 37 °C. Puis ces cellules ont été infectées, en laboratoire confiné, avec différentes productions de VWN : deux isolats naturels du virus West Nile (Is98 et It08) ainsi que les chimères 3 et 4. Ces différentes productions ont été testées à plusieurs MOI (Multiplicité d'infection) : 1, 0.1 et 0.01 MOI. Une MOI de 1 correspond à une particule infectieuse par cellule, soit pour 4×10^5 cellules/puits une quantité de 4×10^5 PFU/puits. Les différentes dilutions ont ensuite été ajoutées aux différents puits des plaques de culture cellulaire préparées le jour précédent, afin de démarrer une cinétique d'infection. Les plaques ont ensuite été mises à l'étuve à 37°C et le surnageant de chaque puits a été prélevé (150 µL pour l'extraction d'ARN pour la RT-qPCR et 3 x 50µL pour le titrage DECP₅₀) à 24h, 48h et 72h post-infection afin de suivre la cinétique d'amplification de chaque virus. Après chaque prélèvement, les puits sont complétés avec autant de milieu neuf que prélevé.

c. Titrage DECP₅₀

Les cellules qui apparaissent normalement plates, confluentes et, peu réfringentes, s'arrondissent, deviennent réfringentes et se détachent du support dans le milieu de culture après infection virale. Ici le titrage DECP₅₀ a consisté en la mise en culture de cellules VERO (cellules permissives pour le VWN) avec nos différentes souches de virus (Is98, It08, Chimère 3 et Chimère 4). Chaque souche a été testée à différentes MOI (0.01, 0.1, et 1 MOI). De plus, chaque condition a été testée deux fois (a et b). Les virus utilisés proviennent des infections faites précédemment et dont on a récupéré les surnageants à différents temps post-infection (24, 48 et 72h post-infection). Les réactifs et matériels utilisés pour le titrage des particules virales infectieuses en DECP₅₀ sont :

- Du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 5% de SVF, 1 % de pénicilline/streptomycine et 1% de pyruvate.
- Une culture cellulaire de cellules VERO à 2×10^5 cellules/mL
- Les différents surnageants provenant des infections de cultures cellulaires à différentes MOI.
- Plaques 96 puits à fonds plats, adaptées à la culture cellulaire.
- un Poste de Sécurité Microbiologique en laboratoire confiné de niveau 3.
- Micropipettes.

Les plaques ont été séparées en 3 sections (Figure 23). Chaque section correspondra à un virus et à une MOI donnée. Des répliquats de chaque condition expérimentale ont été réalisés.

198 μ L de DMEM supplémenté ont été ajoutés dans 7 puits de la première colonne de chaque section de la plaque. Dans le premier puits de ces colonnes, 218 μ L de DMEM ont été ajoutés. Dans le premier puits des premières colonnes de chaque section, 2,2 μ L de chaque surnageant viral ont été déposés dans les sections correspondantes. Il s'agit là de la première dilution au 100ème. A partir de ces puits, des dilutions successives des différents virus ont été faite en prélevant 22 μ L du premier puits et en les transvasant dans les puits suivants (figure 23). La même chose a été faite jusqu'à la dilution 10^{-9} . 22 μ L ont été retirés du dernier puits et jetés. Chaque puits contient donc un volume de 198 μ L final qui va être réparti en 3 fois 50 μ L dans les colonnes suivantes (figure 23).

Puis 100 μ L d'une culture cellulaire à 2×10^5 cellules/mL sont ajoutés dans chaque puits de la plaque et celle-ci est placée à l'étuve à 37°C pendant 3 jours.

J1	Virus	Is98 Moi 1a				Is98 Moi 1b				Is98 Moi 0.1a			
	Dilution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-2}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			
B	10^{-3}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			
C	10^{-4}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			
D	10^{-5}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			
E	10^{-6}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			
F	10^{-7}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			
G	10^{-8}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			
H	10^{-9}	22 μ l				22 μ l				22 μ l			

Jeter les 22 μ l 50 μ l de chaque puits de la colonne

Figure 23: Exemple de plaque de 96 puits pour un titrage de particules virales infectieuses d'Is98 à une MOI de 1 et de 0.1 en DECP₅₀

La lecture de plaques se fait à 3 jours après incubations. Chaque puits est observé au microscope optique inversé afin d'observer les effets cytopathogènes causés par les virus au sein de la culture cellulaire. Les dilutions correspondantes aux derniers puits dans lesquels on peut observer des effets cytopathogènes ont été relevées afin de pouvoir déterminer un titre DECP₅₀ pour chaque virus. Le titre en DECP₅₀ correspond à la dose de virus responsable de l'infection de 50% des puits et a été calculé selon la méthode de Reed et Muench (182).

d. Plages de lyse

Ici le test de plaque de lyse a été utilisé pour un titrage (dénombrement des particules virales), et pour pouvoir différencier les comportements des souches virales *in vitro*. Des plaques 6 puits de culture cellulaire ont été préparées 24h avant l'essai. De même que pour la cinétique d'infection, les cellules VERO trypsinées sont dénombrées sur une cellule de Malassez. Une suspension cellulaire à 13.5×10^6 cellules/mL a été réalisée et ensuite 7.5×10^5 cellules/puits ont été distribuées sous 3 mL de milieu complet par puits. Ces plaques ont été incubées 24h à 37°C.

Le lendemain, les puits des plaques de cultures cellulaires ont été lavées avec du DMEM (2x1 mL) puis les cellules ont été infectées pendant 1h à 37°C (temps nécessaire à la réalisation de l'étape d'adsorption des particules virales sur les cellules) avec 500 µL de suspension virale (Is98, It08, mutant Thr du virus Is98, Chimères 3 et 4). Une infection à 100 PFU/puits a été réalisée pour chacun des virus. Les suspensions virales sont ensuite retirées des puits à l'issue de l'heure d'incubation.

De la gélose (50% d'agarose seaplaque à 4% + 50% de MEM 2X complet : 10% SVF, 2% Penicilline/Streptomycine 100 mM, 2% Sodium Pyruvate 100mM) a été préparée pendant l'heure d'infection. 4 mL de gélose ont été répartis dans chaque puits.

Les plaques ont été incubées pendant 3 jours à 37°C et 500 µL d'une solution de cristal violet / paraformaldéhyde (PFA) 4% ont été ajoutés à chaque puits sur la nuit à 37°C afin de fixer et colorer les cellules et ainsi révéler les plages de lyse formées.

Après retrait de la gélose et lavages des puits avec du PBS, les plages de lyses ont été visualisées et comptées à J3 post infection.

Après 3 jours, aucune plage de lyse n'était visualisable dans les puits infectés par le mutant Thr et il a été décidé de prolonger l'incubation jusqu'à 5 jours post-infection. Après fixation et coloration des cellules infectées par le mutant Thr à J5, des plages de lyse ont pu être dénombrées.

VI. Détermination de la virulence *in vivo* (expérimentation animale)

Les virulences des différents virus produits ont également été comparées *in vivo* dans des modèles murins et aviaires.

a. Infections et prélèvements : modèle murin

Les protocoles d'expérimentation animale en animalerie A3 sur modèle murin ont été soumis et approuvés par le comité d'éthique UPEC/ANSES/ENVA, permis numéro 15/02/11–13.

Pour les mutants ponctuels de la souche Is98 en position 249 de NS3, WT Pro (avec un résidu proline en position 249) et mutant Thr (avec un résidu thréonine en position 249) : 80 souris BALB/cByJ (fournies par Charles River®), organisées en groupes de 5 souris de 4 ou 6 semaines d'âge, ont été infectées par injection intra cérébrale (IC) (souriceaux de 4 semaines) ou intra péritonéale (IP) (souriceaux de 6 semaines) avec différentes doses du virus WT Pro, du mutant Thr ou avec du PBS sans endotoxine à pH=7,4 (tableau 10).

		WT Pro / Mutant Thr				
	PBS	0.01PFU	0.1PFU	1PFU	10PFU	100PFU
IP	X		X	X	X	X
IC	X	X	X	X		

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différents groupes de souris.

Pour les virus chimères Is98/It08: 70 souris BALB/cByJ, organisées en 14 groupes de 5 souris, ont été éprouvées par injection par voie IP. Chaque groupe a été infecté par une dose de virus de 1,10 ou 100 PFU avec les souches Is98, It08, chimère 3 et chimère 4. Deux groupes contrôles ont été constitués (inoculés avec un volume identique de PBS ou de surnageant cellulaire témoin).

Une première prise de sang a été effectuée sur les souris à J3 post infection. La virémie est faible et brève chez la plupart des mammifères infectés par le virus West Nile, et est maximale chez la souris 3-4 jours post-infection. Environ 140µL de sang ont été prélevés dans des tubes contenant 15 µL d'EDTA à 50 mM et pH 7.5. Ces sangs ont ensuite été analysés par RT-qPCR.

Un suivi clinique a été réalisé sur les deux semaines post infection. Le poids des souris était relevé quotidiennement et un score clinique correspondant à leur « état de santé » a été relevé (0 : la souris n'a aucun symptôme visible et est vive, 1 : la souris a les poils ébouriffés

correspondant à une augmentation de sa température corporelle (fièvre), 2 : signes neurologiques présents et 3 : souris au stade terminal) quotidiennement ou bi-quotidiennement quand l'état de santé des animaux le nécessitaient entre J3 et J16 post-infection.

Les cerveaux des souris mortes ou euthanasiées suites aux infections ont été prélevés juste après la mort des souris et découpés en deux selon un axe longitudinal. Une moitié des cerveaux a été placée en formol pendant 7 jours puis en éthanol 70% pour une analyse histologique ultérieure et l'autre moitié a été mise en RNA later (solution permettant la conservation des ARN d'un tissu) pour une analyse RT-qPCR.

21 jours post-infection, une prise de sang sur les souris survivantes a été réalisée sur des tubes sans anticoagulant. Les sérums prélevés après coagulation et centrifugation à 5000rpm pendant 5 minutes, ont été analysés en sérologie avec un test ELISA compétitif (test permettant de rechercher l'ensemble des immunoglobulines dirigées contre le virus West Nile). Cette sérologie permet de conclure si le VWN d'épreuve s'est multiplié ou non dans les souris ayant survécu.

Des RT-qPCR avec les sondes Pro C ou 3'NC ciblant des fragments distincts du génome viral (région 5'NC et début de C, ou 3'NC respectivement) et β -actine (ARNm cellulaire) ont été réalisées sur les sangs prélevés 3 jours post-infection afin d'étudier la période virémique et sur les cerveaux de ces souris afin d'étudier les différences de virulence entre les virus étudiés du point de vue de leur capacité à se multiplier dans les tissus périphériques puis à envahir le système nerveux central de l'hôte murin.

b. Infections et prélèvements : modèle aviaire

Le protocole d'expérimentation animale sur modèle aviaire a été soumis et approuvé par le comité d'éthique CODA-CERVA/IPS numéro d'agrément du laboratoire : LA1230174.

Des infections expérimentales de poulets SPF (Specific-pathogen-free) de 1 jour (Lohmann Valo®, agrément N° H HRB 110088) en animalerie A3 permettent d'évaluer la virulence dans des modèles *in vivo* disponibles et pertinents pour les hôtes aviaires sensibles du VWN (124): les signes cliniques, les niveaux de virémie et de la charge virale périphérique ainsi que le passage dans le système nerveux central ont été recherchés après infection avec les différents virus modifiés produits, suite à des inoculations sous cutanées (SC) ou intra cérébrales (IC).

Les niveaux de virémie et de la charge virale périphérique ainsi que le passage dans le système nerveux central ont été recherchés par RT-qPCR. Des extraits d'ARN ont été réalisés à partir des prélèvements de sang et de follicules plumeux réalisés à J3, ainsi qu'à partir des prélèvements oraux réalisés à J7 et J14 post-infection (pour plus de précisions sur ces

prélèvements, voir infra). Des extractions d'ARN ont aussi été réalisées sur les cerveaux prélevés sur les animaux morts (avant J14) ou euthanasiés (à J14 post-infection) (tableau 11).

Souche	IS98	It08	Chimère 3	Chimère 4	PBS	Voie d'inoculation	Dose infectante	Groupe	
Nombre d'animaux	5	5	5	5	5	IC (50 µL)	10 ³ TCID50	Prélèvements oraux (écouvillons), sang (150 µL) et follicules plumeux (3) à J3 Prélèvements oraux à J7 et J14 Prélèvements de sangs à J14 et euthanasie	Groupe suivi virémie et ARNémie
Nombre d'animaux	5	5	5	5	5	SC (100 µL)	10 ³ TCID50		
Nombre d'animaux	5	5	5	5	5	IC (50 µL)	10 ³ TCID50	Suivi mortalité Prélèvements de sangs à J14 et euthanasie	Groupe suivi mortalité
Nombre d'animaux	5	5	5	5	5	SC (100 µL)	10 ³ TCID50		

Tableau 11 : Récapitulatif des conditions expérimentales pour les infections sur poulets SPF de 1 jour.

Le prélèvement de sang effectué à J3 a nécessité le sacrifice des individus destinés à être prélevés afin de collecter un volume de sang suffisant pour les tests RT-PCRq. 30% des individus de chaque groupe ont donc été sacrifiés à J3 post-infection (3/10) et leur virémie étudiée par RT-qPCR. Un prélèvement de sang a été effectué à J14 post-infection (fin de l'expérimentation) sur les individus ayant survécu et un test ELISA commercial a été réalisé sur ces sérums en suivant les recommandations du fournisseur (ELISA compétition WN : ID-SCREEN WEST NILE COMPETITION®, ID-Vet) pour vérifier le taux de séroconversion des survivants.

Pour les prélèvements de follicules plumeux, trois follicules plumeux ont été prélevés au niveau des ailes à J3 post-infection sur les individus 1 à 5 de chaque groupe dans la mesure où ils étaient encore en vie.

Les follicules plumeux d'un animal (en ne gardant que la pulpe et non les plumes) sont mis dans des tubes Eppendorf® SafeLock de 2mL avec :

- 600 µL de solution « Ambion Lysis/binding concentrate (100mL) (cat nr AM8500 ; Thermo Fisher Scientific®) »
- 12 µL de DTT du kit « Ambion MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (cat nr AM1830) »
- 1 bille en acier inoxydable de 5mm

Les tubes ont ensuite été disposés dans un ribolyseur (Qiagen Tissuelyser) puis lysés 3min à 30Hz deux fois de suite puis centrifugés entre +4°C et +8°C pendant 10min à 8000rpm.

Le surnageant a ensuite été récupéré et une extraction d'ARN a été réalisée, suivie d'une quantification par RT-PCR quantitative.

Les individus numérotés 1 à 5 des différentes populations ont subi un écouvillonnage oral à J3, J7 et J14 post infection. Cet écouvillonnage consistait à un passage de l'écouvillon dans la cavité orale des individus. Les écouvillons ont ensuite été lavés dans du RNA Later pour recueillir les cellules, la solution obtenue a permis l'extraction des ARN, conservés à -80°C, et ceux-ci ont ensuite été analysés en RT-PCR quantitative.

VII. Extraction et amplification des acides nucléiques

a. Extraction des acides nucléiques

Les extractions d'ARN provenant de nos différents échantillons (sang, surnageant de culture cellulaire, écouvillon, tissus périphériques, cerveaux), ont été réalisées avec le robot Kingfisher et son kit d'extraction (kit d'extraction MagVet™ Universal Isolation (Lifetechnologie ; référence : MV384)). L'automate Kingfisher permet l'automatisation de l'extraction des acides nucléiques par la technologie des billes magnétiques.

Le kit comprend :

- Une solution contenant les billes NM_LSI_Beads
- Deux solutions N1 et M1 qui devront être mélangées avant l'extraction afin de former le réactif de lyse NM1.
- Une solution de Binding NM2
- Un tampon de lavage NM3
- Un tampon de lavage NM4
- Un tampon d'élution NM6

Il faut donc distribuer les tampons cités ci-dessous dans des plaques (Deep Well) en respectant les volumes (un unique réactif par plaque) (tableau 12).

Etape	Tampon	Volume
Lyse	NM1	250 µL
Lavage 1	NM3	600 µL
Lavage 2	NM4	600 µL
Lavage 3	Ethanol 80% de qualité biologie moléculaire	600 µL
Elution	NM6	80 µL

Tableau 12 : Récapitulatif des volumes pour un puits pour une extraction d'ARN par le robot Kingfisher

Enfin, le tampon de chargement composé de 600 µL de tampon NM2 et de 20 µL de billes est préparé et un peigne est déposé sur une plaque d'élution vide.

La plaque Deep well contenant le réactif de lyse est transportée dans la pièce de chargement des acides nucléiques afin d'y ajouter 100 µL des échantillons. Sur cette même plaque, dans la salle d'extraction, 620 µL du mélange NM2 avec les billes (tampon de chargement) sont déposés manuellement dans chaque puits d'extraction. Le robot d'extraction, qui va réaliser toutes les étapes de l'extraction, est ensuite démarré.

b. Reverse Transcription-PCR quantitative (RT-qPCR)

J'ai utilisé le cycle suivant pour mes RT-qPCR (183) :

Transcription inverse :	45°C	10 min	
Inactivation de la RT :	95°C	10 min	
Dénaturation :	95°C	15 s	} 40cycles
PCR et quantification :	60°C	1min	

Les amplifications utilisées se basent sur les publications de S. Linke *et al.*, 2005 (184) pour la RT-qPCR ProC, la publication de Toussaint (185) pour la RT-qPCR β actine et une méthode interne pour la RT-qPCR 3'NC. Le rapporteur de la sonde est un fluorochrome FAM (6-carboxyfluorescein) ou VIC (fluorochrome de formule non divulguée par le fournisseur) (pour la sonde β actine uniquement) placé en 5' de la sonde. Le quencher est quant à lui un fluorochrome TAMRA (6-carboxyteramethy-rhodamine) ou MGB (Minor Groove Binding) placé en 3' de la sonde. Les séquences (5'-3') des sondes et amorces utilisées ainsi que leurs

positions nucléotidiques sont basés sur les séquences Genbank AF481864.1 pour le VWN et Genbank AF035774.1 pour la β -Actine et sont les suivantes:

VWN (cible):

-Amorce sens: WNproC Fwd : 5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3' 10 -33
-Amorce anti-sens: WNproC Rev : 5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3' 132-153
-Sonde: WNproC probe: 5' – FAM - CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT –Tamra - 3'
Longueur de l'amplicon = 144 bp.

-Amorce sens: WN3'NC-F 10538 : 5'-GAGTAGACGGTGCTGCCTGC-3'
-Amorce anti-sens: WN3'NC-R 10627 : 5'-CGAGACGGTTCTGAGGGCTTAC-3'
-Sonde : WN3'NC-probe 5'-FAM-ACCCAGTCCTCCTGGGGT-MGB-3'
Longueur de l'amplicon = 89 bp

β -Actin (contrôle endogène):

-Amorce sens: ACTBFwd : 5'-CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC-3' 966-991
-Amorce anti-sens: ACTBRev : 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3' 1096-1121
-Sonde: ACTB : 5'-VIC-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMRA-3' 1042-1067
Longueur de l'amplicon = 156bp

La RT-qPCR a été réalisée sur les extraits d'ARN totaux (cellulaires et viraux) obtenus par le robot Kingfisher.

Les thermocycleurs utilisés étaient les appareils Step-one Plus Real time PCR system ou Applied Biosystem7500 (Life Science).

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Le kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystem, 4387424). Conservé à une température < -16°C
- Amorces à 100 μ M. Conservées à une température < -16°C
- Sondes resuspendues à 10 μ M. Conservées à une température < -16°C
- De l'eau de qualité biologie moléculaire sans RNase. Conservée à une température < -16°C
- Une gamme Standard d'ARN du VWN à 10⁶ copies / μ L. Conservée à une température < -76°C
- Une gamme Standard d'ARN β -Actine à 10⁷ copies / μ L. Conservée à une température < -76°C.

Afin de pouvoir quantifier la quantité d'ARN initialement déposée dans les tubes, nous disposons de gammes d'ARN standard de β -actine et de VWN, ces ARN standards ont été obtenus après clonage des régions d'intérêt des ARN correspondants sous contrôle d'un promoteur T7, transcription des ARN *in vitro* par action de la polymérase T7 et digestion des ADN plasmidiques présents dans la réaction par digestion DNaseI et ont été quantifiés par spectrophotométrie avec le NanoDrop® (Thermo® Scientific).

Ces deux gammes standard (étalon) ont été réalisées en parallèle dans nos essais. La première gamme comporte des concentrations connues en ARN de β -actine (dilutions de facteur 10 dans de l'eau RNase free, pour des concentrations allant de 5×10^6 à 50 copies/ μ L). La seconde comprend des concentrations connues en ARN du virus West Nile (dilutions de facteur 10 dans de l'eau RNase free, pour des concentrations allant de 5×10^5 à 5 copies/ μ L).

Après l'extraction des ARN, nous avons préparé un mélange réactionnel de RT-PCR contenant (tableau 13) :

- un prémix Pro-C contenant la sonde Taqman et les amorces amplifiant un segment du génome du virus West Nile (5'NC et un fragment du gène C) ou un prémix 3'NC contenant la sonde Taqman et les amorces amplifiant un segment différent du génome du virus West Nile (portion de la région 3'NC)
- un prémix β -actine comportant de la même façon des sondes et des amorces dirigées contre un ARN endogène, la β -actine. L'amplification de la β -actine permet de contrôler les étapes de conservation des échantillons, d'extraction des ARN et de normaliser les résultats.
- un tampon 2X (Mg^{2+} , dNTP, etc...) et l'enhancer pour favoriser l'activité de la Taq polymérase
- les enzymes, la Taq-Polymérase ainsi que la transcriptase inverse (RT)
- l'eau Rnase free (qualité biologie moléculaire).

Réactifs	Volume en μ L pour 1 tube (Volume final : 20 μ L)
Eau	4.1
Tampon 2X	12.5
Enhancer	1
RT-PCR mix 25X	1
Prémix Pro C ou 3'NC	0.7
Prémix β -actine	0.7

Tableau 13 : Réactifs nécessaires à la RT-qPCR pour un tube. Les réactifs sont assemblés dans la glace.

Une fois le mix assemblé, 20 μL de ce mix ont été placés dans des barrettes de PCR comportant 8 puits, puis 5 μL des extraits ARN ont été ajoutés selon un plan établi au préalable reporté sur les documents qualité relatifs au suivi des essais de biologie moléculaire.

Les barrettes ont ensuite été déposées dans le thermocycleur où les différentes étapes ont été effectuées. Ce thermocycleur est dit à temps réel car il possède un laser qui va exciter les fluorochromes des sondes ; ces dernières lorsqu'elles seront hydrolysées vont libérer le rapporteur qui pourra ainsi émettre librement sa fluorescence qui sera directement lue par les fluorimètres de ce même thermocycleur.

RESULTATS

I. Bilan des constructions

Des chimères des régions du génome les plus variables entre les souches Is98 et It08, à savoir les régions E, NS2A, NS4A/NS4B et NS5, ont été générées.

Les quatre constructions chimériques Is98/It08, prévues au début de l'étude, ont été achevées mais seulement deux, obtenues plus précocement, ont pu faire l'objet des essais de virulence *in vitro* et *in vivo*: la Chimère 3 (CIs + Fr3 It08, gènes d'intérêt modifiés: NS4A-NS4B) et la chimère 4 (CIs + Fr4 It08, gène d'intérêt modifié: NS5) (Figure 18). L'obtention des chimères 1 et 2 a été plus problématique. Après obtention des plasmides attendus par approche classique pour ces deux constructions (Section II « Matériels et méthodes »), les productions des virus chimères correspondants en cellules VERO après transfection des ARN transcrits *in vitro* ont échoué à plusieurs reprises et un séquençage complet des plasmides clone infectieux chimères 1 et 2 a été entrepris. Les séquences des plasmides clones infectieux pour les chimères 3 et 4 étaient correctes, en revanche pour la chimère 2 une délétion a été observée dans la séquence nucléotidique. Il manquait 12 nucléotides entre les bases 2173 et 2185. Alors que pour le plasmide clone infection Chimère 1, un contrôle plus limité des séquences (aux abords immédiats de la séquence It08 remplaçant la séquence Is98 correspondante) avait permis de constater des anomalies de séquences importantes. De multiples tentatives de clonage ont ensuite été retenues, sans succès, pour les chimères 1 et 2.

Une synthèse à façon des fragments 1 et 2 et leur insertion dans le plasmide A (voir figure 18) ont été réalisées par la société Genecust®. J'ai tenté de réassembler ensuite les plasmides A et B par approche classique de clonage (voir figure 18). Les plasmides clone infectieux se sont révélés instables et les constructions finales n'ont jamais pu être obtenues. La transfection des ARN correspondants aux constructions clone infectieux pour les chimères 3 et 4 ont permis d'obtenir des particules infectieuses sur cellules VERO après plusieurs essais. Les suspensions virales obtenues à l'issue de deux passages sur cellules VERO (et utilisées par la suite pour les essais de virulence) ont été titrées (titrage DECP₅₀ et en plages de lyse) et le génome viral complet a été séquencé.

Le tableau 14 récapitule les constructions obtenues par approche classique de clonage.

Chimères	Clonage	Séquençage	Synthèse	Clone infectieux séquence complète
1	ok	X	ok	X
2	ok	X	ok	X
3	ok	ok	-	ok
4	ok	ok	-	ok

Tableau 14 : Récapitulatif des constructions obtenues par approche classique de clonage

Les chimères 1 et 2 ne pouvant pas être obtenues facilement par cette approche, j'ai mis en place une autre méthode de « circular polymerase extension cloning » ou CPEC (186) au laboratoire (tableau 15).

	<u>Fragment 1</u>	<u>Fragment 2</u>	<u>Fragment 3</u>	<u>Fragment 4</u>	<u>Polylinker</u>
<u>Région</u>	<u>113 -> 2605</u>	<u>2581 -> 5822</u>	<u>5798 -> 8100</u>	<u>8073 -> 10478</u>	<u>:</u>
<u>Taille</u>	<u>2468 pb</u>	<u>3217 pb</u>	<u>2275 pb</u>	<u>2950 pb</u>	<u>1076 pb</u>
<u>Chimère 1</u>	<u>Plasmide A</u> <u>Chimère 1</u>	<u>CI</u>	<u>CI</u>	<u>CI</u>	<u>X</u>
<u>Fragment obtenu</u>	<u>ok</u>	<u>ok</u>	<u>Ok</u>	<u>ok</u>	<u>ok</u>
<u>Chimère 2</u>	<u>CI</u>	<u>Plasmide A</u> <u>Chimère 2</u>	<u>CI</u>	<u>CI</u>	<u>X</u>
<u>Fragment obtenu</u>	<u>ok</u>	<u>ok</u>	<u>Ok</u>	<u>ok</u>	<u>ok</u>

Tableau 15 : Récapitulatif des amplifications et plasmides utilisés pour la production des chimères 1 et 2 par approche CPEC. CI = Clone infectieux Is98.

Après amplification des fragments souhaités (Tableau 15), des essais d'assemblage des différents fragments obtenus et de cyclisation ont été menés, ainsi que des tentatives de transfections en cellules HEK 293T des ADN circulaires obtenus qui ont abouties à l'obtention de particules virales recombinantes en février 2017. La présence d'ARN viral a été vérifiée dans les surnageants des cultures 4 jours après transfection. Les particules virales obtenues sont en cours de caractérisation.

II. Détermination de la virulence *in vitro*

a. Réplication virale et capacités de diffusion des particules infectieuses (Plages de Lyse)

Afin de mieux appréhender la capacité répliquative des différents virus *in vitro*, une visualisation des plages de lyse formées après infection d'une cellule par une particule infectieuse et diffusion de proche en proche des néo-virions produits a été effectuée (figure 24).

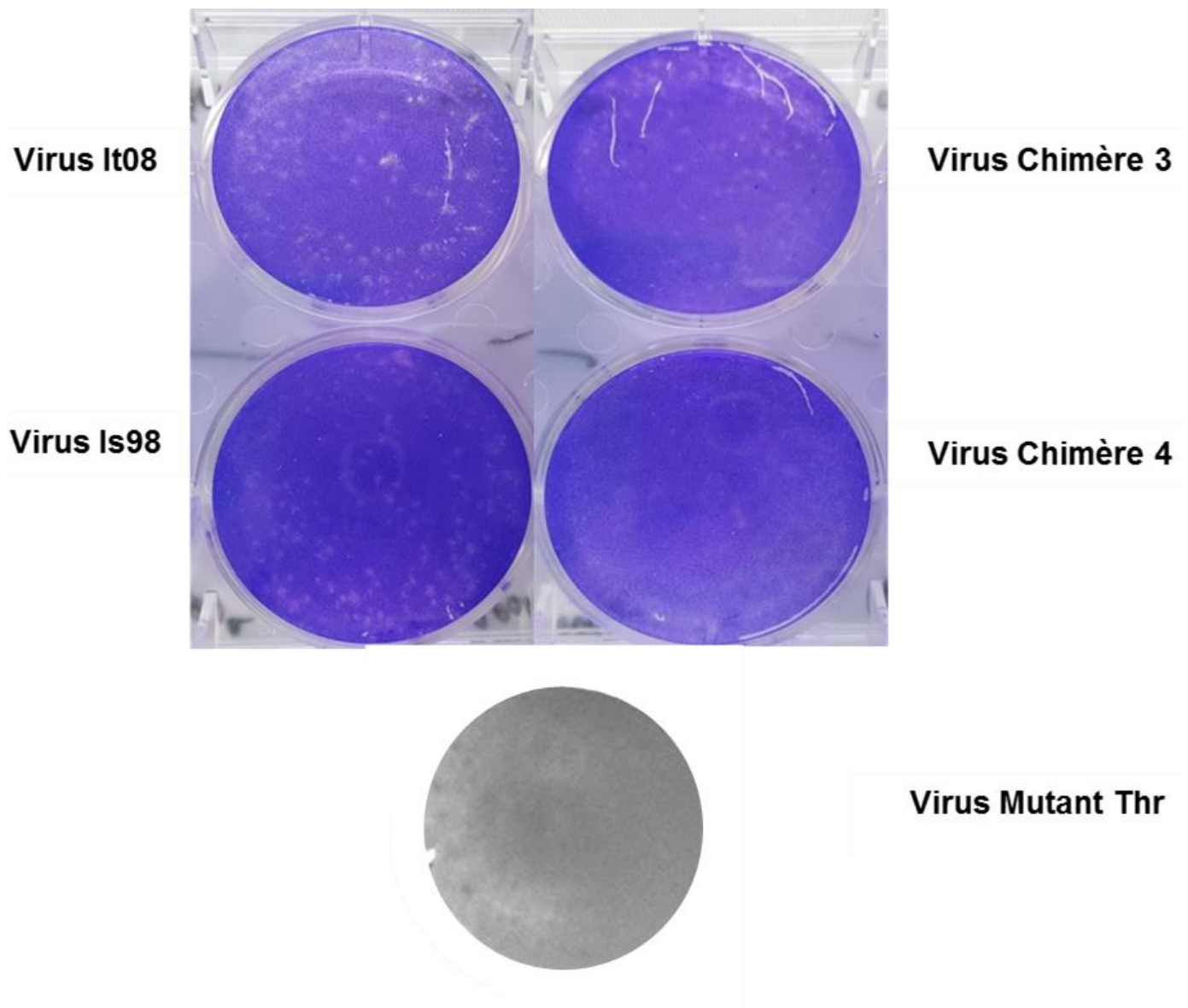


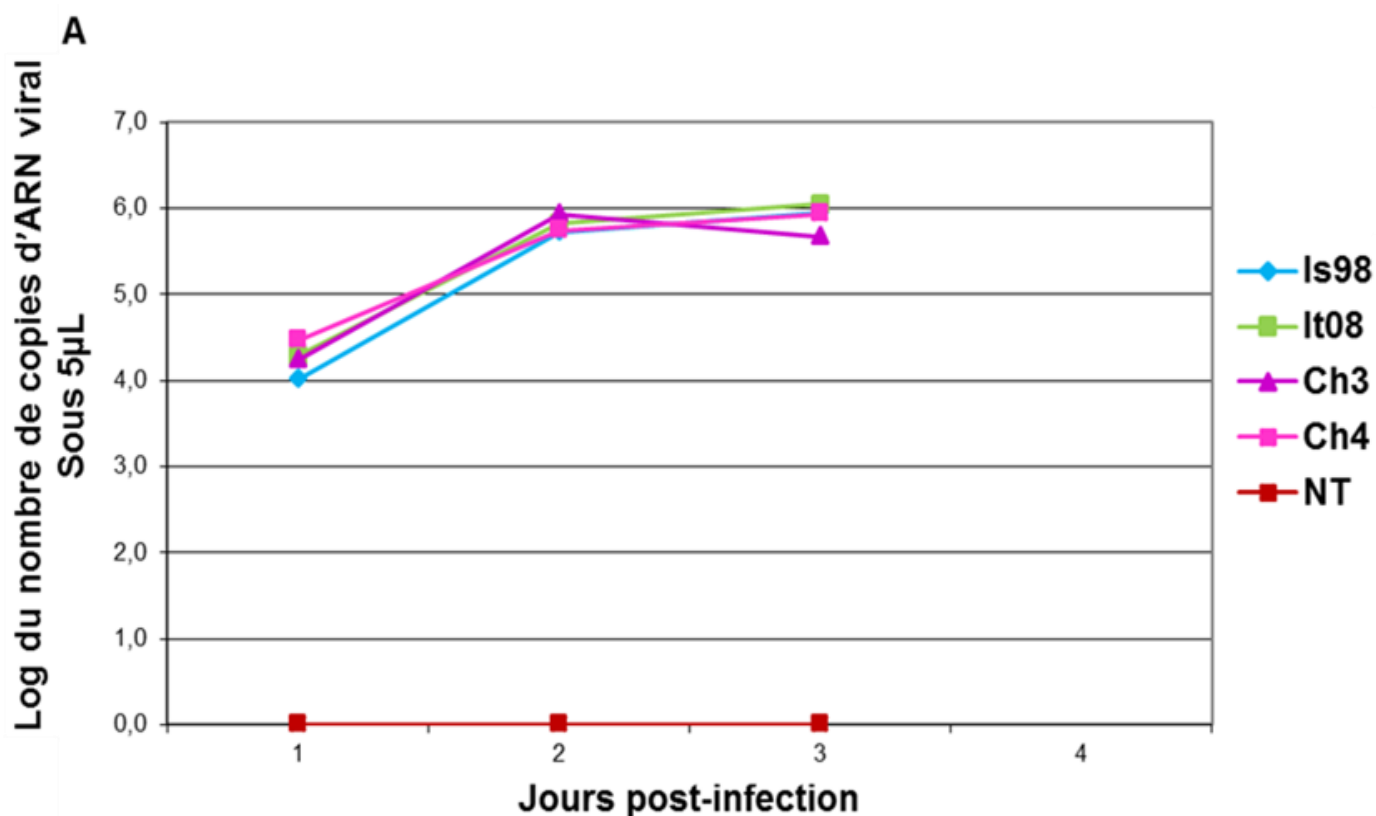
Figure 24 : Observation des plages de lyse obtenues 3 jours post infection de cellules VERO avec les différentes productions virales à 100 PFU par puits (ces résultats sont représentatifs de 2 essais indépendants).

Des plages de lyses ont pu être visualisées pour toutes les constructions de virus testées. Pour les virus Is98, It08 et Chimère 3, les plages de lyses étaient morphologiquement identiques. En revanche pour les virus Chimère 4 et Mutant Thr, les plages de lyses étaient très petites

(difficiles à observer pour Chimère 4), voire non visibles à 3 jours post infection pour Mutant Thr (elles sont visibles à 5 jours post-infection, données non montrées) ce qui indique que ces virus présentent une réplication ou une diffusion moins efficace que les 3 autres virus produits, sur des cultures de cellules VERO.

b. Cinétiques d'infection

Afin de vérifier l'hypothèse énoncée précédemment, une cinétique d'infection sur des cellules VERO avec les différents virus a été réalisée et les surnageants des cellules infectées ont été analysés par RT-qPCR (figure 25). Cette expérience nous permet de décrire la multiplication virale dans le temps pour les différents virus testés.



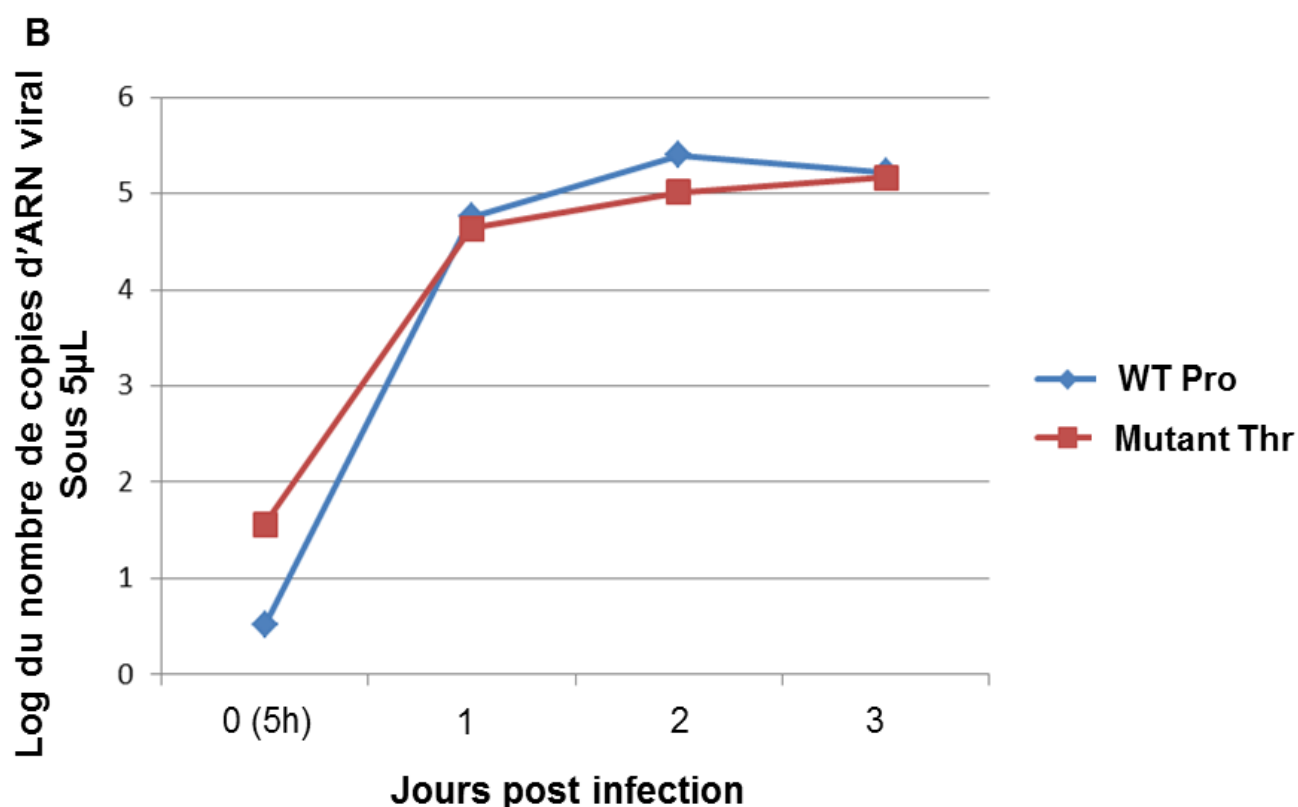
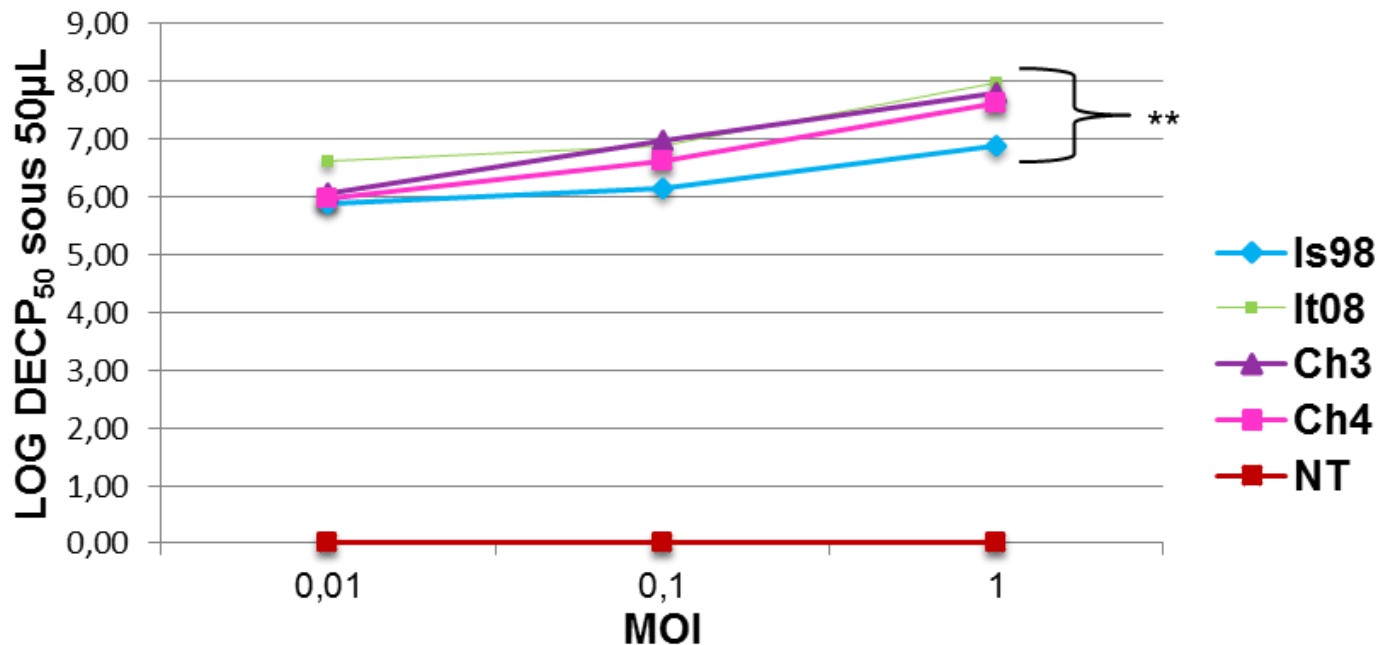


Figure 25 : Cinétique d'infection de cellules VERO avec 0.1 MOI des différents virus produits (Is98, It08, Chimères 3 et 4 (Ch3 et 4 dans la légende) (A) et le mutant Thr (B), obtenue après amplification des ARN viraux dans les surnageants des cellules infectées (prise d'essai de 140µL) par RT-qPCR (analyses effectuées sur des triplicats, 1 seul essai pour les données présentées en A, deux infections indépendantes en B)

La RT-qPCR réalisée nous a permis de comparer les cinétiques de réplication des virus Is98, It08, Chimères 3, 4 et Mutant Thr (comparativement à Is98 ou WT Pro pour ce dernier). Les différents virus testés ont présenté des cinétiques de réplication comparables et ce quel que soit la MOI considérée (figure 25 et données non montrées). A J1 post infection, la quantité d'ARN viral détectée dépendait de la MOI utilisée (environ 1 Log de variation entre les conditions expérimentales testées, en accord avec la différence d'1 Log entre les MOI utilisées) (données non montrées pour les MOI de 1 et de 0.01). La quantité d'ARN viral a augmenté jusqu'à J2 post-infection, pour tous les virus, et était identique pour les différents virus et différentes MOI évalués (différence non significative entre les virus. Test de 2way ANOVA et post test de Tukey, logiciel Graphpad Prism), puis le nombre de copies d'ARN viral est resté constant entre J2 et J3 post-infection (système d'amplification à saturation). Les deux chimères, ainsi que le mutant semblent se comporter comme les virus référents Is98 et It08. De ce fait, ce test ne nous permet pas d'observer un défaut de réplication de la chimère 4, ni du mutant Thr par rapport aux trois autres virus.

Pour compléter les résultats de la RT-qPCR, un titrage des particules infectieuses en DECP₅₀ a été réalisé afin de mesurer le pouvoir infectieux des particules virales produites dans le surnageant des cellules infectées avec les différentes productions virales (figure 26).

A. Production de particules infectieuses à J1 pi



B. Production de particules infectieuses à J2 pi

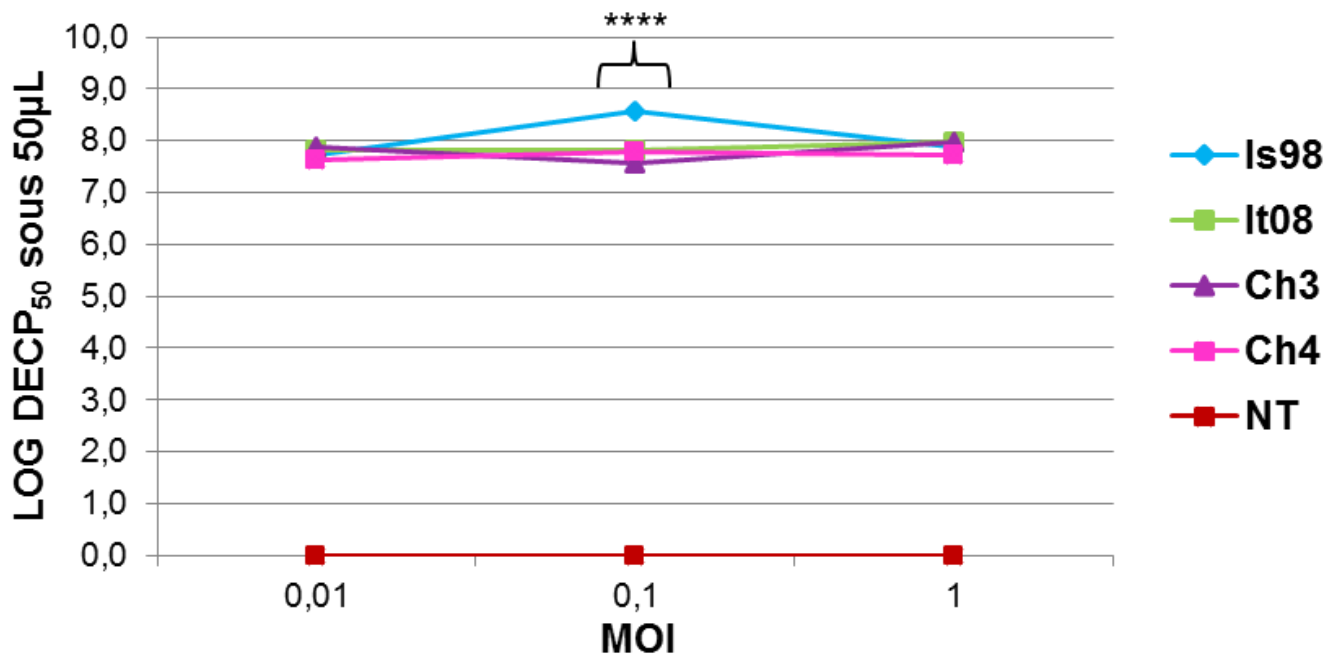


Figure 26: Production de particules infectieuses après infection de cellules VERO par les virus Is98, It08, Chimères 3 et 4 (Ch3 et 4) à J1 (A) et J2 (B) post-infection. ** pour $p < 0.01$ (1 seul essai, avec analyses des conditions expérimentales en triplicat)**

Un jour après l'infection des cellules, les titres viraux étaient comparables pour les chimères 3 et 4, It08 et Is98 à 0.01 MOI et à 0.1 MOI (Différence non significative en Test 2way ANOVA, et post test de Tukey de Graphpad Prism). Par contre, à la MOI de 1, une différence significative (Test 2way ANOVA et post test de Tukey de Graphpad Prism) a été identifiée entre la souche It08 et Is98. En effet la souche It08 semble mieux se répliquer qu'Is98. Les souches chimères semblent adopter un comportement plus semblable à It08 qu'à Is98. Un effet de la dose d'infection sur le titre infectieux des surnageants à J1 post-infection a été observé pour tous les virus testés. Plus les MOI étaient élevées, plus les surnageants prélevés à J1 post-infection comportaient de particules infectieuses (figure 26 A). A J2 post-infection, pour les MOI de 0.01 et 1, les différents virus semblent également se répliquer de façon comparable (pas de différence statistique significative, test 2way ANOVA et post test de Tukey, Graphpad Prism). Par contre à la MOI de 0.1, Is98 semble se comporter différemment des autres virus (Différence significative, test 2way ANOVA et post test de Tukey de Graphpad Prism), avec un titre infectieux significativement plus élevé que pour les autres virus étudiés. Les chimères ont toujours une réplication comparable à It08. On peut également observer un ralentissement de la réplication virale et une perte de l'effet dose à J2 post-infection (titre constant quel que soit la MOI) (figure 26 B). Dans les conditions expérimentales testées, la réplication virale évaluée à partir de la mesure du titre infectieux dans les surnageants des cultures infectées, présente généralement une efficacité comparable pour Is98, It08, Chimères 3 et 4.

A l'époque des travaux sur le mutant NS3 mutant Thr, les données de réplication par évaluation du titre infectieux n'ont pas été collectées.

III. Détermination de la virulence *in vivo* : expérimentation animale

Des tests *in vivo* permettant de reproduire plus précisément la pathogénie des infections virales et d'étudier plus finement les déterminants de virulence ont été réalisés. D'une part un modèle murin, la souris BALB/cByJ, très utilisée pour les tests d'infection avec le VWN, a été choisi, car il reproduit les infections neuro-invasives observées chez les mammifères (homme et cheval) (187). D'autre part un modèle aviaire, le poulet SPF de 1 jour, a été retenu car il reproduit les infections neuro-invasives observées chez les hôtes aviaires (124).

a. Importance du résidu 249 de NS3 dans la modulation de la virulence du VWN chez la souris

i. Suivi de mortalité des souris

Pour vérifier l'importance que la modification du résidu 249 de NS3 pouvait avoir dans la modulation de la virulence du VWN chez l'hôte mammifère, j'ai infecté des souris avec deux virus issus de constructions ne se différenciant que par la mutation de ce résidu :

WTPro : Clone infectieux séquence sauvage (NS3-249Pro)

Mutant Thr : Clone infectieux séquence sauvage avec mutation NS3-249Thr

Les souris infectées par voie IP avec le clone infectieux WT Pro sont mortes de l'infection selon un schéma classique, les décès se produisant entre le jour 8 et le jour 12 post-infection (tableau 16A), tandis que les souris infectées par le mutant Thr ont survécu à l'infection à l'exception d'un individu à la dose 1 PFU décédé à 16 jours post-infection (p-i) ; plus de mortalité et de symptômes cliniques ont été induits, de façon significative dans les groupes 10 et 100 MOI avec le virus WT Pro. Les symptômes cliniques observés dans les groupes WT Pro comprenaient le poil hirsute, la prostration, les tremblements involontaires des muscles et la paralysie des membres postérieurs. En outre, la perte de poids a été rapidement induite lors de l'infection par le virus WT Pro (6.5-7.5 jours p-i). Lorsque les souris ont été infectées par voie IC, les signes cliniques et les profils de mortalité ont été comparables pour les deux virus (tableau 16B), même si une différence significative des taux de mortalité pour une dose inoculée de 1 MOI a été identifiée (à cette dose d'inoculation, les temps de survie et le délai d'apparition des premiers symptômes à savoir la perte de poids étaient similaires). Cependant, les souris infectées par le virus mutant Thr sont mortes plus tardivement (7, 7 et 11 jours p-i, temps de survie moyen de 8.3) alors que les souris infectées par WT Pro meurent massivement entre le jour 7 et 8 p-i (temps de survie moyen de 7.4 jours).

Le potentiel neuro-invasif du virus WT Pro apparaît plus élevé que celui du virus mutant Thr dans mon étude sur modèle murin, alors que la neurovirulence de ces deux souches est comparable. Les essais ont été réalisés deux fois de manière indépendante.

A .IP

Doses (PFU)	Mortalité		Temps de survie moyen (jpi)		Début de la perte de poids (jpi)	
	WT Pro	Mut Thr	WT Pro	Mut Thr	WT Pro	Mut Thr
0.1	20% (1/5)	0% (0/5)	9.0 ± 0.0	NA	7.0 ± 0.0	NA
1	40% (2/5)	20% (1/5)	10.0 ± 2.8	17.0 ± 0.0	7.5 ± 0.7	11.0 ± 0.0
10	100% (4/4) —*	0% (0/5)	8.7 ± 0.9	NA	6.5 ± 0.6	NA
10 ²	75% (3/4) —* *	0% (0/5)	9.0 ± 0.0	NA	7.0 ± 0.0	12.0 ± 0.0

B .IC

Doses (PFU)	Mortalité		Temps de survie moyen (jpi)		Début de la perte de poids (jpi)	
	WT Pro	Mut Thr	WT Pro	Mut Thr	WT Pro	Mut Thr
0.01	0% (0/5)	0% (0/5)	N.A	N.A	N.A	N.A
0.1	20% (1/5)	20% (1/5)	8.0 ± 0.0	17.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	11.0 ± 0.0
1	100% (5/5) —*	60% (3/5)	7.4 ± 0.5	8.3 ± 2.3	6.2 ± 0.4	6.6 ± 0.9

Tableau 16 : Maladie clinique chez des souris Balb/cByJ âgées de 5 semaines infectées par les virus WT Pro et mutant Thr (mut Thr) via la voie IP (A) ou la voie IC (B).

Les valeurs indiquent le nombre moyen de jours post inoculation (jpi) ± ET (écart type). Le nombre de souris symptomatique est indiqué entre parenthèses. N.A : Non Applicable, en raison de la perte de poids ou l'absence de mortalité. Analyse statistique : courbe de survie (mortalité), * pour p<0.05 et ** pour p<0.01. Les essais ont été réalisés deux fois de manière indépendante.

ii. Virémie des souris

La virémie moyenne a été estimée à J4 p-i par quantification de l'ARN viral dans les prélèvements sanguins (qRT-PCR 3'NC). Celle-ci était significativement plus élevée (p <0,05) dans les groupes WT Pro 10 et 100 PFU IP que dans les groupes mutant Thr respectifs, et un pic de virémie a été mesuré pour une dose d'inoculation de 10 PFU de WT Pro par voie IP (figure 27). Aucune virémie n'a été détectée dans les groupes WT Pro et mutant Thr 0,1 PFU IP.

Chez les souris infectées par 1 PFU de virus par voie IC, la virémie a été détectée avec un niveau significativement plus élevé ($p < 0,05$) dans le groupe WT Pro que dans le groupe mutant Thr. Les différences observées dans les taux de virémie entre les groupes WT Pro et mutant Thr se sont traduites par des différences dans l'induction de l'immunité innée, telle que déterminée par la mesure de l'interféron alpha sérique (IFN- α) avec le kit ELISA de détection de l'IFN alpha murin (Mouse IFN Alpha ELISA Kit ; PBL Assay Science) (données non montrées). L'IFN- α n'était pas détectable dans les groupes infectés avec les doses de 0,1 et 1 PFU IP de virus aux jours 2 et 7 post-infection. Un pic a été mesuré pour le groupe 10 PFU IP WT Pro à ces deux dates alors que les niveaux d'IFN- α étaient plus faibles pour la dose d'inoculation de 100 PFU (virémie plus faible également, voir figure 27A). Les taux d'IFN- α étaient globalement plus faibles au jour 7 p-i qu'au jour 2 p-i pour les groupes WT Pro. Les niveaux d'IFN- α n'étaient pas détectables pour aucun groupe d'infection aux jours 2 et 7 p-i pour les souris infectées par le virus mutant Thr.

La multiplication périphérique, mesurée au pic de virémie, apparaît plus élevée pour le virus WT Pro que pour le mutant Thr.

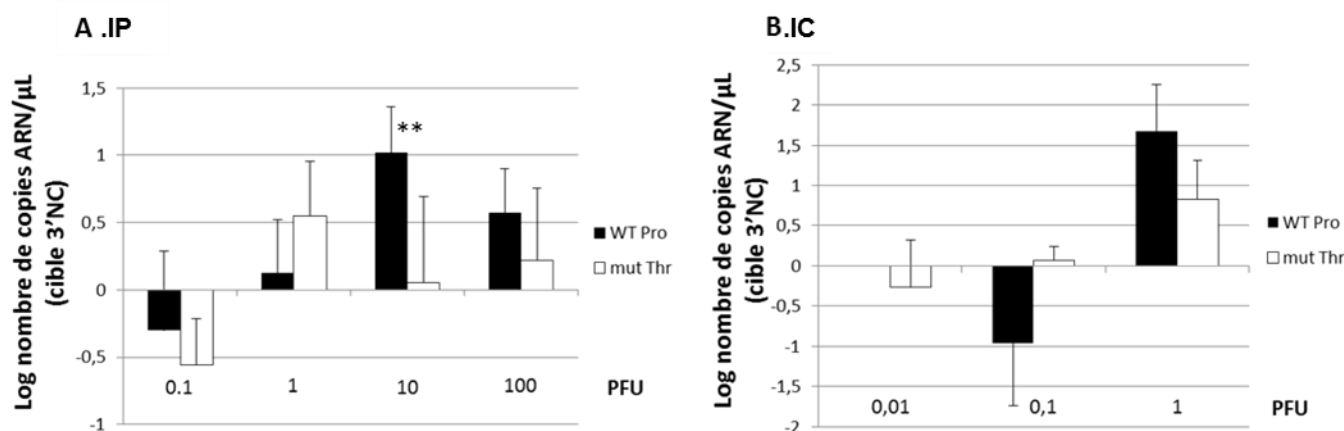


Figure 27 : Charge virale moyenne par µl d'ARN extrait dans des sérums à 4 jpi chez des souris Balb/cByJ infectées par 0.1, 1, 10 ou 100 PFU via la voie IP (A) et 0.01, 0.1 ou 1 PFU via la voie IC (B), soit avec le virus WT Pro (barres noires) soit avec le mutant Thr (mut Thr) (barres blanches) estimé par qRT-PCR spécifique de la région 3'NC.

Un prélèvement rétro-orbital a été effectué. Chaque point représente la moyenne des cinq souris échantillonnées par groupe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type ** : $p < 0.01$ pour WT Pro vs mutant Thr à la même dose d'infection.

iii. Détermination des charges virales dans les cerveaux des souris décédées post-infection

L'ARN viral a été détecté dans les cerveaux de tous les animaux morts infectés par voie IP ou IC sans différence significative entre les virus WT Pro et mutants Thr (figure 28).

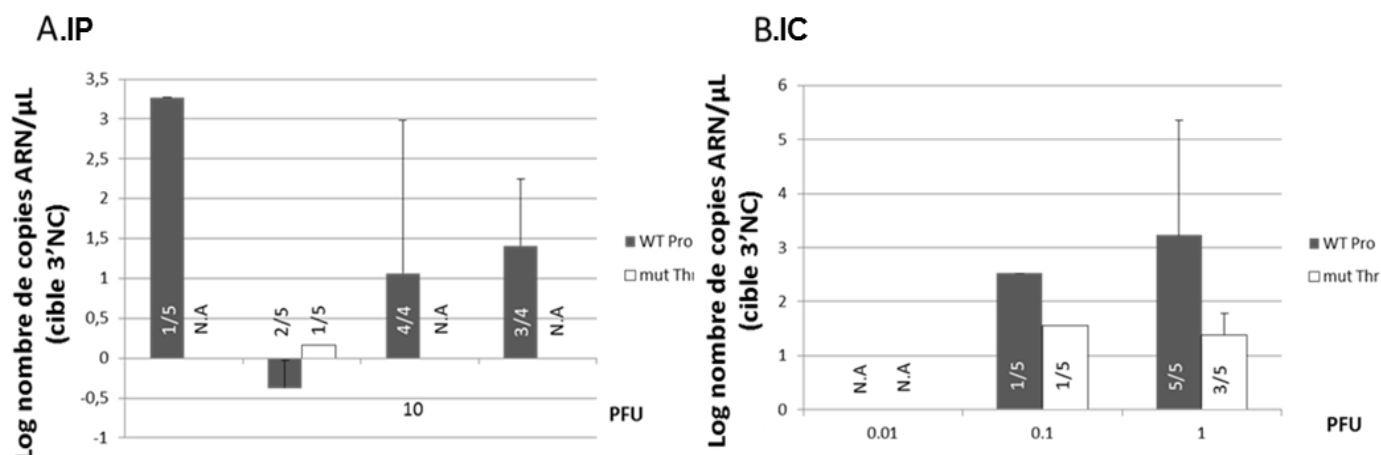


Figure 28 : Charge virale moyenne par μ l d'ARN extrait de cerveaux de souris Balb/cByJ femelles infectées par 0.1, 1, 10 ou 100 PFU via la voie IP (A) et par 0.01, 0.1 ou 1 PFU via la voie IC (B) de WT Pro (barres noires) ou mut Thr (barres blanches) telle qu'estimée par qRT-PCR spécifique de la région 3'NC.

Une moitié du système nerveux central a été prélevée pour analyse RT-qPCR en post-mortem sur les souris mortes dans chaque groupe. Les histogrammes représentent la moyenne des souris échantillonnées par groupe. Les barres d'erreur représentent l'écart type. Le nombre d'échantillons examinés est indiqué au sein des histogrammes. N.A : non applicable.

Tous les animaux survivants ont été testés pour la présence d'IgG anti-VWN 18 jours p-i (Tableau 17) (données non représentées). Les animaux dans les groupes 1 PFU IC étaient tous positifs. Tous les animaux survivants dans les groupes 0,01 et 0,1 PFU IC étaient négatifs à l'exception d'une souris dans le groupe mutant Thr, ce qui est compatible avec l'effet de dilution des inoculums. Toutes les souris survivantes par voie IP avec 1, 10 ou 100 PFU du virus mutant Thr étaient IgG positives, alors que toutes les souris du groupe 0,1 PFU étaient négatives, en raison d'une probabilité plus faible d'infection à cette faible dose. Deux souris survivantes, l'une dans le groupe 10 PFU et l'autre dans le groupe 100 PFU WT Pro étaient IgG négatives et ont été ensuite extraites de l'analyse des données de l'expérience (infection non productive des souris correspondantes). La deuxième souris survivante dans le groupe infecté par 100 PFU WT Pro était IgG positive. Les souris survivantes dans les groupes 0,1 et 1 PFU WT Pro étaient IgG négatives. Les groupes de contrôle PBS étaient tous IgG négatifs, comme attendu.

WT Pro					Mut Thr				
Dose infectante (PFU/mL)	Mortalité	Nombre de survivantes	ELISA IgG		Dose infectante (PFU/mL)	Mortalité	Nombre de survivantes	ELISA IgG	
PBS	0/4	4	Négatif	4	PBS	0/4	4	Négatif	4
			Positif	0				Positif	0
0.1	1/5	4	Négatif	4	0.1	0/5	5	Négatif	5
			Positif	0				Positif	0
1	2/5	3	Négatif	3	1	1/5	4	Négatif	0
			Positif	0				Positif	4
10	4/5	1	Négatif	1	10	0/5	5	Négatif	0
			Positif	0				Positif	5
100	3/5	2	Négatif	1	100	0/5	5	Négatif	0
			Positif	1				Positif	5

Tableau 17 : synthèse des résultats des ELISA IgG West Nile (ID Screen West Nile competition (IdVet)) réalisés à J18 post infection sur les souris inoculées avec les virus WT Pro et Mutant Thr par voie IP et ayant survécu.

Les souris survivantes ont subi une seconde injection avec 10^4 PFU du virus sauvage IS-98-ST1 au jour 21 p-i, afin de déterminer si une infection atténuée par le mutant Thr pouvait conférer une immunité croisée et une protection contre la souche sauvage hautement virulente IS-98-ST1. Les souris IgG négatives, y compris celles du groupe témoin de PBS, sont mortes de l'infection, alors que toutes les souris IgG positives ont survécu à l'infection lors de l'épreuve (figure29).

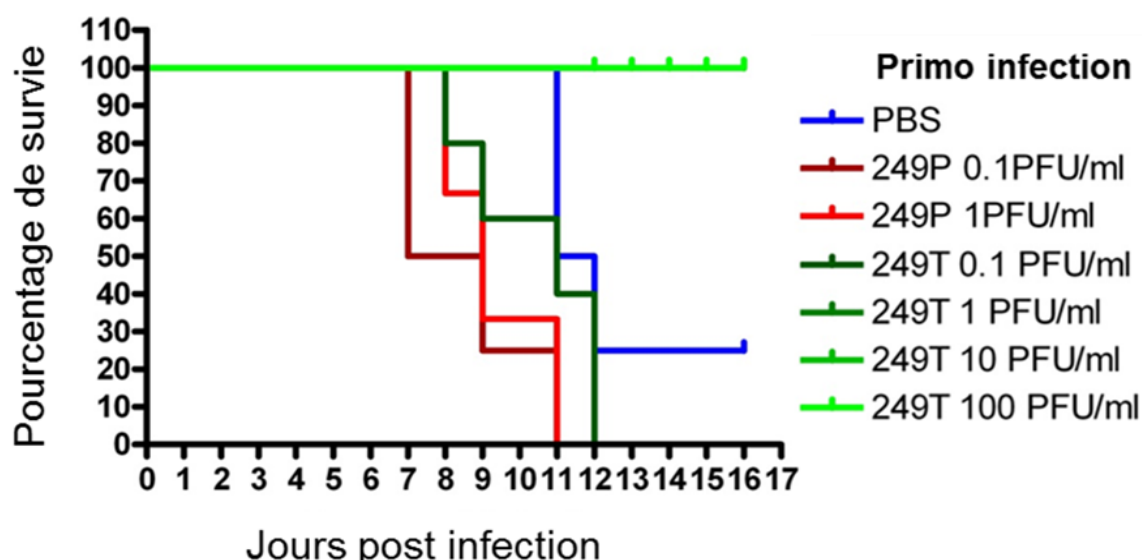


Figure 29 : Courbes de survie sur 16 jours de la population de souris survivantes après primo infection avec les virus WT Pro et Mut Thr et éprouvée 21 jours p.i avec 10^4 PFU du virus sauvage IS-98-ST1.

En conclusion de cette section, la multiplication du virus West Nile au sein du SNC ne semble pas être modulée par la mutation NS3 P249T. De plus, l'infection par le mutant Thr atténué protège contre une infection homologue par la souche sauvage hautement virulente IS-98-ST1 (principe du vaccin vivant atténué).

b. Virulence des virus chimères Is98/It08 en modèle murin

i. Suivi de mortalité des souris

La mortalité des souris dans les différents groupes éprouvés par voie intra péritonéale par les virus Is98, It08, Chimères 3 et 4 a été comparée (tableau 18). Toutes les souris inoculées aux doses de 10 et 100 PFU sont mortes entre 8 et 10.6 jours post-infection, à l'exception d'une souris dans le groupe Is98 100 PFU, de la chimère 3 10 PFU et de la chimère 4 10 PFU. Par contre, alors que 100% des souris inoculées avec 1 PFU d'Is98 mouraient, seulement une fraction de souris inoculées avec les trois autres virus mouraient avec la même dose d'inoculation. L'absence d'un groupe sans mortalité de souris (inoculé avec une dose inférieure de virus) ne nous permet pas de calculer précisément la dose létale 50 des différents virus étudiés ; cependant cette DL_{50} semble légèrement inférieure pour Is98. Les tests statistiques appliqués à la courbe de survie des souris (Test de Wilcoxon, GraphPad Prism) n'ont pas permis de montrer de différence significative entre les souches de virus testés (données non montrées). Les temps de survie moyens peuvent également être comparés (tableau 18). Leur analyse ne permet pas de mettre en évidence de différences de virulence en fonction des souches (différence non significative statistiquement).

Virus	Doses	Mortalité	Temps moyen de survie	DL_{50}
Is98	1	100%	$9,0 \pm 0,6$	≤ 1
	10	100%	$10,6 \pm 1,7$	≤ 1
	100	80%	$8,5 \pm 0,8$	≤ 1
It08	1	60%	$8,3 \pm 0,9$	≈ 1
	10	100%	$8,4 \pm 1$	≈ 1
	100	100%	$8,0 \pm 1$	≈ 1
Chimère 3	1	40%	$8,0 \pm 0$	≈ 1
	10	80%	$8,3 \pm 0,4$	≈ 1
	100	100%	$8,2 \pm 0,7$	≈ 1
Chimère 4	1	60%	$9,0 \pm 0,8$	≈ 1
	10	80%	$8,8 \pm 0,7$	≈ 1
	100	100%	$8,6 \pm 0,7$	≈ 1

Tableau 18 : virulence des virus Is98, It08, Chimères 3 et 4 chez la souris Balb/cByJ.

La virulence est ici évaluée via le taux de mortalité (population morte/population totale).

DL_{50} : Dose létale 50, correspond à la dose provoquant la mort de 50% de l'effectif

ii. Evaluation des capacités répliquatives périphériques et centrale

Le suivi de la mortalité des souris post-infection ne nous a pas permis d'observer de différence significative de virulence entre les virus. La virémie des souris 3 jours post-infection (au pic

habituel de virémie) a été quantifié par RT-qPCR afin de mesurer les capacités répliquatives des différents virus dans les tissus périphériques (figure 30).

La virémie des deux groupes témoins PBS et surnageant cellulaire non infecté est bien nulle, comme attendu, signant l'absence de contamination lors de la réalisation des prélèvements, extractions ou assemblages de RT-qPCR. Les virémies sont assez faibles, comme attendu chez un hôte mammifère. Elles sont inférieures à $2,2 \times 10^4$ copies d'ARN viral/mL de sang, soit très en dessous de la quantité nécessaire pour infecter un moustique naïf, qui est de l'ordre de 10^5 PFU/mL de sang. Il y a une grande variabilité entre les souris et les analyses statistiques ne permettent pas de démontrer de différence significative dans la virémie en fonction des virus utilisés (test 1way ANOVA, Graph Pad Prism). Pour la souche Is98 et la chimère 3, il semblerait que les plus petites doses de virus inoculées entraînent les virémies les plus élevées. En effet les souris infectées par Is98 à 1 PFU présentent une virémie moyenne de $2,2 \times 10^4$ copies/mL de sang, ceux des souris inoculées avec Is98 à 10 PFU ont un nombre de copies moyen de $3,5 \times 10^3$ copies/mL et les souris éprouvées avec Is98 à 100 PFU ont un nombre de copies moyen de $2,9 \times 10^3$ copies/mL.

De même les souris ayant été infectées avec le virus chimère 3 aux doses de 1, 10, et 100 PFU ont des nombres de copies moyens respectivement de $1,5 \times 10^4$ copies/mL, $6,4 \times 10^3$ copies/mL et $5,6 \times 10^3$ copies/mL.

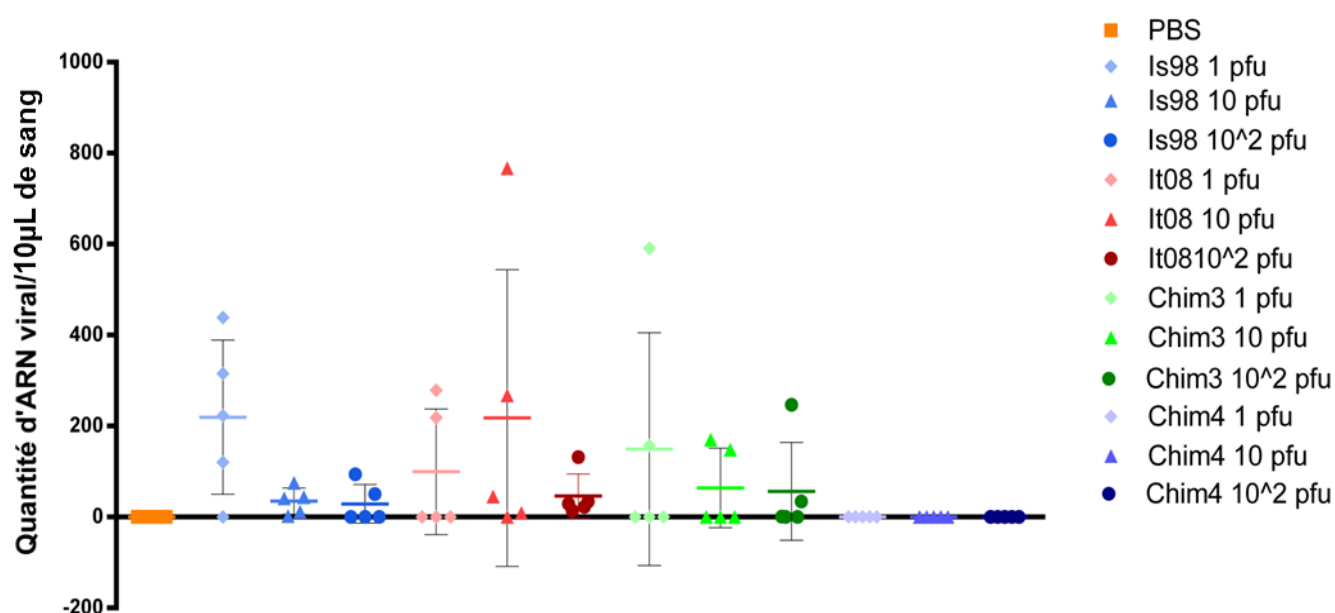


Figure 30 : Virémie dans le sang des souris infectées avec les virus Is98, It08, chimères 3 et 4 à des doses de 1, 10 ou 100 PFU et des groupes témoins (PBS et Témoin négatif), mesurée par RT-qPCR.

Un prélèvement rétro-orbital a été effectué à 3 jours post-infection. Chaque point représente une souris échantillonnée. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Afin d'analyser les capacités neuro-invasives des différents virus testés et de montrer l'implication de l'infection virale dans le décès des souris de manière directe ou indirecte, une analyse par RT-qPCR des cerveaux de ces souris a été réalisée (figure 31).

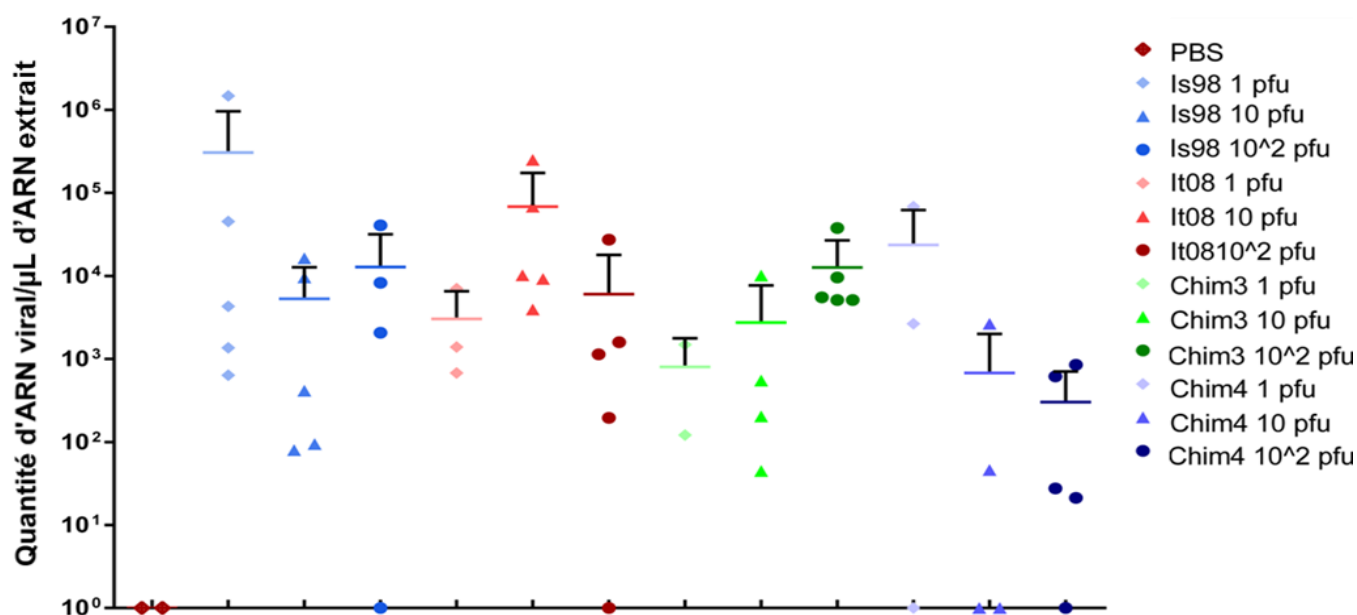


Figure 31 : Quantification par RT-qPCR des charges virales dans les cerveaux des souris décédées suites à l'infection par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4 à des doses de 1, 10 ou 100 PFU.

Une moitié du système nerveux central a été prélevée pour analyse RT-qPCR en post-mortem sur la totalité des souris de chaque groupe. Chaque point représente une souris échantillonnée. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Comme attendu les groupes témoins ne présentent pas d'ARN viral dans leurs prélèvements d'encéphale. Du virus a été retrouvé dans le système nerveux central de toutes les souris mortes à quelques exceptions près. En effet la chimère 3 à 1 PFU et la chimère 4 à 10 et 100 PFU présentent des charges virales a priori trop faibles pour être détectées. On pourrait questionner la qualité des prélèvements de cerveau réalisés mais le signal obtenu en RT-qPCR β actine était comparable aux autres prélèvements effectués. Les souris infectées avec ces virus finissent par décéder malgré des quantités virales faibles dans leurs cerveaux.

Un effet dose sur la quantité d'ARN viraux dans le SNC a pu être observé avec les groupes inoculés avec les virus Is98 et Chimère 3. Plus la dose d'inoculation était élevée, plus la quantité d'ARN viral dans le cerveau était importante. Pour les souris infectées avec le virus Is98, les charges virales relevées étaient de $5,3 \times 10^3$ copies/ μ L et de $3,1 \times 10^4$ copies/ μ L respectivement pour les doses 10 et 100 PFU (les résultats pour la dose de 1 PFU ne sont pas exploitables). Pour la Chimère 3, le même phénomène est observé avec un nombre de copies virales pour les doses de 1, 10, 100 PFU respectivement égal à $2,7 \times 10^3$ copies/ μ L, $1,3 \times 10^4$ copies/ μ L et de $2,4 \times 10^4$ copies/ μ L.

Les quantités d'ARN viral pour les virus Is98 et Chimère3 sont très proches si une comparaison dose à dose est réalisée. Pour la souche It08, un tel effet dose ne peut pas être démontré, de fortes valeurs de charge virale dans le cerveau des souris inoculées avec 10 PFU de virus perturbant l'analyse.

Les charges virales détectées dans l'encéphale des souris post-infection sont très variables, les analyses statistiques ne permettent donc pas de démontrer de différence significative en fonction

des virus utilisés (test 1 Way ANOVA, GraphPad Prism). De même que pour la virémie, les souris inoculées avec les doses de 1, 10 et 100 PFU de la Chimère 4 présentent un nombre de copies d'ARN viral inférieur au seuil de détection de la technique de RT-qPCR.

En conclusion des analyses des paramètres cliniques et virologiques chez les souris inoculées par les souches parentales Is98 et It08 et les chimères Is98/It08 3 et 4, des virulences comparables de ces 4 souches sont observées en modèle murin, alors même que le virus Chimère 4 semble présenter un défaut de réplication périphérique (absence de virémie à J3 post-infection mais il n'a pas été possible avec le plan expérimental suivi d'identifier si le virus Chimère 4 était responsable d'une virémie retardée) et centrale (au sein du système nerveux central).

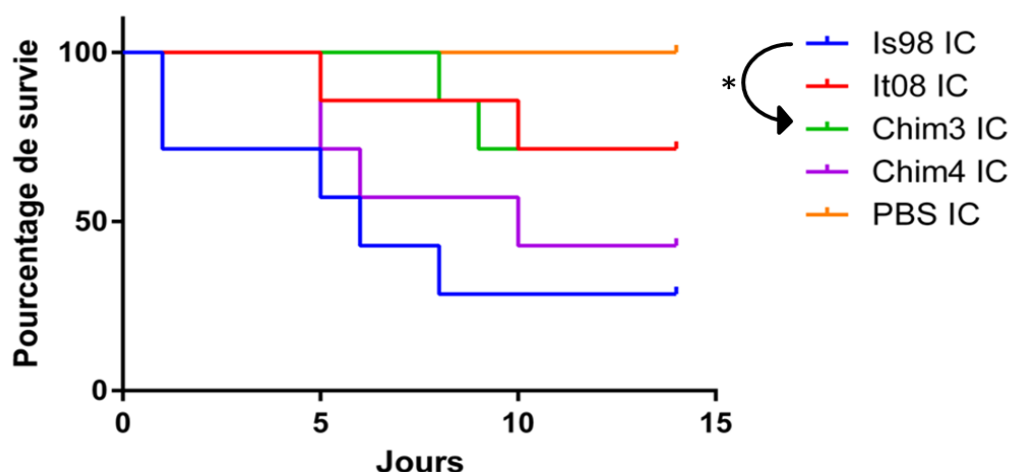
c. Résultats des expérimentations menées sur modèle aviaire pour l'étude des chimères Is98/It08

i. Suivi de mortalité des poulets SPF infectés à 10^3 TCID₅₀:

Des différences de virulence entre les souches parentales Is98 et It08 n'ont été identifiées que chez les hôtes aviaires, et ont été reproduites dans le modèle de poulet SPF de 1J développé par l'unité de Bénédicte Lambrecht au CERVA CODA (124). J'ai donc souhaité évaluer les déterminants de virulence du VWN par comparaison des paramètres cliniques, virologiques et sérologiques chez l'hôte aviaire modèle, les poussins SPF de 1J. La mortalité des poussins SPF dans les différents groupes éprouvés par voie intracrânienne (IC) et sous-cutanée (SC) a été comparée. On peut observer une différence statistiquement significative entre les différentes courbes de survie des poussins infectés par injection intracrânienne (figure 32A).

Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les courbes de survies des poussins infectés par injection par voie sous-cutanée (figure 32B).

A. Courbes de survies des poussins infecté par IC



B. Courbes de survies des poussins infecté par SC

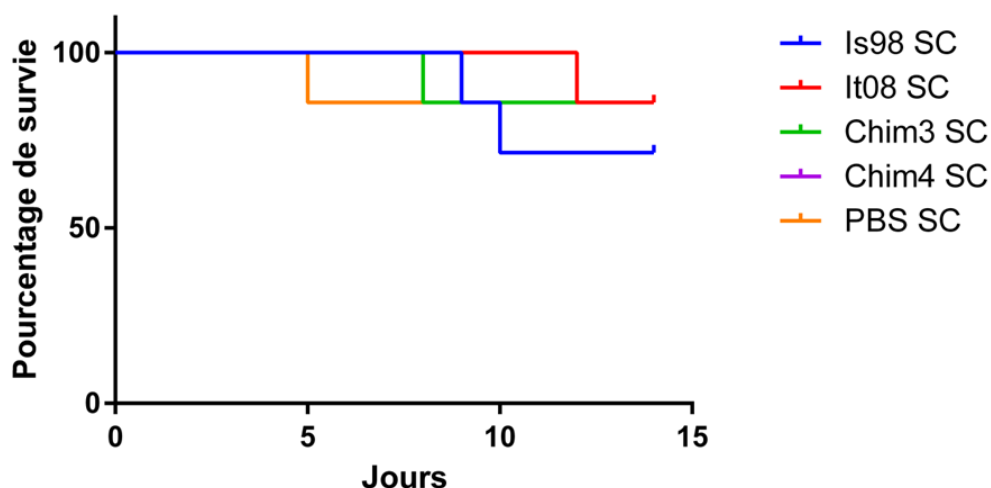


Figure 32 : Courbes de survie sur 14 jours de la population de poulets SPF de 1J infectés par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4

(A) Infectés par voie intra crânienne (IC)

(B) Infectés par voie sous-cutanée (SC)

Virus/Voie Inoculation	Mortalité	Temps moyen de survie (jours)
Is98 IC	71% (5/7)	4.2 ± 2.4
It08 IC	29% (2/7)	7.5 ± 2.5
Chim3 IC	29% (2/7)	8.5 ± 0.5
Chim4 IC	57% (4/7)	6.5 ± 1.9
Is98 SC	29% (2/7)	9.5 ± 0.5
It08 SC	14% (1/7)	12.0 ± 0.0
Chim3 SC	14% (1/7)	8.0 ± 0.0
Chim4 SC	14% (1/7)	9.0 ± 0.0

Tableau 19 : virulence des virus Is98, It08, Chimères 3 et 4 chez le poulet SPF de 1J.

La virulence est ici évaluée via le taux de mortalité (population morte/population totale).

Aucun groupe n'a présenté 100% de mortalité après infection, ce qui peut être lié à la dose inoculée, la résistance de l'hôte ou la présence d'animaux non répondeurs dans l'effectif.

Comme attendu, aucune mortalité n'a été observée dans la population du groupe PBS qui servait de contrôle négatif. Conformément à nos attentes, de très fortes mortalités ont été observées dans la population du groupe infecté avec Is98 (témoin positif, forte sensibilité du modèle aviaire à l'infection par cette souche) avec un pic de mortalité à J1 post-infection et 71% de l'effectif mort pendant le suivi clinique durant 14 jours post-infection.

De faibles mortalités ont été observées dans la population du groupe infecté avec It08 (témoin positif, faible sensibilité à l'infection virale avec cette souche visualisée dans les expériences précédentes) avec un pic de mortalité à J5 et un autre à J10 post infection. 29% de l'effectif est décédé durant les 14 jours post-infection suivis. Les courbes de survie pour les poussins inoculés avec It08 et la chimère 3 sont comparables, alors que la courbe de survie des poussins inoculés avec la chimère 4 est très proche de celle du groupe infecté par Is98.

La chimère 4 présente une virulence comparable à celle d'Is98 au contraire de la chimère 3 dont la virulence est diminuée et quasi identique à celle d'It08. Les résultats de l'expérimentation montrent que la voie IC est la voie préférentielle pour comparer la virulence de différentes souches du VWN et identifier les déterminants de virulence. Cette voie d'infection a permis de mettre en évidence des similitudes sur les taux de mortalités entre Is98 et chimère 4 et entre It08 et chimère 3 sur les 14 jours de l'épreuve

Les sérums des survivants de l'épreuve à J14 p.i ont été testés en ELISA compétition WN (ID-SCREEN WEST NILE COMPETITION®, ID-VET), et les résultats correspondants sont résumés dans le tableau 20.

Virus	Is98	It08	Ch3	Ch4
Séroconversion IC	1/2 (50%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)	1/3 (33%)
Séroconversion SC	4/5 (80%)	1/6 (17%)	3/6 (50%)	2/6 (33%)

Tableau 20 : Séroconversion des survivants à J14 p.i

La chimère 4 se montre peu immunogène quelle que soit la voie d'inoculation considérée (33% de séroconversion après inoculations IC et SC) alors que des taux de séroconversion plus élevés sont observés dans les groupes inoculés avec la Chimère 3 et la souche Is98. La souche It08 voit son immunogénicité varier énormément selon la voie d'inoculation (bien supérieure, de 43% et comparable aux données pour Is98 et Chimère 3 lors d'inoculation IC).

ii. Evaluation des capacités répliquatives périphériques et centrale

J'ai voulu évaluer les capacités répliquatives des différentes constructions, pour cela j'ai mesuré la quantité d'ARN viral dans le sang, les plumes et l'encéphale.

Après extraction et quantification des ARN viraux par RT-qPCR, les résultats obtenus sont résumés dans la figure 33. Comme attendu, le groupe témoin PBS par voie IC et SC ne présente pas d'ARN viral, et signe l'absence de contamination lors de la réalisation des prélèvements, extractions ou assemblages lors de la RT-qPCR.

Evaluation de la virémie à J3 post-infection : les résultats obtenus sur les prélèvements sanguins effectués à J3 post-infection sont résumés dans la figure 33A.

Les groupes infectés avec les différentes constructions VWN présentent une virémie, dont la moyenne varie entre 2×10^3 copies/5 μ L d'ARN pour Is98 par voie IC et 5×10^4 copies/5 μ L d'ARN pour Is98 par voie SC. Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la virémie entre groupes ou selon la voie d'inoculation choisie, malgré l'observation d'une virémie légèrement plus faible dans les groupes It08 et Chimère 3 inoculés par voie SC. Il est possible que le prélèvement de sang soit intervenu avec un décalage par rapport au pic de virémie effectif (prélèvement à J3, au pic de virémie théorique) ce qui nous empêche d'objectiver une différence significative, à moins que les différences de virulence ne soient pas dues à un effet de la multiplication périphérique du virus.

Suivi du virus dans les follicules plumeux à J3 post-infection : les résultats obtenus sont résumés dans la figure 33B.

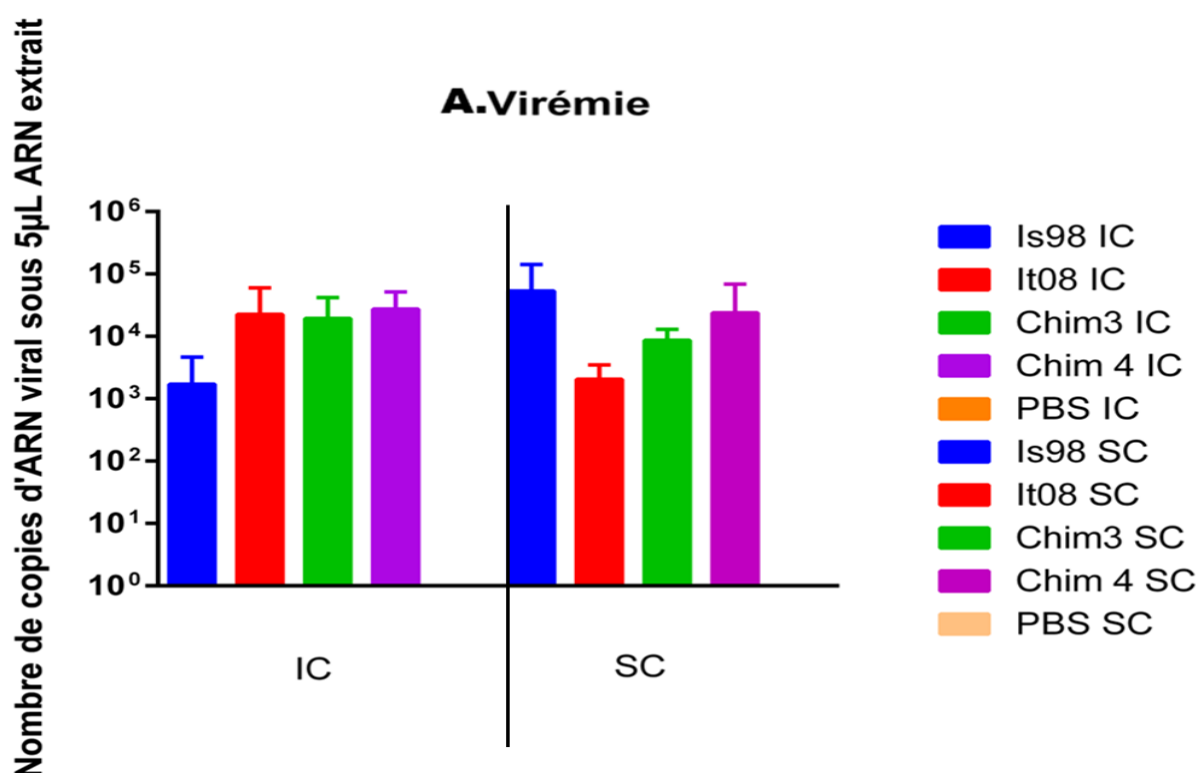
Le nombre (N) de copies d'ARN viral retrouvées dans les broyats peut être décrit comme suit : N It08 IC < N Chim3 IC < N Chim4 IC = N Is98 IC. Ces différences ne sont pas statistiquement significatives. On ne peut donc pas conclure à une différence dans la distribution périphérique des souches de VWN testées même si les différences que l'on observe vont dans le sens des résultats obtenus sur les niveaux de virulence, en pourcentage de survie, suite à une inoculation par voie IC.

Les résultats du groupe SC, sont beaucoup plus faibles et semblent indiquer que cette voie d'inoculation ne permet pas une multiplication périphérique satisfaisante du VWN. On observe cependant que seul les ARN des souches IS98 et la chimère 4 sont retrouvés dans les follicules plumeux.

Suivi du virus dans l'encéphale des poussins décédés : les résultats obtenus sont résumés dans la figure 33C.

Graphiquement, les mêmes profils dans les quantifications obtenues par RT-PCR quantitative sur les follicules plumeux et l'encéphale sont observés.

Il semblerait à première vue que le nombre de copies quantifiées soit impacté par la nature de l'échange génomique entre Is98 et It08, avec les poussins inoculés avec Is98 et la chimère 4 présentant une charge virale plus élevée dans l'encéphale que ceux infectés avec It08 ou la chimère 3, ce qui pourrait traduire une modification du pouvoir de franchissement de la barrière hémato encéphalique. Une différence entre le nombre de copies d'ARN viral dans le cerveau des poussins infectés avec la chimère 3 et la chimère 4 va dans le sens de l'observation faite lors des suivis de mortalité où l'on retrouve aussi des similitudes sur les taux de mortalités entre Is98 et chimère 4 et entre It08 et chimère 3 (cf. Suivre de mortalités des poulets SPF infectés à 10^3 TCID₅₀ par voie IC). Les paramètres virologiques mesurés à partir des prélèvements des follicules plumeux et du système nerveux central suggèrent une distribution périphérique et centrale plus limitée des virus It08 et chimère 3, même si les différences observées ne sont pas significatives.



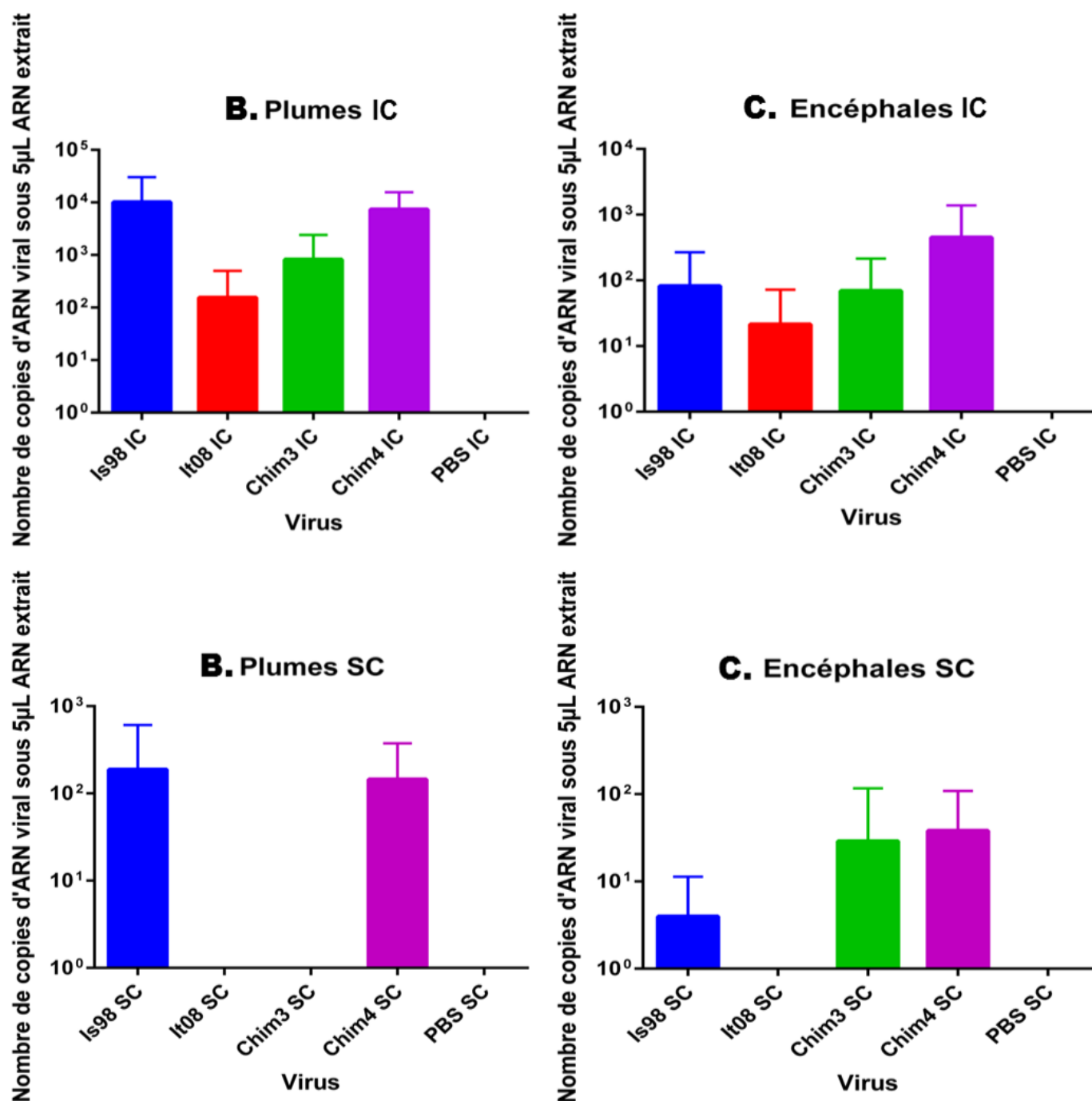


Figure 33 : Résultats de la quantification de l'ARN viral par RT-qPCR post-infection par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4 chez les poussins SPF de 1J selon la voie d'inoculation (Intra crânienne (IC) ou sous-cutanée (SC)).

(A) Virémie à 3 jours post-infection : Un prélèvement nécessitant le sacrifice des individus a été effectué à 3 jours post-infection. Chaque point représente la moyenne des trois poulets échantillonnés par groupe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

(B) Dans les follicules plumeux à J3 post-infection : Un prélèvement de follicules plumeux (3) a été effectué à 3 jours post-infection. Chaque point représente la moyenne des cinq poulets échantillonnés par groupe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

(C) Dans l'encéphale des poulets de 1 jour décédés suite à l'infection : Un prélèvement de l'encéphale a été effectué post mortem sur chaque poulets. Chaque point représente la moyenne des dix poulets du groupe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

iii. Suivi du virus dans les écouvillons oraux

J'ai souhaité mesurer le niveau d'excrétion orale des différents virus. Après extraction et RT-qPCR sur les écouvillons oraux récupérés, les résultats obtenus sont les suivants (figure 34):

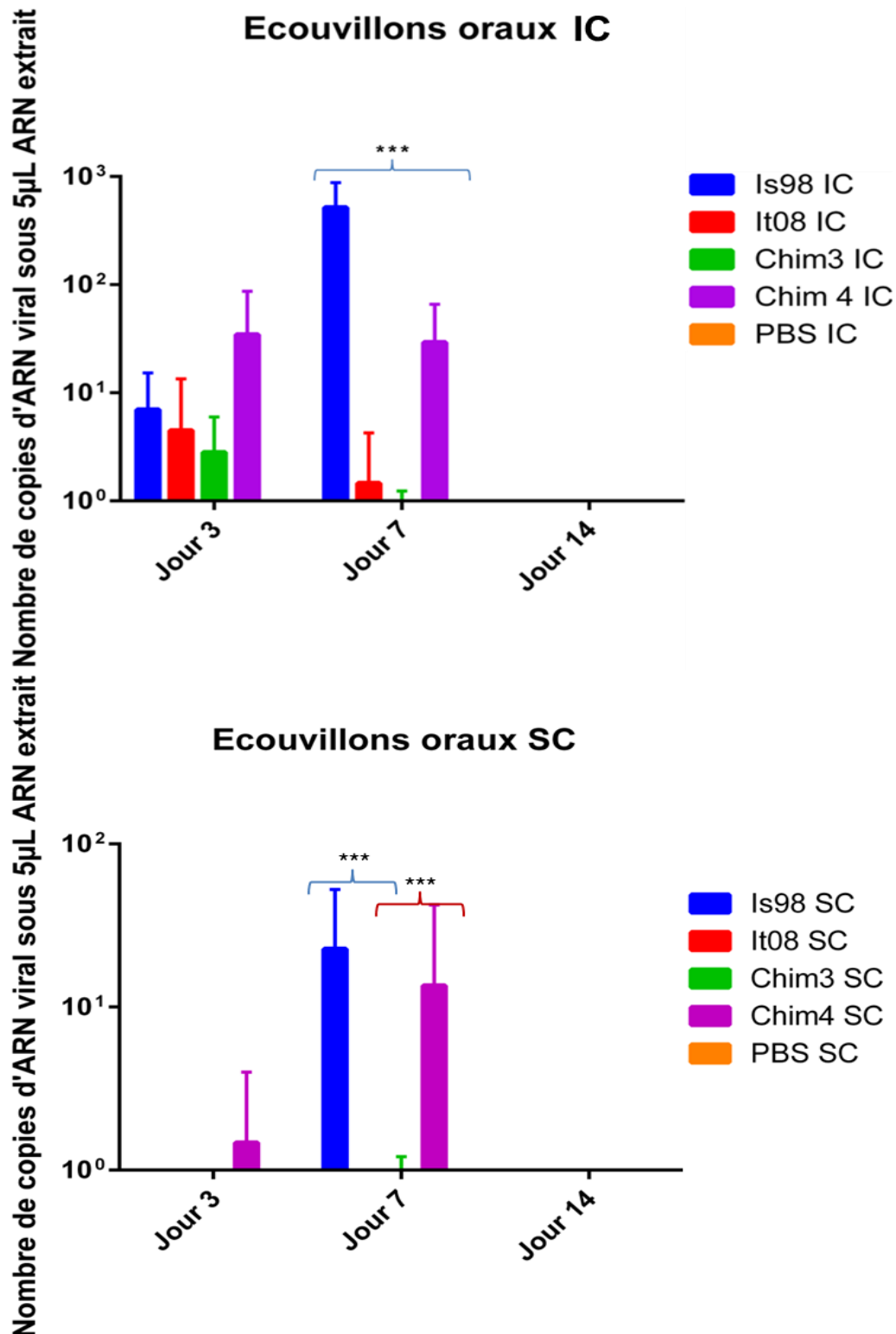


Figure 34 : Quantification virale par RT-qPCR dans les écouvillons oraux réalisés à 3, 7 et 14 jours post infection par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4 sur les poulets SPF de 1J infectés par voie intra crânienne (IC) ou sous-cutanée (SC).

Des écouvillonnages oraux ont été effectués à 3,7 et 14 jours post-infection. Chaque point représente la moyenne des poulets survivants sur les cinq poulets désignés par groupe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. *** : $p < 0.005$

Comme attendu, aucun signal PCR n'a été détecté dans les groupes témoin PBS, ce qui signe l'absence de contamination lors de la réalisation des prélèvements, extractions ou assemblages lors de la RT-qPCR.

A J3 post-infection, il n'y a pas de différence statistiquement significative, mais les mêmes profils sont observés que dans les quantifications obtenues sur les follicules plumeux et l'encéphale. A J7 post-infection, le profil est maintenu mais avec un niveau de copies d'Is98 significativement supérieur à celui de la chimère 4, elle-même significativement supérieure à celle d'It08. Le nombre de copies de la chimère 3 dans les écouvillons oraux à J7 post infection est quasi nul. A J14 post-infection, aucune quantification n'a été possible.

Les charges virales dans les écouvillons oraux du groupe SC sont plus faibles et semblent indiquer que cette voie d'inoculation ne permet pas une bonne différenciation de la virulence des souches européennes ou méditerranéennes du VWN dans le modèle poussin de 1J.

Discussion

L'objectif de mon projet était d'étudier les déterminants de virulence de souches méditerranéennes du virus West Nile à partir de productions virales disponibles au laboratoire (deux isolats naturels, Is98 et It08, présentant des différences de virulence chez l'hôte aviaire (121)). Pour ce faire, un clone infectieux du virus West Nile ayant circulé dans le bassin méditerranéen en 1998 a été utilisé comme virus de référence (IS-98-ST1 (GenBank : AF481864)). Ce virus est connu comme étant particulièrement pathogène chez l'hôte aviaire réservoir et a été associé à d'importants épisodes de mortalité dans l'avifaune sauvage (cigognes,...) et domestique (oies) en Israël. Un autre virus référent de lignage 1 (sous-groupe différent) ayant également circulé dans le bassin méditerranéen a été utilisé : Italie 2008, isolat 229892 (15803) (GenBank : FJ483549). Ce dernier isolat est moins virulent qu'Is98 chez l'oiseau (124).

Des chimères résultant d'échanges de fragments génomiques entre ces deux virus référents ont été générées : les virus chimères 3 et 4.

Nous avons rencontré des problèmes lors de la réalisation des clones infectieux nécessaires à ce projet, et de nombreux problèmes de stabilité de ce type de constructions sont rapportés dans la littérature (55, 170, 173, 175). D'autres auteurs ont fait état de problèmes de toxicité de NS1 en système procaryote (55, 172). Des problèmes de toxicité que j'ai également rencontrés. J'ai aussi observé lors des séquençages de nombreuses délétions. Ce qui m'a poussé à essayer des nouvelles méthodes pour la réalisation des constructions.

Ce sont des chimères dont une zone du génome d'Is98 a été remplacée par le génome d'It08, dans le cas de la chimère 3 il s'agit de la zone codant pour NS4A, NS4B et la partie 5' de NS5 alors que pour la chimère 4 il s'agit de la partie 3' de NS5 et d'un fragment de la partie 3'UTR du génome viral. Brault *et al.*, 2007 (85) ont démontré qu'un résidu de Proline à la position 249 de l'hélicase NS3 était responsable de la virulence de la souche NY99 382-99 chez les corbeaux américains (Figure11), tandis qu'une substitution de la Proline par un résidu Thréonine réduisait la virulence et la virogénèse chez cet hôte. Un mutant NS3 a été généré au laboratoire en se basant sur ces travaux, en remplaçant la Proline présente en position 249 de NS3 sur Is98 par un résidu Thréonine (mutant Thr) comme décrit dans le Matériel et Méthode.

Les comparaisons de virulence entre ces différentes souches de virus ont été effectuées grâce à des essais *in vitro* sur des cultures cellulaires et des essais *in vivo* d'expérimentation animale (infection dans un modèle murin et un modèle aviaire). Le test de plages de lyse a permis de montrer que les virus Is98, It08 et Chimère 3 ont un comportement réplcatif identique sur des cultures de cellules VERO. Par contre, les plages de lyse de la chimère 4 et du mutant Thr

étaient morphologiquement plus petites que celles des autres virus. Ceci pourrait s'expliquer par un défaut du virus dans ses étapes d'entrée dans la cellule ou d'exocytose ou dans son cycle de réplication à l'intérieur des cellules (mais la cinétique d'infection réalisée sur cellules VERO ne supporte pas cette dernière hypothèse). La formation de plages plus petites pour le mutant Thr par rapport au WT Pro a été corrélée avec des différences dans les charges virales mesurées dans les sérums de souris infectées 4 jours post infection, ainsi que dans les écouvillons oraux et les plumes des corneilles infectées, avec des quantités d'ARN WT Pro significativement plus élevées que les quantités d'ARN mutant Thr (données (Dridi *et al.*, 2017) non publiées).

Des résultats similaires ont été observés par l'équipe d'Ebel (188). Des variants individuels de taille de plages ont été isolés à partir d'une population génétiquement complexe, et des mutations conférant un phénotype à petite plaque ont été identifiées. Elles se localisent dans le domaine de l'hélicase ARN de la protéine NS3. Langevin *et al.*, (2014) (168) ont démontré que des activités variables d'hélicase et d'ATPase dépendent de mutations de NS3 en position 249. Cependant, ces différences n'étaient pas corrélées avec les phénotypes de virulence aviaire ou murine.

Langevin *et al.*(168) ont en effet montré expérimentalement que des mutations de NS3 en position 249 ne modulaient significativement la virulence du VWN que dans des modèles aviaires (le corbeau américain (très sensible) et le moineau domestique (moins sensible)) et non chez la souris (CD-1, Charles River). Nos résultats expérimentaux obtenus sur la mutation NS3 P249T sont comparables en modèle aviaire mais différents en modèle murin et je discuterai de ces aspects plus loin.

Une cinétique d'infection a été réalisée afin de voir s'il y avait des différences marquées entre les virus référents et les chimères produites en termes de réplication et s'il y avait un effet dose ou de temps sur la virulence et la réplication des virus sur des cellules VERO. Les résultats obtenus par RT-qPCR ont confirmé qu'il n'y avait pas de différence significative de réplication entre les différents virus, et ceci, quelle que soit la MOI testée. La cinétique de réplication des différents virus dans le temps a pu être précisée. Le nombre de copies d'ARN viral augmente au cours du temps avant d'arriver à saturation à J3 post-infection (données confirmées au cours des titrages). Ces résultats ne nous permettent pas de distinguer des différences entre les productions virales référentes et chimériques, et ne permettent pas d'observer un défaut à l'étape de la réplication virale de la chimère 4 ainsi que pour le mutant NS3 P249T.

Afin de compléter ces résultats, un titrage du virus dans les surnageants générés au cours de la cinétique d'infection des cellules VERO a été effectué. De petites différences de comportement, qui apparaissent statistiquement significative entre Is98 et les autres virus, ont pu être observées. Les chimères présentent une réplication plus proche du virus It08 que du virus Is98. Cependant, avant de pouvoir conclure sur l'impact des changements génomiques dans le

génomique d'Is98 sur la réplication en cellules VERO, de nouveaux essais d'infections cellulaires devront être réalisés.

Les expériences *in vivo* nous ont permis d'obtenir des différences plus marquées entre les chimères et les virus de référence produits. La virulence dépend d'un contexte génomique à la fois chez le virus et chez l'hôte. Pour le mutant NS3, nos résultats tendent à suggérer que la virulence est fortement impactée chez l'hôte murin (Balb/cByJ) par la présence du résidu Proline en position 249 sur le cadre de lecture de NS3 dans un contexte génomique Is98 plus global. Par contre la multiplication du virus West Nile au sein du SNC ne semble pas être modulée par cette même mutation. De plus, l'infection par le mutant Thr atténué protège contre une infection homologue par la souche sauvage hautement virulente IS-98-ST1 (principe du vaccin vivant atténué).

Pour les virus chimères, les courbes de survies en modèle murin ne nous ont pas permis de démontrer de différence significative entre les virus. En revanche, un effet dose a été observé avec les chimères et la souche It08: plus la dose d'inoculation est élevée, plus le taux de mortalité est élevé. De plus, le virus Is98 présente une DL_{50} légèrement inférieure aux autres virus dans un modèle murin d'infection. L'absence de virémie observée pour la chimère 4 corrélée à une mortalité comparable aux autres virus suggère un rôle indirect du virus dans la pathogénèse virale et l'existence d'une réponse inflammatoire délétère dans le SNC.

Une analyse plus poussée de l'infection murine avec la Chimère 4 (analyses histologiques,...) devrait permettre de comprendre l'importance de la réponse inflammatoire de l'hôte dans la pathogénèse de l'infection par le VWN.

Au contraire des courbes de survie en modèle murin, celles en modèle aviaire ont permis de démontrer des différences statistiquement significatives entre les différents virus. Des courbes de survie comparables ont été observées après infection des poussins SPF de 1J par voie IC respectivement entre le virus It08 et la chimère 3 et entre le virus Is98 et la chimère 4. Les taux de séroconversion observés chez les survivants à J14 sont très dépendants de la voie d'inoculation et pas forcément corrélés au taux de survie dans l'effectif observé.

Ces données indiquent une meilleure induction des réponses humorales pour It08 après inoculation IC et suggèrent une meilleure réplication périphérique et/ou centrale du VWN dans cette condition.

Dans ce modèle aviaire, nous n'avons pas pu démontrer de différence significative dans l'excrétion orale des virus à J3, alors qu'à J7, on observe une différence significative allant dans le sens des observations du suivi de mortalité, c'est-à-dire des similitudes de comportement

entre Is98 et chimère 4 (excrétion orale et charges virales périphériques élevées) et entre It08 et chimère 3 (charges virales dans les différents prélèvements effectués faibles).

Les virus chimère 3 et 4 sont tous deux des virus chimères entre Is98 et It08 dont la différence est la région du génome d'Is98 remplacée par It08 : dans le cas de la chimère 3, il s'agit de la région codant pour NS4A, NS4B et la partie 5' de NS5 ; alors que pour la chimère 4, il s'agit de la partie 3' de NS5 et de la partie 3'NC du génome viral. La chimère 4 présente une virulence comparable à celle d'Is98 au contraire de la chimère 3 dont la virulence est diminuée et quasi identique à celle d'It08. Les résultats de l'expérimentation montrent que la voie IC est la voie préférentielle pour comparer la virulence de différentes souches du VWN et identifier les déterminants de virulence. Cette voie d'infection a permis de mettre en évidence des similitudes sur les taux de mortalités entre Is98 et chimère 4 et entre It08 et chimère 3 sur les 14 jours de l'épreuve, suggérant l'importance des gènes NS4A/4B et de la région 5' de NS5 pour conférer la forte virulence aviaire de la souche Is98 après inoculation IC à des poussins de 1J.

De telles différences pourraient être liées à une modification chez la chimère 3 de la capacité de réplication ou à un affaiblissement du pouvoir d'échappement/contournement du système immunitaire.

Les charges virales du groupe SC sont beaucoup plus faibles et semblent indiquer que cette voie d'inoculation n'autorise pas une entrée efficace du VWN dans le système nerveux central des poussins après franchissement de la barrière hémato encéphalique.

Ces résultats, combinés avec les observations des plages de lyses nous permettent de suspecter que ces gènes jouent un rôle dans la virulence du virus Is98 chez l'hôte aviaire mais non chez l'hôte murin et que ces gènes jouent un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire à VWN via son action sur la réponse innée (18). NS4B et NS5 sont en effet importantes pour la réplication (86, 87) et participent également à la suppression de la réponse innée de l'hôte, NS4B étant impliquée dans l'inhibition la voie interféron α/β (91, 92) ainsi que dans la modulation de la réponse ARN interférent (148) et NS5 dans le blocage de l'expression des gènes de la voie interféron de type 1 (93).

Il serait intéressant de tester cette dernière hypothèse après infection d'animaux IFNAR KO (KO récepteur interféron de type I) par Is98, It08, Chimères 3 et 4.

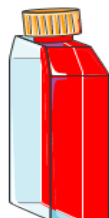
Dans le modèle aviaire utilisé, le poussin SPF de 1 jour, le système immunitaire immature de l'hôte permet d'objectiver des différences de virulences entre les virus testés et de suggérer que la virulence du VWN chez l'hôte aviaire dépend de la partie NS4A et B, et 5' de NS5 du génome viral.

Il serait intéressant de faire une autre chimère avec un fond It08 en changeant la zone contenant NS4A et B et la partie 5' de NS5 avec celle d'Is98, de voir si la virulence d'It08 s'en trouverait

accrue chez le modèle aviaire et si l'interaction avec le système immunitaire d'une telle chimère serait changée.

Pour le modèle murin l'analyse par RT-qPCR des sangs de souris à J3 post infection, ainsi que celle effectuée pour déterminer la charge virale dans le cerveau des souris décédées des suites des infections, nous ont permis d'observer une différence de comportement de la chimère 4. En effet, celle-ci n'entraîne pas de virémie à J3 post infection et peu de virus ont été identifiés dans le cerveau des souris en post mortem, sa capacité à franchir la barrière hémato encéphalique se trouvant sûrement limitée par sa faible virémie (malgré une virulence et un temps moyen de survie comparable à celui des groupes de souris inoculés avec les 3 autres virus d'environ 9 jours). Ce qui amène à penser que le virus chimère 4 provoque une virémie décalée dans le temps par rapport aux autres virus (a priori plus tardive) et que la mortalité des souris après inoculation du virus chimère 4 serait due à un effet immunopathologique induit plutôt qu'à un effet direct du virus. Les analyses histologiques à partir des prélèvements d'encéphale placés en formol devraient permettre de préciser ce dernier point.

La chimère 4 intègre à une bonne partie de la séquence codante de NS5 et de la partie 3'NC d'It08 clonée dans le génome d'Is98. La partie 3'NC joue un rôle important dans la réplication de l'ARN viral du VWN. La partie NS5 du virus West Nile code pour la polymérase virale et participe à plusieurs autres processus importants pour la réplication du virus (189). Cette séquence chez It08 comporte des mutations non silencieuses par rapport à Is98. Ces différents facteurs pourraient jouer un rôle dans la perte de capacité infectieuse de la chimère 4 objectivée *in vitro* (plages de lyse) et *in vivo* (charges virales diminuées dans les organes cibles de l'infection) en modèle murin. Cette perte n'étant pas objectivée en modèle aviaire, nos données suggèrent l'existence de déterminants de virulence différents en fonction des hôtes aviaires ou mammifères du VWN.



In vitro	In vivo – souris	In vivo – poussin
-NS5 : Polymérase virale, Suppression réponse innée via inhibition expression gène voie interféron 1. -3'NC : Initiation synthèse ARN (-)	-NS5 : Polymérase virale, Suppression réponse innée via inhibition expression gène voie interféron 1. -3'NC : Initiation synthèse ARN (-) Chimère 4 absence de virémie à J3 Mortalité IP: Is98 ≥ It08 = Ch3 = Ch4	-NS4A : Réarrangements des membranes internes -NS4B : voie Interféron α/β, Inhibition ARN interférence -NS5 : Polymérase virale, Suppression réponse innée via inhibition expression gène voie interféron 1.
Plages de lyse chimère 4: Décalage formation de J3 à J5	Modification de la virémie / réplication Possible réponse inflammatoire délétère pour le SNC plus forte chez les souris infectées par chimère 4.	Virulence IC: Is98 ≈ Chimère4 ; It08 ≈ Chimère3 Is98=Ch4 > It08=Ch3 Distribution périphérique et centrale plus limitée des virus It08 et chimère 3
Altération de la réplication / capacité infectieuse pour les virus Ch 4 produits sur VERO	NS5 et 3'NC semblent importantes pour la capacité infectieuse d'Is98 chez l'hôte murin (mammifère modèle)	-Altération de la capacité de réplication -Diminution du pouvoir d'échappement/contournement du système immunitaire de la chimère 3
NS5 et 3'NC importantes pour la réplication et/ou la capacité infectieuse <i>in vitro</i>	Ch 4 NS5 3'NC	NS4A, NS4B et NS5 semblent importantes pour la virulence d'Is98 chez l'hôte aviaire. Ch 3 NS4A/B (5')NS5

Figure 35 : Tableau récapitulatif des résultats et conclusions pour les virus Is98, It08, chimère 3 et 4.

Pour résumer, les mutations identifiées dans la partie du génome codant pour NS4A et B et la partie 5' de NS5 devront être investiguées plus finement sur les hôtes aviaires alors que les mutations apportées dans NS5 semblent moduler les paramètres virologiques dans le modèle mammifère. Finalement nous avons pu objectiver le rôle de 3 déterminants différents pour la virulence du VWN, NS3 249, NS4A/B et NS5. Mais il semble que leur impact soit différent selon l'hôte ciblé et que pour avoir une idée réelle de la virulence d'une souche de VWN, il faille tenir compte de la partie du génome muté et de l'espèce hôte ciblée.

Ces déterminants semblent être des déterminants « majeurs » de la capacité répliquative ou du « fitness » du VWN vis-à-vis de son hôte. C'est-à-dire qu'ils jouent un rôle prépondérant dans la capacité intrinsèque du virus de se répliquer et d'échapper au système immunitaire spécifique de son hôte.

Dans l'ensemble, ce travail met en lumière les relations complexes qui existent entre les phénotypes individuels et de groupe dans les virus ARN et identifie divers déterminants comme facteur d'atténuation et de fitness dans le VWN

Perspectives

Certains essais n'ont été réalisés qu'une seule fois, en particulier les essais d'infection avec les chimères Is98/It08 sur modèle murin et les résultats devront être répétés pour conclure aux effets observés avec la chimère 4. Les données obtenues *in vivo* présentent généralement une grande variabilité et les différences observées (charges virales dans le sang et le cerveau en particulier) n'ont pour la plupart pas été jugées significatives (différents tests statistiques effectués avec le logiciel GraphPad Prism). De ce fait, il faudrait refaire les différents essais afin de reproduire les résultats obtenus, et si possible, sur un nombre plus important d'individus (pour les essais *in vivo*).

De plus, on sait que les hôtes murins ne sont pas les meilleurs modèles pour l'étude des différences de virulence des virus West Nile testés. De ce fait, des tests sur des poussins de 1 jour ont été réalisés en collaboration avec le CERVA CODA afin de mieux caractériser les différences de virulence des souches européennes et méditerranéennes du VWN. En ce qui concerne la chimère 4, il apparaît clairement que ce virus est différent des autres virus au vu des résultats *in vitro* et en hôte murin *in vivo*. Il y a une diminution de la virogénèse de cette chimère. Pour expliquer cette différence, il faudrait étudier plus précisément la séquence que présente le fragment d'It08 qui a été cloné dans la séquence génomique d'Is98, et en particulier, les mutations non silencieuses qu'il présente. La même perspective s'applique à la chimère 3 qui n'a présenté des différences que chez l'hôte aviaire immature immunologiquement (il a été démontré que les hôtes aviaires avec un système immunitaire mature ne permettent pas de faire de différence de virulence entre les souches de VWN (124)).

On peut donc penser que la différence de virulence observée durant l'expérimentation en modèle aviaire est associée à la zone contenant NS4A et B et la partie 5' de NS5 et qu'elle pourrait être liée à une modification du pouvoir de réplication où NS4A/B et NS5 jouent des rôles prépondérants, ou un affaiblissement du pouvoir d'échappement/contournement du système immunitaire où là aussi NS4B et NS5 jouent un rôle important via le contournement de la voie interféron de type I. Il serait possible de vérifier cela en testant nos virus sur des animaux IFNAR KO (KO récepteur interféron de type I). Si aucune différence n'est observée entre nos quatre virus, ceci suggérerait que la « voie interféron » (déficiante chez les cellules VERO) est impactée par les échanges génomiques, alors que le maintien suggérerait un impact sur la réplication. Ceci permettrait de faire la distinction entre l'importance de l'espèce de l'hôte (murin, aviaire) et l'état du système immunitaire de celui-ci (immature, mature) dans la modulation de la virulence de nos souches.

Il serait intéressant aussi de comprendre quel locus spécifique dans NS4A/B et NS5 joue un rôle prépondérant dans les résultats mis en évidence par insertion de mutations ponctuelles aux sites de mutations non silencieuses étudiés dans les chimères 3 et 4, comme cela a pu être fait avec le mutant ponctuel de NS3. En ce qui concerne NS3 la virulence du mutant Thr était considérablement plus faible chez les poulets et chez la souris, ce qui indique que l'hélicase ARN (188) est un déterminant majeur de la capacité répliquative du VWN.

Les résultats de l'histologie et de l'immunohistochimie nous permettront aussi de savoir si ces diverses mutations ont une action sur la neuropathogénicité des souches et leur capacité à franchir la barrière hémato encéphalique.

Le CPEC (Circular Polymerase Extension Cloning) nous permettra aussi d'obtenir plus facilement et rapidement des chimères, par exemple en inversant le génome de fond (Is98 -> It08) pour vérifier nos observations.

On peut penser pour le futur que la découverte des facteurs de virulences de ce virus nous permettra de déterminer les facteurs de virulences d'autres types de *flavivirus*. Ceci pourra sans doute nous permettre de caractériser rapidement le potentiel épizootique ou épidémique d'une souche virale donnée et d'envisager des moyens de lutter plus efficacement contre ces arbovirus (vaccins, antiviraux etc...).

BIBLIOGRAPHIE

1. Rodhain F. Virus et insectes : relations multiples et variées Virologie. Virologie. 2007;11(2):5.
2. Salinas S, Foulongne V, Loustalot F, Fournier-Wirth C, Molès J, Briant L, et al. Le virus Zika L'émergence d'une menace. Medecine sciences. 2016;32(4):8.
3. Sisterson MS. Transmission of insect-vectorized pathogens: effects of vector fitness as a function of infectivity status. Environ Entomol. 2009;38(2):345-55.
4. Vaidyanathan R, Scott TW. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection. Apoptosis. 2006;11(9):1643-51.
5. Ferguson HM, Read AF. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? Trends Parasitol. 2002;18(6):256-61.
6. Gray EM, Bradley TJ. Malarial infection in *Aedes aegypti* : effects on feeding, fecundity and metabolic rate. Parasitology. 2006;132(Pt 2):169-76.
7. Anderson RA, Knols BG, Koella JC. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. Parasitology. 2000;120 (Pt 4):329-33.
8. Lovisolo O, Hull R, Rosler O. Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible paleontology. Adv Virus Res. 2003;62:325-79.
9. Ergunay K, Litzba N, Brinkmann A, Gunay F, Sarikaya Y, Kar S, et al. Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey. Parasit Vectors. 2017;10(1):149.
10. Aliota MT, Jones SA, Dupuis AP, 2nd, Ciota AT, Hubalek Z, Kramer LD. Characterization of Rabensburg virus, a flavivirus closely related to West Nile virus of the Japanese encephalitis antigenic group. PLoS One. 2012;7(6):e39387.
11. Blanc S, Gutierrez S. The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants. Curr Opin Virol. 2015;15:27-33.
12. Junglen S, Korries M, Grasse W, Wieseler J, Kopp A, Hermanns K, et al. Host Range Restriction of Insect-Specific Flaviviruses Occurs at Several Levels of the Viral Life Cycle. mSphere. 2017;2(1).
13. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. Emerg Microbes Infect. 2015;4(3):e18.
14. Rodhain F. Virus et insectes : relations multiples et variées. Virologie. 2007;11(2):5.
15. Smithburn K, Hughes T, Burke A, Paul J. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. Am J Trop Med Hyg. 1940;20:471-92.
16. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. Lancet Neurol. 2007;6(2):171-81.
17. Zeller H.G. SI. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23(3):147-56.
18. Murray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. Vet Res. 2010;41(6):67.
19. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, et al. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. Emerg Infect Dis. 2002;8(4):392-7.
20. Bakonyi T, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csorgo T, Lussy H, et al. Emergence of Usutu virus in Hungary. J Clin Microbiol. 2007;45(12):3870-4.
21. Becker N, Jost H, Ziegler U, Eiden M, Hoper D, Emmerich P, et al. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. PLoS One. 2012;7(2):e32604.
22. Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, Lowenski S, Laloy E, Quenault H, et al. Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. Emerg Infect Dis. 2016;22(12):2225.
23. Savini G, Monaco F, Terregino C, Di Gennaro A, Bano L, Pinoni C, et al. Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? Vet Microbiol. 2011;151(3-4):264-74.
24. Steinmetz HW, Bakonyi T, Weissenböck H, Hatt JM, Eulenberger U, Robert N, et al. Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland--genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. Vet Microbiol. 2011;148(2-4):207-12.
25. Weissenböck H, Kolodziejek J, Fragner K, Kuhn R, Pfeiffer M, Nowotny N. Usutu virus activity in Austria, 2001-2002. Microbes Infect. 2003;5(12):1132-6.
26. Aguero M, Fernandez-Pinero J, Buitrago D, Sanchez A, Elizalde M, San Miguel E, et al. Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. Emerg Infect Dis. 2011;17(8):1498-501.

27. ECDC. http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/historical-data.aspx. 2015.
28. Bahuon C, Lecollinet S. Des saisons de transmission du virus West Nile contrastée en Europe - situation épidémiologique fin 2014. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*. 2015;67:4.
29. Pradier S, Lecollinet S, Leblond A. West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev Sci Tech*. 2012;31(3):829-44.
30. Bakonyi T, Ferenczi E, Erdelyi K, Kutasi O, Csorgo T, Seidel B, et al. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet Microbiol*. 2013;165(1-2):61-70.
31. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Douglas G, Lytras T, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro Surveill*. 2010;15(34).
32. Platonov AE, Karan LS, Shopenskaia TA, Fedorova MV, Koliassnikova NM, Rusakova NM, et al. [Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2011(2):29-37.
33. Brault AC. Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet Res*. 2009;40(2):43.
34. Kimura T, Ohshima A. Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion. *J Gen Virol*. 1988;69 (Pt 6):1247-54.
35. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(9):519-29.
36. Sanchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, et al. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*. 2005;336(1):70-82.
37. Kummerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol*. 2002;76(10):4773-84.
38. Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol*. 2003;77(14):7804-13.
39. Liu WJ, Wang XJ, Mokhonov VV, Shi PY, Randall R, Khromykh AA. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J Virol*. 2005;79(3):1934-42.
40. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14333-8.
41. Pugachev KV, Guirakhoo F, Ocran SW, Mitchell F, Parsons M, Penal C, et al. High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. *J Virol*. 2004;78(2):1032-8.
42. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. *The Viruses and Their Replication*. Virology. 5th Edition ed. Howley DMKaPM, editor. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. 1101-53 p.
43. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3414-9.
44. Lobigs M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):6218-22.
45. Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol*. 1993;67(3):1672-5.
46. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 2002;76(11):5480-91.
47. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*. 1997;71(11):8475-81.
48. Elshuber S, Mandl CW. Resuscitating mutations in a furin cleavage-deficient mutant of the flavivirus tick-borne encephalitis virus. *J Virol*. 2005;79(18):11813-23.
49. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med*. 2004;10(12):1366-73.
50. Davis CW, Mattei LM, Nguyen HY, Ansarah-Sobrinho C, Doms RW, Pierson TC. The location of asparagine-linked glycans on West Nile virions controls their interactions with CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin). *J Biol Chem*. 2006;281(48):37183-94.
51. Chu JJ, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol*. 2004;78(19):10543-55.

52. Bogachek MV, Protopopova EV, Loktev VB, Zaitsev BN, Favre M, Sekatskii SK, et al. Immunochemical and single molecule force spectroscopy studies of specific interaction between the laminin binding protein and the West Nile virus surface glycoprotein E domain II. *J Mol Recognit*. 2008;21(1):55-62.
53. Cheng G, Cox J, Wang P, Krishnan MN, Dai J, Qian F, et al. A C-type lectin collaborates with a CD45 phosphatase homolog to facilitate West Nile virus infection of mosquitoes. *Cell*. 2010;142(5):714-25.
54. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*. 2006;7(12):1258-65.
55. Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY, Schneider BS, Smith DR, et al. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *J Virol*. 2005;79(13):8339-47.
56. Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*. 2007;25(30):5563-76.
57. Luca VC, AbiMansour J, Nelson CA, Fremont DH. Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J Virol*. 2012;86(4):2337-46.
58. Harrison SC. The pH sensor for flavivirus membrane fusion. *J Cell Biol*. 2008;183(2):177-9.
59. Falgout B, Chanock R, Lai CJ. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J Virol*. 1989;63(5):1852-60.
60. Falgout B, Markoff L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 1995;69(11):7232-43.
61. Hori H, Lai CJ. Cleavage of dengue virus NS1-NS2A requires an octapeptide sequence at the C terminus of NS1. *J Virol*. 1990;64(9):4573-7.
62. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*. 2003;59:40.
63. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 1996;220(1):232-40.
64. Westaway EG. Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res*. 1987;33:45.
65. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol*. 1997;71(9):6650-61.
66. Muylaert IR, Chambers TJ, Galler R, Rice CM. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology*. 1996;222(1):159-68.
67. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(50):19111-6.
68. Chung KM, Nybakken GE, Thompson BS, Engle MJ, Marri A, Fremont DH, et al. Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Virol*. 2006;80(3):1340-51.
69. Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol*. 2008;82(17):8262-71.
70. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 1998;245(2):203-15.
71. Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol*. 2001;75(10):4633-40.
72. Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J Virol*. 2004;78(22):12225-35.
73. Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol*. 2006;80(5):2396-404.
74. Clum S, Ebner KE, Padmanabhan R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *J Biol Chem*. 1997;272(49):30715-23.
75. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*. 1991;65(5):2467-75.

76. Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(10):3889-97.
77. Amberg SM, Nestorowicz A, McCourt DW, Rice CM. NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies. *J Virol.* 1994;68(6):3794-802.
78. Yamshchikov VF, Compans RW. Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study. *J Virol.* 1994;68(9):5765-71.
79. Lin C, Amberg SM, Chambers TJ, Rice CM. Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J Virol.* 1993;67(4):2327-35.
80. Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology.* 1993;197(1):265-73.
81. Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol.* 1997;71(5):3466-73.
82. Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, Lee AK, Chan YC, Fu J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology.* 1998;246(2):409-17.
83. Ramanathan MP, Chambers JA, Pankhong P, Chattergoon M, Attatippaholkun W, Dang K, et al. Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology.* 2006;345(1):56-72.
84. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol.* 2008;82(1):173-83.
85. Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, et al. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet.* 2007;39(9):1162-6.
86. Zou G, Puig-Basagoiti F, Zhang B, Qing M, Chen L, Pankiewicz KW, et al. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology.* 2009;384(1):242-52.
87. Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol.* 2006;80(9):4623-32.
88. Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8854-63.
89. Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA. Replication and gene function in Kunjin virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;267:323-51.
90. Puig-Basagoiti F, Tilgner M, Bennett CJ, Zhou Y, Munoz-Jordan JL, Garcia-Sastre A, et al. A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology.* 2007;361(1):229-41.
91. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* 2005;79(13):8004-13.
92. Wicker JA, Whiteman MC, Beasley DW, Davis CT, Zhang S, Schneider BS, et al. A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology.* 2006;349(2):245-53.
93. Laurent-Rolle M, Boer EF, Lubick KJ, Wolfenbarger JB, Carmody AB, Rockx B, et al. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol.* 2010;84(7):3503-15.
94. Chiu WW, Kinney RM, Dreher TW. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol.* 2005;79(13):8303-15.
95. Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.* 2006;80(5):2170-82.
96. Shi PY, Brinton MA, Veal JM, Zhong YY, Wilson WD. Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. *Biochemistry.* 1996;35(13):4222-30.
97. Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol.* 2001;75(14):6719-28.
98. Polacek C, Foley JE, Harris E. Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region. *J Virol.* 2009;83(2):1161-6.
99. Thurner C, Witwer C, Hofacker IL, Stadler PF. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 5):1113-24.

100. You S, Padmanabhan R. A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J Biol Chem.* 1999;274(47):33714-22.
101. Polacek C, Friebe P, Harris E. Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 3):687-92.
102. Blackwell JL, Brinton MA. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J Virol.* 1997;71(9):6433-44.
103. De Nova-Ocampo M, Villegas-Sepulveda N, del Angel RM. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology.* 2002;295(2):337-47.
104. Li W, Li Y, Kedersha N, Anderson P, Emara M, Swiderek KM, et al. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J Virol.* 2002;76(23):11989-2000.
105. Gollins SW, Porterfield JS. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *J Gen Virol.* 1986;67 (Pt 1):157-66.
106. Cosset. Entrée cellulaire du virus de l'hépatite C. *Virologie.* 2010;10(3):12.
107. Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Adv Virus Res.* 2003;59:99-140.
108. Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol.* 2001;75(22):10787-99.
109. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine.* 2012;30(29):4301-6.
110. Hurlbut HS, Rizk F, Taylor RM, Work TH. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 1956;5(4):579-620.
111. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1167-73.
112. Granwehr BP, Lillibridge KM, Higgs S, Mason PW, Aronson JF, Campbell GA, et al. West Nile virus: where are we now? *Lancet Infect Dis.* 2004;4(9):547-56.
113. Perez-Ramirez E, Llorente F, Jimenez-Clavero MA. Experimental infections of wild birds with West Nile virus. *Viruses.* 2014;6(2):752-81.
114. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(3):311-22.
115. Swayne DE, Beck JR, Smith CS, Shieh WJ, Zaki SR. Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(4):751-3.
116. LaDeau SL, Kilpatrick AM, Marra PP. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature.* 2007;447(7145):710-3.
117. Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Szeredi L, Ratz F, Skare J, et al. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(2):181-8.
118. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(4):618-23.
119. Hofle U, Blanco JM, Crespo E, Naranjo V, Jimenez-Clavero MA, Sanchez A, et al. West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Vet Microbiol.* 2008;129(1-2):171-8.
120. Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N. Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J Wildl Dis.* 2006;42(1):1-13.
121. Sotelo E, Gutierrez-Guzman AV, del Amo J, Llorente F, El-Harrak M, Perez-Ramirez E, et al. Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Vet Res.* 2011;42:11.
122. Del Amo J, Llorente F, Figuerola J, Soriguer RC, Moreno AM, Cordioli P, et al. Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins. *Vet Res.* 2014;45:33.
123. Del Amo J, Llorente F, Perez-Ramirez E, Soriguer RC, Figuerola J, Nowotny N, et al. Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus strains of lineages 1 and 2. *Vet Microbiol.* 2014;172(3-4):542-7.
124. Dridi M, Rauw F, Muylkens B, Lecollinet S, van den Berg T, Lambrecht B. Setting up a SPF chicken model for the pathotyping of West Nile virus (WNV) strains. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60 Suppl 2:51-62.
125. Dridi M, Vangeluwe D, Lecollinet S, van den Berg T, Lambrecht B. Experimental infection of Carrion crows (*Corvus corone*) with two European West Nile virus (WNV) strains. *Vet Microbiol.* 2013;165(1-2):160-6.

126. Spedicato M, Carmine I, Bellacicco AL, Marruchella G, Marini V, Piscicella M, et al. Experimental infection of rock pigeons (*Columba livia*) with three West Nile virus lineage 1 strains isolated in Italy between 2009 and 2012--CORRIGENDUM. *Epidemiol Infect.* 2016;144(6):1312.
127. Ziegler U, Angenvoort J, Fischer D, Fast C, Eiden M, Rodriguez AV, et al. Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons. *Vet Microbiol.* 2013;161(3-4):263-73.
128. Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Agüero M, Hoefle U, Blanco JM, et al. Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology.* 2009;395(2):289-97.
129. Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 9):2293-7.
130. Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson JJ, Murgue B, Murri S, et al. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology.* 2003;315(2):381-8.
131. Jourdain E, Toussaint Y, Leblond A, Bicout DJ, Sabatier P, Gauthier-Clerc M. Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(1):15-33.
132. Hayes CG. The Arboviruses: epidemiology and ecology. Monath TP. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p. 59-88.
133. Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel G, Dupuis AP, 2nd, et al. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(4):679-85.
134. Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, Malkinson M, Weiss L, Duvdevani P, et al. West Nile fever in Israel 1999-2000: from geese to humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:127-42.
135. Malkinson M, Banet C, Khinich Y, Samina I, Pokamunski S, Weisman Y. Use of live and inactivated vaccines in the control of West Nile fever in domestic geese. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:255-61.
136. Malkinson M, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Deubel V. Intercontinental transmission of West Nile virus by migrating white storks. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3 Suppl):540.
137. McLean RG, Ubico SR, Docherty DE, Hansen WR, Sileo L, McNamara TS. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:54-7.
138. Zientara S, Lecollinet S. Le virus West Nile, sa diffusion limitée en Europe par comparaison avec sa rapide implantation en Amérique du Nord: Edition Lavoisier; 2010.
139. Ahmed S, Libman R, Wesson K, Ahmed F, Einberg K. Guillain-Barre syndrome: An unusual presentation of West Nile virus infection. *Neurology.* 2000;55(1):144-6.
140. Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, et al. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(4):380-6.
141. Chevalier V. DB, Gerbier G., Babinot M., Michel J.F., Toure I., Zientara S. . Analyse spatiale de l'épizootie d'infection à virus West Nile chez les chevaux de Camargue en 2000 : résultats et perspectives. *Epidémiol et Santé anim.* 2002;42:123-31.
142. Desenclos JC, Lecollinet S, Balenghien T, Fontenille D, Lagadic L, Lagneau C, et al. La lutte antivectorielle en France. Le contexte de la lutte antivectorielle en France: 3. Les zoonoses transmises par des vecteurs. . IRD, editor2009. p.
143. Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS. West Nile virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *Am Fam Physician.* 2003;68(4):653-60.
144. Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J Med Entomol.* 2003;40(6):743-6.
145. Nasci RS, Savage HM, White DJ, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, et al. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(4):742-4.
146. Lawrie CH, Uzategui NY, Gould EA, Nuttall PA. Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):653-7.
147. Gammon DB, Mello CC. RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Curr Opin Insect Sci.* 2015;8:111-20.
148. Kakumani PK, Ponia SS, S RK, Sood V, Chinnappan M, Banerjea AC, et al. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *J Virol.* 2013;87(16):8870-83.
149. Schnettler E, Sterken MG, Leung JY, Metz SW, Geertsema C, Goldbach RW, et al. Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and Mammalian cells. *J Virol.* 2012;86(24):13486-500.

150. Zeller HG, Murgue B. Rôle des oiseaux migrateurs dans l'épidémiologie du virus West Nile. *Médecine et maladies infectieuses*. 2001;31(2):6.
151. Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol*. 2003;77(4):2578-86.
152. Diamond MS, Sitati EM, Friend LD, Higgs S, Shrestha B, Engle M. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med*. 2003;198(12):1853-62.
153. Nemeth NM, Oesterle PT, Bowen RA. Humoral immunity to West Nile virus is long-lasting and protective in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(5):864-9.
154. Lowenthal JW, Connick TE, McWaters PG, York JJ. Development of T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunol Cell Biol*. 1994;72(2):115-22.
155. Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ, King NJ. Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol*. 2001;117(3):702-9.
156. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol*. 2000;114(3):560-8.
157. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol*. 2006;80(19):9349-60.
158. Samuel MA, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD, Diamond MS. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(43):17140-5.
159. Emara MM, Liu H, Davis WG, Brinton MA. Mutation of mapped TIA-1/TIAR binding sites in the 3' terminal stem-loop of West Nile virus minus-strand RNA in an infectious clone negatively affects genomic RNA amplification. *J Virol*. 2008;82(21):10657-70.
160. Schlick P, Taucher C, Schittl B, Tran JL, Kofler RM, Schueler W, et al. Helices alpha2 and alpha3 of West Nile virus capsid protein are dispensable for assembly of infectious virions. *J Virol*. 2009;83(11):5581-91.
161. Zhang S, Li L, Woodson SE, Huang CY, Kinney RM, Barrett AD, et al. A mutation in the envelope protein fusion loop attenuates mouse neuroinvasiveness of the NY99 strain of West Nile virus. *Virology*. 2006;353(1):35-40.
162. Basu M, Brinton MA. West Nile virus (WNV) genome RNAs with up to three adjacent mutations that disrupt long distance 5'-3' cyclization sequence basepairs are viable. *Virology*. 2011;412(1):220-32.
163. Langevin SA, Bowen RA, Ramey WN, Sanders TA, Maharaj PD, Fang Y, et al. Envelope and pre-membrane protein structural amino acid mutations mediate diminished avian growth and virulence of a Mexican West Nile virus isolate. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 12):2810-20.
164. Donadieu E, Bahuon C, Lowenski S, Zientara S, Croupier M, Lecollinet S. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses*. 2013;5(11):2856-80.
165. Lim SM, Koraka P, van Boheemen S, Roose JM, Jaarsma D, van de Vijver DA, et al. Characterization of the mouse neuroinvasiveness of selected European strains of West Nile virus. *PLoS One*. 2013;8(9):e74575.
166. Perez-Ramirez E, Llorente F, Del Amo J, Fall G, Sall A, Lubisi A, et al. Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: discrimination between three pathogenicity categories. *Journal of General Virology*. 2017.
167. Capelli G, Ravagnan S, Montarsi F, Fabrizio S, Cazzin S, Bonfanti L, et al. Further evidence of lineage 2 West Nile Virus in *Culex pipiens* of North-Eastern Italy. *Vet Ital*. 2013;49(3):263-8.
168. Langevin SA, Bowen RA, Reisen WK, Andrade CC, Ramey WN, Maharaj PD, et al. Host competence and helicase activity differences exhibited by West Nile viral variants expressing NS3-249 amino acid polymorphisms. *PLoS One*. 2014;9(6):e100802.
169. Dridi M, Van Den Berg T, Lecollinet S, Lambrecht B. Evaluation of the pathogenicity of West Nile virus (WNV) lineage 2 strains in a SPF chicken model of infection: NS3-249Pro mutation is neither sufficient nor necessary for conferring virulence. *Vet Res*. 2015;46:130.
170. Yamshchikov VF, Wengler G, Perelygin AA, Brinton MA, Compans RW. An infectious clone of the West Nile flavivirus. *Virology*. 2001;281(2):294-304.
171. Khromykh AA, Westaway EG. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J Virol*. 1994;68(7):4580-8.
172. Audsley M, Edmonds J, Liu W, Mokhonov V, Mokhonova E, Melian EB, et al. Virulence determinants between New York 99 and Kunjin strains of West Nile virus. *Virology*. 2011;414(1):63-73.
173. Borisevich V, Seregin A, Nistler R, Mutabazi D, Yamshchikov V. Biological properties of chimeric West Nile viruses. *Virology*. 2006;349(2):371-81.

174. Kinney RM, Huang CY, Whiteman MC, Bowen RA, Langevin SA, Miller BR, et al. Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 12):3611-22.
175. Shi PY, Tilgner M, Lo MK, Kent KA, Bernard KA. Infectious cDNA clone of the epidemic west nile virus from New York City. *J Virol*. 2002;76(12):5847-56.
176. Bahuon C, Despres P, Pardigon N, Panthier JJ, Cordonnier N, Lowenski S, et al. IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus. *PLoS One*. 2012;7(10):e47666.
177. Szentpali-Gavaller K, Lim SM, Dencso L, Banyai K, Koraka P, Osterhaus AD, et al. In Vitro and in Vivo Evaluation of Mutations in the NS Region of Lineage 2 West Nile Virus Associated with Neuroinvasiveness in a Mammalian Model. *Viruses*. 2016;8(2).
178. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, et al. Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3411-3.
179. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*. 2011;85(6):2964-74.
180. Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One*. 2009;4(7):e6441.
181. Setoh YX, Prow NA, Rawle DJ, Tan CS, Edmonds JH, Hall RA, et al. Systematic analysis of viral genes responsible for differential virulence between American and Australian West Nile virus strains. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 6):1297-308.
182. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am J Hyg*. 1938;27:5.
183. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7276-80.
184. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods*. 2007;146(1-2):355-8.
185. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods*. 2007;140(1-2):115-23.
186. Edmonds J, van Grinsven E, Prow N, Bosco-Lauth A, Brault AC, Bowen RA, et al. A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate recapitulation of viral heterogeneity. *J Virol*. 2013;87(4):2367-72.
187. Lucas M, Frenkiel MP, Mashimo T, Guenet JL, Deubel V, Despres P, et al. The Israeli strain IS-98-ST1 of West Nile virus as viral model for West Nile encephalitis in the Old World. *Virol J*. 2004;1:9.
188. Ebel GD, Fitzpatrick KA, Lim PY, Bennett CJ, Deardorff ER, Jerzak GV, et al. Nonconsensus West Nile virus genomes arising during mosquito infection suppress pathogenesis and modulate virus fitness in vivo. *J Virol*. 2011;85(23):12605-13.
189. Brinton MA. Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus. *Viruses*. 2013;6(1):13-53.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

Caractérisation des déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile.

LOWENSKI Steeve

26 Juin 2017

RESUME

Le virus West Nile (VWN) est un arbovirus neurotrope transmis par piqûre de moustique et pouvant infecter une grande variété d'espèces animales. Le réservoir naturel du VWN est composé par la faune aviaire sauvage.

L'objectif de mon travail était de caractériser les déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile. Pour atteindre cet objectif, je me suis appuyé sur le travail antérieur du laboratoire, à savoir la production d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1. Nous avons aussi utilisé la souche Italie 2008 (It08) (souche 229892, GENBANK : FJ483549) qui est réputée peu pathogène.

J'ai réalisé la construction de virus chimères (par échange de fragments génomiques entre les souches de VWN Is98 et It08) ou mutants (intégration de la mutation NS3-P249T) à partir du clone infectieux Is98 et assuré leur amplification sur cellules Vero. J'ai caractérisé leurs propriétés biologiques dans des lignées cellulaires *in vitro* et dans des modèles *in vivo* (souris, modèle mammifère permettant l'évaluation de la virulence du virus West Nile, et oiseaux : poussin de 1 jour en partenariat avec le CERVA CODA, Belgique).

In vitro j'ai observé que les virus Is98, It08 et Chimère 3 ont un comportement différent de ceux de la chimère 4 et du mutant Thr (plages de lyse de petite taille). Des cinétiques d'infections en cellules VERO semblent indiquer que la chimère 4 et le mutant NS3 P249T ne présentent pas de défaut de réplication dans ce modèle cellulaire.

Pour le mutant NS3, nos résultats *in vivo* tendent à suggérer que la virulence de VWN est fortement impactée chez l'hôte murin ou aviaire par la présence du résidu Proline en position 249 sur le cadre de lecture de NS3 dans un contexte génomique Is98 plus global.

Pour les virus chimères, les courbes de survie en modèle murin sont comparables pour les différents virus testés (Is98, It08, Chimères 3 et 4), alors que les analyses par RT-qPCR des différents prélèvements démontrent des charges virales plus faibles après infection par la chimère 4. Les différences de comportement de la chimère 4 amènent à penser que celle-ci provoque une virémie décalée dans le temps par rapport aux autres virus (a priori plus tardive). Les infections en modèle aviaire ont permis de démontrer des différences statistiquement significatives dans les charges virales mesurées dans différents compartiments périphériques et dans les écouillons oraux après infection par les différents virus. Des courbes de survie et des charges virales comparables ont été observées après infection des poussins SPF de 1J respectivement entre le virus It08 et la chimère 3 (charges virales dans les différents prélèvements effectués faibles, mortalités plus faibles) et entre le virus Is98 et la chimère 4 (excrétion orale et charges virales périphériques élevées, mortalités plus élevées).

L'ensemble des résultats que j'ai obtenu m'a permis objectiver le rôle de trois déterminants différents pour la virulence du VWN, la zone NS3 249, NS4A/B et NS5. Mais il semble que leurs impacts soient différents selon l'hôte ciblé et que pour avoir une idée réelle de la virulence d'une souche de VWN, il faille tenir compte de la partie du génome muté et de l'espèce hôte ciblée.

Ces déterminants semblent être des déterminants « majeurs » de la capacité répliquative ou du « fitness » du VWN vis-à-vis de son hôte. C'est-à-dire qu'ils jouent un rôle prépondérant dans la capacité intrinsèque du virus de se répliquer et d'échapper au système immunitaire spécifique de son hôte.

On peut penser pour le futur que la découverte des facteurs de virulence de ce virus nous permettra de déterminer les facteurs de virulences d'autres types de flavivirus. Ceci pourra sans doute nous permettre de caractériser rapidement le potentiel épidémiologique ou épidémique d'une souche donnée et d'envisager des moyens de lutter plus efficacement contre ces arbovirus (vaccins, antiviraux etc...)

MOTS-CLES : virus West Nile (VWN), déterminants, virulence, caractérisation, chimère, RT-qPCR, fitness.