



**HAL**  
open science

# La génétique inverse appliquée au développement d'outils thérapeutiques contre les virus émergents

Hawa Sophia Bouzidi

► **To cite this version:**

Hawa Sophia Bouzidi. La génétique inverse appliquée au développement d'outils thérapeutiques contre les virus émergents. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03998710

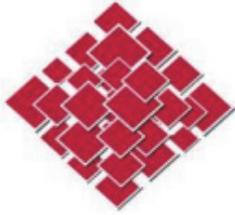
**HAL Id: hal-03998710**

**<https://ephe.hal.science/hal-03998710>**

Submitted on 21 Feb 2023

**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.



École Pratique  
des Hautes Études



**MEMOIRE**  
Présentée par

**Hawa Sophia BOUZIDI**

*En vue de l'obtention du diplôme EPHE  
Mention : Science de la vie et de la terre*

# **LA GENETIQUE INVERSE APPLIQUEE AU DEVELOPPEMENT D'OUTILS THERAPEUTIQUES CONTRE LES VIRUS EMERGENTS**

Soutenue le 13 Décembre 2022

Composition du jury :

Madame le Docteur Sophie GAD-LAPITEAU  
Monsieur le Docteur Wilhelm FURNON  
Monsieur le Docteur Jean-Sélim DRIOUICH  
Monsieur le Docteur Franck TOURET  
Monsieur le Docteur Maxime RATINIER

Présidente du jury  
Rapporteur  
Examineur  
Tuteur scientifique  
Tuteur pédagogique

Mémoire préparé sous la direction du Dr Franck TOURET  
Intitulé de la structure d'accueil : Unité des virus émergents, UMR-190, AMU/EFS/Inserm/IRD  
Faculté de Médecine Timone 5ème étage aile bleu, 27 bd Jean Moulin – IHU Méditerranée infection,  
19-21 Bd Jean Moulin 13005 Marseille  
Directeur : Pr. Xavier De LAMBALLERIE

Et de  
Dr Maxime RATINIER  
Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR 754 "Infections Virales et Pathologie Comparée.  
50 Avenue Tony Garnier 69007 Lyon  
Directrice : Dr. Fabienne ARCHER

*UMR 190 – Unité des Virus Emergents  
Aix-Marseille Université - IRD 190 – INSERM 1207 - EHESP – IHU Méditerranée  
Infection*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Xavier de Lamballerie qui m'a accordé sa confiance et m'a permis de reprendre mes études et de suivre cette formation au sein de son unité de recherche. Malgré la charge de travail considérable que l'ensemble de l'unité a dû encaisser à la suite de la Covid-19, il m'a permis à la fois de prendre part à beaux projets, mais aussi de pouvoir consacrer le temps nécessaire à la rédaction de ce mémoire. (Merci le full Access 24/24h 7/7 au bureau.)

Je remercie ensuite mon jury, le Dr Wilhelm Furnon et le Dr<sup>2</sup> Jean-Sélim Driouich, d'avoir répondu présent et d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Une pensée particulière pour le Dr. Sophie Gap-Lapiteau qui a été, à la fois, la rapportrice pour mon CRR et la présidente de ce jury. Vos conseils avisés m'ont permis de traverser des périodes sombres, merci. Merci au Dr Maxime Ratinier d'avoir été mon tuteur pédagogique.

Les remerciements que mérite le Dr Franck Touret pourraient à eux seuls, faire l'ensemble de cette page. Je vais toutefois essayer de rester concise. Merci pour ton implication, ta patiente et ta bienveillance. Merci de m'avoir conseillé cette formation et d'avoir été présent du tout tout début à la toute fin. De m'avoir accompagnée, remotivée, remontée le moral, entre autres, lors de mes moments d'introspection déprimantes ou de doute. Merci également de m'avoir offert ton temps sans compter et de m'avoir dit que tout irait bien quand je n'y croyais plus. Tu es le principal facteur qui a fait que j'ai pu terminer ce projet.

Un immense merci à Magali Gilles, la seule et l'unique, qui a été une oreille attentive et une comparse de tous les jours. Merci de m'avoir laissé Bitch-er sans jugement et de m'avoir ~~menacée~~ motivée quand je n'avais plus envie. Notre mariage sera merveilleux tkt le s.

Mont chaire daucteurre Polle, jeux te remessie deux mavoirre permize d'eux gaspié thon tant. Haie deux pô ments avoire voullu davoire failli teuh tuai pent dent le daimainagement dûe burôt, laurre deux mais meaumans d'eux feaullie naucturne. Mèressi pouvre tais reulectureux hais remmaniements de tèksste haie suretou pouvre toux neaux phou-rirre. Vue queue jeux pouré pô thaidé han reuttoure, coman thu va fèrre ?

Docteur Juju et futur docteur Max, merci à vous pour votre gentillesse et votre bonté. Vos explications et votre temps ont été précieux. Dobby n'oubliera pas ! Merci à Max, Pierrot, Polo, J-M et Antoine pour toutes ces pauses clopes qui se sont souvent éternisées et ont toujours dévié sur des sujets incongrus.

Merci à l'ensemble de l'unité, particulièrement au bureau 107 (les Best), de m'avoir supporté, y compris le « moi » qui rédige. Désolée pour les moments de folie mais merci pour : - la guerre, - les apéros, - les gâteaux, - les débats, - les fous rires et tout le reste dont je ne parlerai pas pour éviter d'éventuelles poursuites judiciaires. Merci à Sarah A., Camille, Cécile, Laura, Morgan, Soline et Léa, pour leurs encouragements et nos discussions philosophiques profondes, qui avaient toutes la même conclusion : il faut regarder John Wick/ Keanu Reeves est parfait. (Ce mémoire a déjà été envoyé, vous ne pouvez pas le modifier désolé pas désolé.) Jean-Sélim, d'avoir été une tête à coiffer dévouée. L'échange équivalent dont il a été question pour tes sessions de coiffure à volonté a abouti à ce mémoire du coup merci à toi. Au Dr Pastorino, aka Boris la « P.G.A.AMU », qui m'a appris à relativiser et aller de l'avant, mais surtout qui est devenu ma référence en termes de projet de vie.

Ce fut 2 années très riches en émotions, mais je n'aurai voulu les partager avec personne d'autre que vous.

Merci également à ma maman qui, même si elle ne savait pas vraiment dans quoi je m'embarquais, m'a soutenue. A mon père qui m'a poussé à ne rien lâcher, et mes sœurs qui ont été présentes pendant mes nombreux coups de blues.

## Table des matières

Remerciements .....	2
Liste des abréviations .....	6
Listes des figures .....	7
Listes des tableaux .....	8
Préambule.....	8
Introduction bibliographique.....	9
A. Coronavirus .....	9
1. Généralités.....	9
a. Classification .....	9
b. Génome .....	10
c. Structure .....	12
d. Cycle de réplication.....	13
2. Coronavirus Félin (FCoV).....	14
I. Histoire du virus .....	14
II. Ecologie du virus.....	15
a. Transmission et épidémiologie.....	15
III. Traitement et prévention.....	16
a. Traitement .....	16
b. Vaccin.....	18
3. Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-Cov-2) .....	18
I. Histoire du virus .....	18
II. Ecologie du virus.....	19
a. Transmission et épidémiologie.....	19
III. Traitement et prévention.....	21
a. Traitement .....	21
b. Vaccin.....	23
B. Arterivirus .....	25
1. Généralités.....	25
a. Classification .....	25
b. Génome .....	26
c. Structure .....	27
d. Cycle de réplication.....	28
2. Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) .....	29
I. Histoire du virus .....	29
II. Ecologie du virus.....	30
a. Transmission et épidémiologie.....	30

III.	Traitement et prévention.....	32
a.	Traitement .....	32
b.	Vaccin.....	33
C.	Flavivirus.....	34
1.	Généralités.....	34
a.	Classification .....	34
b.	Génome .....	35
c.	Structure .....	36
d.	Cycle de réplication.....	37
2.	Virus de l'encéphalite à tique (TBEV).....	39
I.	Histoire du virus .....	39
II.	Ecologie du virus.....	40
a.	Vecteur et épidémiologie.....	40
b.	Réservoir et transmission .....	42
III.	Traitement et prévention.....	44
a.	Traitement .....	44
b.	Vaccin.....	44
c.	Lutte anti-vecteur .....	45
D.	Systèmes de génétique inverse .....	45
1.	Clone infectieux .....	46
2.	Méthode « Infectious Subgenomic Amplicons » (ISA) .....	48
I.	Applications.....	50
a.	En recherche .....	50
b.	Clonalités des populations virales .....	51
	Objectifs du projet.....	52
	Matériel et méthode.....	53
A.	Design, production et purification des fragments ADNc .....	53
B.	Générations de virus recombinants (Méthode ISA) .....	57
1.	Souches virales et sérums humains .....	57
2.	Culture cellulaire .....	57
3.	Transfection cellulaire.....	58
4.	Détection et production virale .....	60
C.	Titration souches virales.....	60
1.	Dosage de la dose infectieuse 50 de culture tissulaire - TCID50 .....	60
2.	TCID50 lecture en fluorescence.....	61
D.	Immunofluorescence directe (dIFA) .....	61
E.	Dose réponse / EC50 / EC90.....	61

F. Cinétique de croissance .....	62
G. Criblage primaire de la banque de molécules Prestwick (1520 composés).....	63
H. Séquençage.....	63
I. Analyse statistique.....	67
Résultats .....	68
A. FeCoV et SARS-CoV-2 (Mélade, Piorkowski, Touret, et al. 2021) .....	68
1. Principes généraux .....	68
I. Génération FeCoV.....	68
II. Génération de SARS-CoV-2 .....	70
a. Génération SARS-CoV-2 ISA européen .....	71
b. Génération de la souche D614 SARS-CoV-2.....	71
c. Génération d'un SARS-CoV-2 fluorescent.....	71
2. TCID50.....	72
3. Séquençage.....	73
4. Cinétique de répliation.....	74
5. Tests de neutralisation et antiviraux utilisant le SARS-CoV-2 D614 mCherry .....	75
6. Discussion .....	79
B. PRRSV (Mélade, Piorkowski, Bouzidi, et al. 2021) .....	82
1. Alignement et analyse phylogénétique.....	82
2. Génération du virus .....	84
3. Cinétique de répliation.....	86
4. Discussion .....	88
C. TBEV : .....	91
1. Génération d'un TBEV fluorescent.....	91
2. Cinétique de répliation.....	93
3. Evaluation de la chimiothèque Prestwick utilisant le TBEV fluorescent mCherry.....	95
4. Discussion .....	97
Conclusion générale et perspectives.....	99
Références .....	104
Annexe : .....	114

## Liste des abréviations

Aa : acide aminé	ORF : open reading frame = cadre de lecture ouvert
ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine de type II	PC : Plasma de convalescents
ARNsg : ARN sous génomique	PIF : péritonite infectieuse féline
ARN : L'acide ribonucléique	PRRS : Porcine reproductive and respiratory syndrome
ARNase/RNase : ribonucléase qui catalyse la dégradation de l'ARN en éléments plus petits	PRRSV : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
ARNg : ARN génomique	RA1: Rat artérvirus 1
ARNm : ARN messenger	RBD : Receptor Biding Domain
CCV : Coronavirus canin	RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante
LDV : Lactate dehydrogenase-elevating virus	RER : réticulum endoplasmique rugueux
WPDV : Wobbly possum disease virus	RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction
EAV : Equine arteritis virus	RTC : complexe de réplication-transcription
APRAV : African pouched rat arterivirus	TGEV : Coronavirus de la gastro-entérite transmissible
GP5 : glycoprotéine 5	TMPRSS2 : TransMembrane PRoteaSe Serine 2
HAdV-26 : adénovirus humain de type 26	UTR : untranslated regions
HAdV-5 : adénovirus humain de type 5	Virus P2 : virus de classe 2
HCoV-229E : Le coronavirus humain 229E	VR-2332 : Highly Virulent North American-Type Isolate of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
HP-PRRSV : high pathogen Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	VRS : Le virus respiratoire syncytial
Kb : kilobase	
MLV : Modified Live virus : Virus vivant atténué	
Nsps : les protéines non structurales	
NTD : N-Terminal Domain	
OMS : Organisation mondiale de la santé	

## Listes des figures

FIGURE 1 : ARBRE PHYLOGENETIQUE SCHEMATIQUE DE L'ORDRE DES <i>NIDOVIRALES</i> . .....	9
FIGURE 2 : ARBRE PHYLOGENETIQUE PARTIEL DE LA FAMILLE DES ALPHA ET BETA CORONAVIRUS. ....	10
FIGURE 3 : CYCLE DE REPLICATION VIRAL ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DU GENOME DE CORONAVIRUS. ....	11
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DU CORONAVIRUS .....	13
FIGURE 5 : INSTANTANE EN DATE DU 25/08/2022 DE L'EPIDEMIOLOGIE GENOMIQUE DU SARS-COV-2 AVEC LES SOUS-LIGNAGES A L'ECHELLE MONDIALE DEPUIS DECEMBRE 2019, D'APRES NEXTSTRAIN.ORG.....	21
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT DES VACCINS CONTRE LA COVID-19. ....	24
FIGURE 7 : STRUCTURE GENOMIQUE DU PRRSV.....	26
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PARTICULE VIRALE D'UN ARTERIVIRUS (LABORATORIOS HIPRA 2018). ....	27
FIGURE 9 : LE CYCLE DE REPLICATION DES ARTERIVIRUS. (MA ET AL. 2021).....	29
FIGURE 10 : DISTRIBUTION MONDIALE DU PRRSV ET TRANSMISSION INTERCONTINENTALE HYPOTHETIQUE (KO ET AL. 2015) .....	31
FIGURE 11 : CONSEQUENCES ECONOMIQUES DU PRRSV DANS L'INDUSTRIE PORCINE (LABORATORIOS HIPRA 2018).....	32
FIGURE 12 : STRUCTURE DU GENOME DU TBEV (LINDENBACH ET AL. 2013) .....	36
FIGURE 13 : STRUCTURE DU VIRION DE FLAVIVIRUS. ....	37
FIGURE 14 : CYCLE DE REPLICATION DES FLAVIVIRUS. (PIERSON ET DIAMOND 2020).....	39
FIGURE 15 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU VIRUS DU TBEV ET DE CES VECTEURS.....	41
FIGURE 16 : RÉPARTITION DES CAS CONFIRMÉS DE TBEV POUR 100 000 HABITANTS EN EUROPE EN 2019 (ECDC 2021).....	41
FIGURE 17 : NOMBRE DE CAS REPORTES DE TBEV EN FRANCE (ECDC 2021). ....	42
FIGURE 18 : CYCLE NATUREL DE LA TIQUE ET TRANSMISSION DU TBEV AUX MAMMIFERE. ADAPTEE DE (LICKOVA ET AL. 2022). ....	43
FIGURE 19 : SCHEMA RESUMANT LES DIFFERENTES ETAPES DE LA METHODE DU CLONE INFECTIEUX .....	47
FIGURE 20 : SCHEMA RESUMANT LES DIFFERENTES ETAPES DE LA METHODE « INFECTIOUS SUBGENOMIC AMPLICONS ». ....	49
FIGURE 21 : METHODE ISA POUR GENERER LE FeCoV.....	69
FIGURE 22 : METHODE ISA UTILISEE POUR OBTENIR LES SARS-CoV-2 RECOMBINANTS. ....	70
FIGURE 23 : ELECTROPHORESE SUR GEL DU GENE RAPPORTEUR MCHERRY DE LA SOUCHE ISA D614 MCHERRY SARS-CoV-2.....	72
FIGURE 24 : ELECTROPHORESE SUR GEL DES GENES CODANTS POUR LES PROTEINES S, N, M, E DES SOUCHES DE SARS-CoV-2. ....	73
FIGURE 25 : CINETIQUE DE REPLICATION VIRALE DES SOUCHES CLINIQUE ET ISA. ....	75
FIGURE 26 : ANALYSE PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE DES SOUCHES ISA D614 ET ISA D614 M CHERRY DE SARS-CoV-2. ....	76
FIGURE 27 : CORRELATION ENTRE LES TITRES D'ANTICORPS NEUTRALISANTS (NAb) REALISES AVEC LES SOUCHES ISA D614 ET D614 MCHERRY DU SARS-CoV-2 .....	77
FIGURE 28 : ACTIVITE ANTIVIRALE DU REMDESIVIR SUR LE SARS-CoV-2 DANS LES CELLULES VEROE6. ....	78
FIGURE 29 : FLUORESCENCE DU SARS-CoV-2 MCHERRY AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE REMDESIVIR. ....	79
FIGURE 30 : METHODE ISA UTILISEE POUR GENERER DES VIRUS PRRSV ISA. ....	82
FIGURE 31 : ARBRE PHYLOGENETIQUE BASE SUR PRRSV ORF5.....	83
FIGURE 32 : IMAGE DU GEL DES FRAGMENTS DE PRRSV APRES PCR.....	84
FIGURE 33 : ANALYSE PAR MICROSCOPIE DE L'ISOLAT D'ORIGINE ET DE LA SOUCHE ISA DU PRRSV SUR DES CELLULES MARC-SN.....	85
FIGURE 34 : CINETIQUE DE REPLICATION VIRALE DE L'ISOLAT D'ORIGINE ET DE LA SOUCHE ISA. ....	86
FIGURE 35 : IMAGE DU GEL APRES ELECTROPORATION DES PRODUITS DE RT-PCR DES SOUCHES DE PRRSV. ....	87
FIGURE 36 : METHODE ISA UTILISEE POUR OBTENIR LES TBEV HYPR MCHERRY RECOMBINANTS.....	91
FIGURE 37 : FLUORESCENCE DU TBEV HYPR MCHERRY DANS DES CELLULES BHK-21. ....	92
FIGURE 38 : IMAGE DE LA LECTURE FLUORESCENTE DE LA TCID <sub>50</sub> DE LA SOUCHE TBEV HYPR MCHERRY. ....	93
FIGURE 39 : CINETIQUE DE REPLICATION VIRALE DU TBEV HYPR MCHERRY.....	94
FIGURE 40 : PLAN DE PLAQUE DU CIBLAGE DES MOLECULES ANTIVIRALES.....	95
FIGURE 41 : CIBLAGE DE 1520 COMPOSES AYANT DEJA EU UNE AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE (PRESTWICK CHEMICAL LIBRARY®) ET SELECTION DES « HITS ». ....	96

## Listes des tableaux

TABLEAU I : TAILLES DES FRAGMENTS D'ADNSG ET SEQUENCES DES AMORCES FECoV. ....	55
TABLEAU II : TAILLES DES FRAGMENTS D'ADNSG ET SEQUENCES DES AMORCES DU PRRSV .....	55
TABLEAU III : TAILLES DES FRAGMENTS D'ADNSG ET SEQUENCES DES AMORCES DU TBEV HYPR. ....	56
TABLEAU IV : TAILLES DES FRAGMENTS D'ADNSG ET SEQUENCES DES AMORCES DU SARS-COV-2. ....	56
TABLEAU V : POSITION ET SEQUENCE DES AMORCES SPECIFIQUES POUR L'AMPLIFICATION DU FECoV .....	65
TABLEAU VI : POSITION ET SEQUENCE DES AMORCES SPECIFIQUES POUR L'AMPLIFICATION DU PRRSV.....	65
TABLEAU VII : POSITION ET SEQUENCE DES AMORCES SPECIFIQUES POUR L'AMPLIFICATION DU TBEV HYPR.....	66
TABLEAU VIII : POSITION ET SEQUENCE DES AMORCES SPECIFIQUES POUR L'AMPLIFICATION DU SARS-COV-2.....	66
TABLEAU IX : CARACTERISATION <i>IN VITRO</i> DES SARS-COV-2 ET FECoV RECOMBINANTS. ....	73
TABLEAU X : SEQUENÇAGE COMPLET DE L'ISOLAT ORIGINAL DE PRRSV. . ....	84
TABLEAU XI : COMPARAISON DE L'ARN VIRAL ET DU TITRE INFECTIEUX ENTRE L'ISOLAT D'ORIGINE ET LA SOUCHE ISA.....	85
TABLEAU XII : CARACTERISATION GENOTYPIQUE ET ANALYSE COMPLETE DU GENOME DE LA SOUCHE PRRSV ISA. ....	88
TABLEAU XIII : CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA SOUCHE TBEV HYPR ET HYPR MCHERRY ISA. ....	92

## Préambule

Le laboratoire de recherche où j'effectue mon stage, l'Unité des Virus Emergents (UVE) – UMR 190 dirigée par le Pr. De Lamballerie, est spécialisée dans la réponse aux émergences virales. L'UVE possède un solide domaine d'expertise pour les Arbovirus, les fièvres hémorragiques et depuis 2017 pour les coronavirus animaux et humains. Les thématiques principales au sein du laboratoire sont la séro-épidémiologie et la mise au point et l'étude de thérapeutiques antiviraux. La réponse aux émergences, en termes de thérapeutiques, peut être soit (i) le développement rapide d'un vaccin, soit (ii) le criblage rapide et la caractérisation de molécules antivirales. Pour aborder ces deux approches, le laboratoire a développé et breveté une méthode rapide et simple de génétique inverse, nommée « Infectious Subgenomic Amplicons » (ISA). Déjà validée au laboratoire avec succès pour la production de Flavivirus, elle a par la suite été appliquée avec succès à des Alphavirus et à des Coronavirus. De plus, le laboratoire est impliqué dans de nombreux projets antiviraux contre différents pathogènes via sa plateforme de criblage PCVMT (Plateforme Criblage Virale Marseille Timone). Mon projet s'inscrit au départ dans une démarche d'amélioration d'ISA, mais a vraiment pris une autre dimension lors de l'émergence du SARS-COV-2. Durant laquelle, tous les pôles du laboratoire (séro-épidémiologie, expérimentation animale, antiviraux etc.) ont été extrêmement sollicités. Il est alors paru évident que le développement de nouveaux outils, permettant d'augmenter le rendement des résultats tout en réduisant le coup des expérimentations menées, était nécessaire. C'est donc avec ce besoin de rendre la méthode ISA plus compétitive et robuste, ainsi que de l'appliquer concrètement aux pôles de l'unité, que mon projet a commencé sous la supervision du Dr. TOURET.

# Introduction bibliographique

## A. Coronavirus

### 1. Généralités

#### a. Classification

Les Coronavirus (CoVs) appartiennent à la famille des *Coronaviridae*, qui, avec les *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* et *Roniviridae* forment le grand ordre des *Nidovirales*.

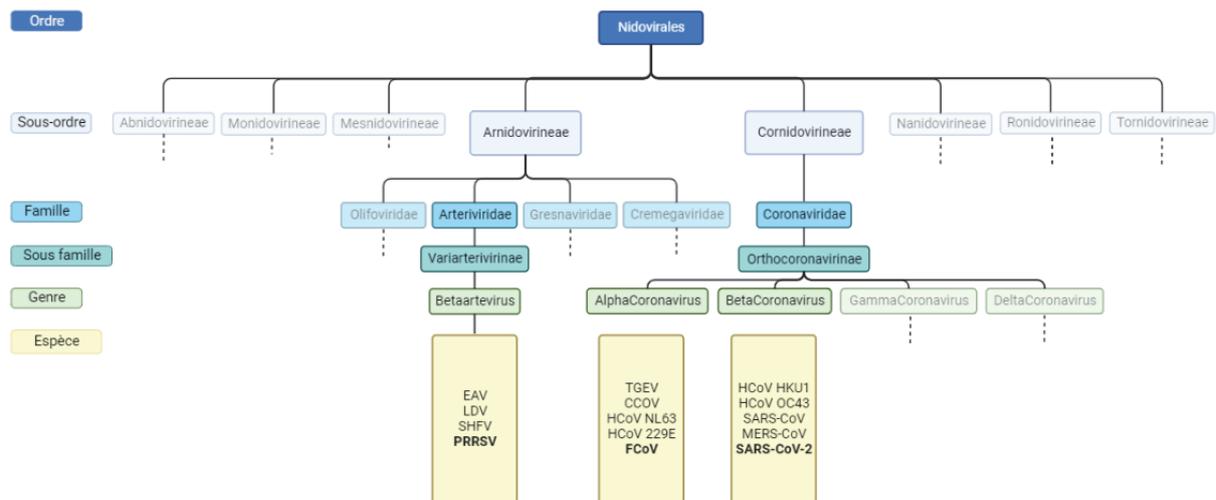


Figure 1 : Arbre phylogénétique schématisé de l'ordre des *Nidovirales*. Depuis Biorender

La famille des *Coronaviridae* est sous-divisée en deux sous-familles, les *Coronavirinae* et les *Torovirinae*. Les *Coronavirinae* sont phylogénétiquement regroupés en quatre genres, les coronavirus alpha, bêta, gamma et delta (A. R. Fehr et Perlman 2015). Au sein du genre Alphacoronavirus, les coronavirus félins (FeCoV) font partie de l'espèce Alphacoronavirus 1, cette dernière contient également d'autres virus étroitement apparentés, tels que les coronavirus canins (CCoV) et le virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV) coronavirus respiratoire humain (HCoV-229E), le coronavirus respiratoire du porc (PRCV), le coronavirus du lapin (RbCV) et le coronavirus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV). En ce qui concerne le SARS-CoV-2, il appartient au genre Betacoronavirus, au sous-genre des Sarbecovirus, et à l'espèce Severe acute respiratory syndrome related coronavirus (SARSr-CoV) qui comprend également le SARS-CoV (Zhu et al. 2020; Lamers et Haagmans 2022). (Figure 2)

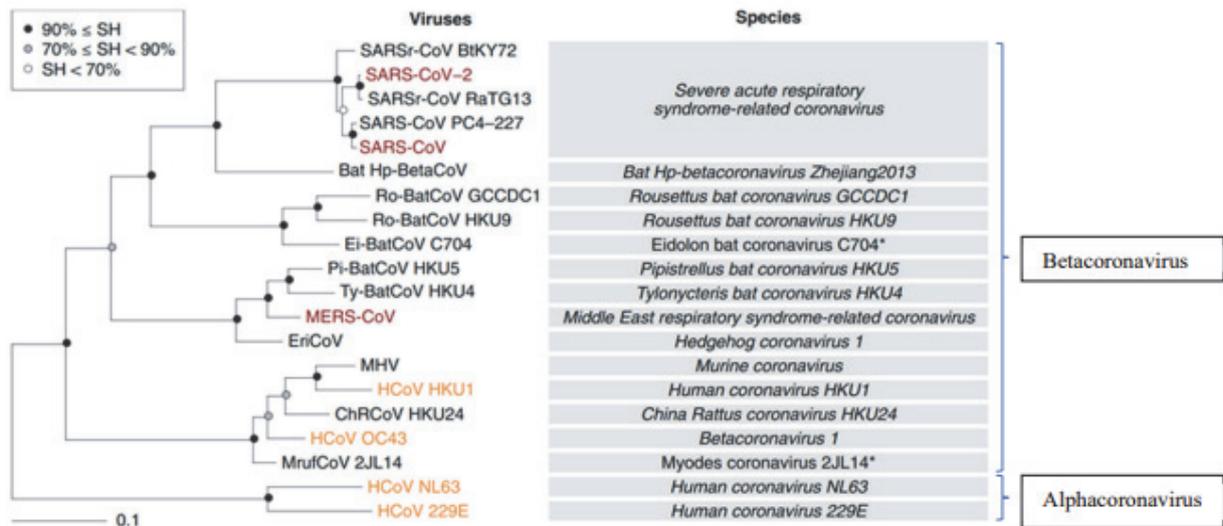


Figure 2 : Arbre phylogénétique partiel de la famille des alpha et beta coronavirus. Sont représentés en jaune et rouge les virus humains. Extrait de (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2020)

## b. Génome

Il y a une grande conservation des caractéristiques virales au sein de l'ordre des *Nidovirales* auquel appartiennent les coronavirus. Ce sont des virus enveloppés à ARN positifs non segmentés. Ces virus possèdent des génomes complexes et très long, pour des virus à ARN, pouvant aller jusqu'à 33,5 kb ainsi qu'une organisation génomique hautement conservée. Le gène de la réplicase occupe les trois-quarts du génome et comprend de nombreuses protéines non structurales. Egalement, on retrouve la présence de plusieurs cadres de lecture. Les principales différences au sein des familles de *Nidovirales* résident dans le nombre, le type et la taille des protéines structurales.

Les Coronavirus contiennent un génome à ARN positif, monocaténaire, non segmenté d'environ 30 kb. Le génome est coiffé en 5' et polyadénylé en 3', la coiffe lui permettant d'être directement reconnu comme ARNm au sein de la cellule et être traduit.

On dénombre 14 ORFs (cadre de lecture ouvert) de taille très variable, puisque les gènes ORF1a et ORF1b occupent les deux tiers du génome, soit environ 20 kb et codent l'ensemble des protéines formant le complexe de réplication viral, tandis que le dernier tiers permet de coder les protéines structurales de la Spike (S), de l'enveloppe (E), de la membrane (M), de la nucléocapside (N) et les protéines accessoires.

(Figure 3)

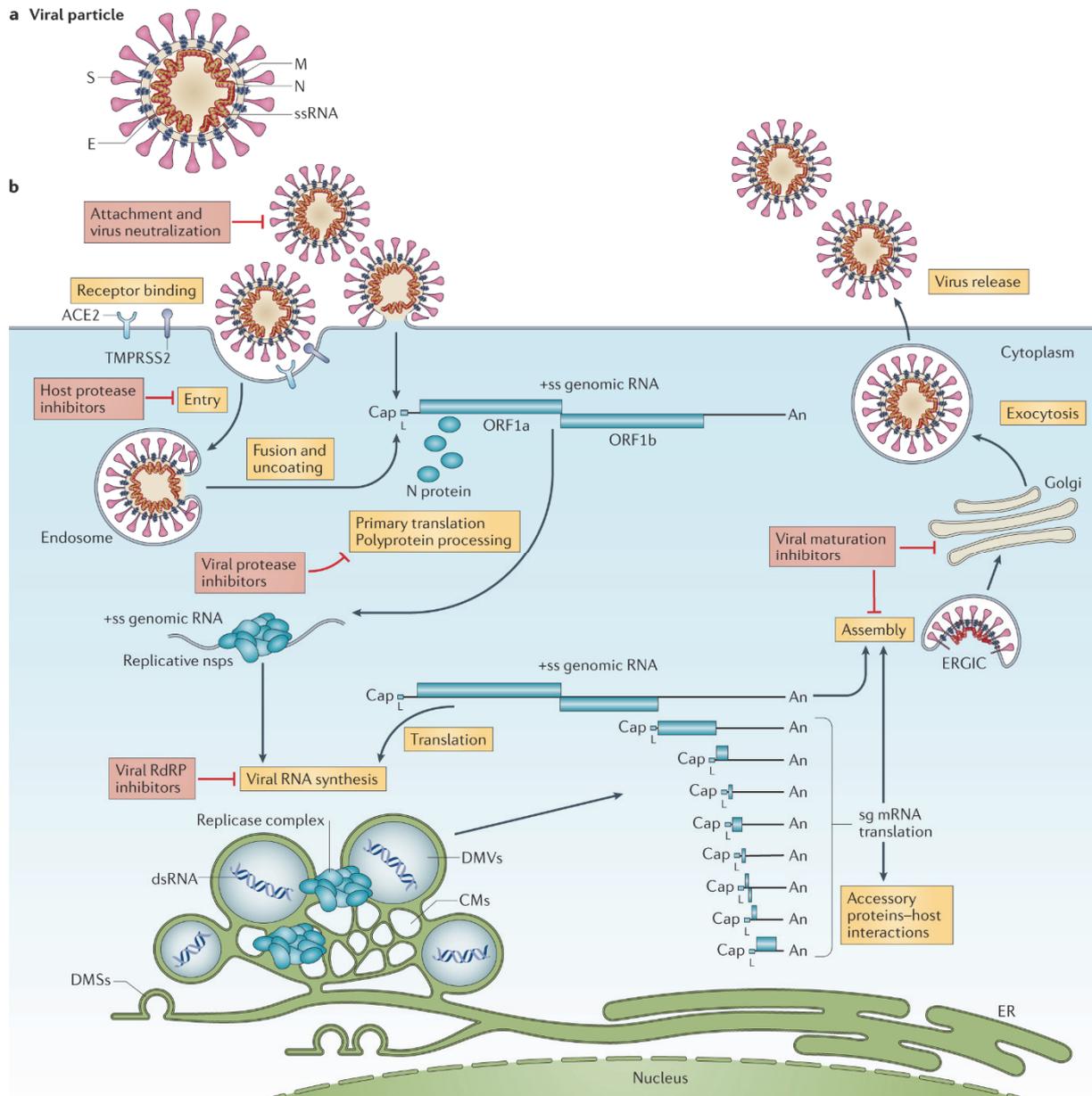


Figure 3 : Cycle de réplication viral et représentation schématique de l'organisation du génome de coronavirus. Elle est définie comme la suivante : 5'-leader-UTR-replicase-S-E-M-N-3'UTR-queue polyA. (Kim et al. 2020)

### c. Structure

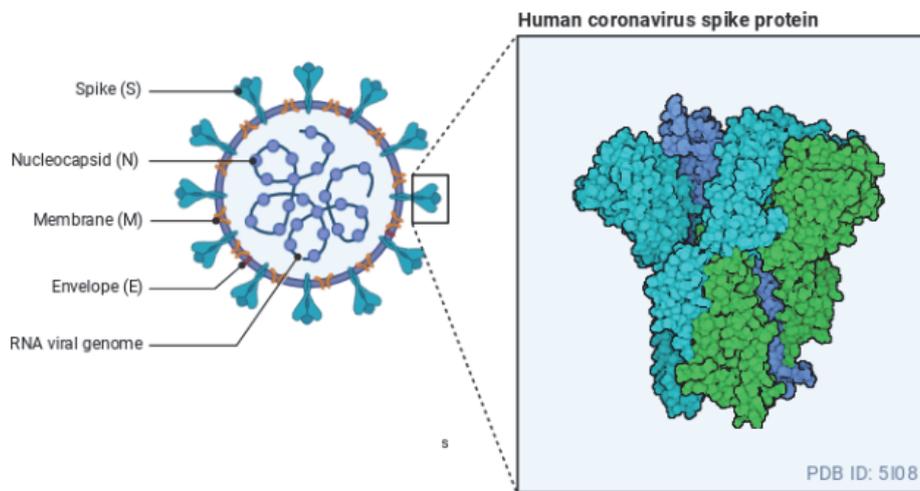
Les coronavirus sont des virus enveloppés plus ou moins sphériques, polymorphes dont la taille peut aller de 60 à 200 nm de diamètre (Wege, Siddell, et ter Meulen 1982). La ribonucléoprotéine (RNP), entourée d'une enveloppe lipidique, est contenue dans le virion. Elle est constituée de l'ARN génomique (env. 30kb) et de la protéine de la nucléocapside N (env. 400 acides aminés (aa)).

La glycoprotéine S est composée de 2 sous-unités. La sous-unité S1 possède également 2 domaines, le domaine N-terminal (NTD) et un domaine permettant l'attachement à la cellule, le domaine de liaison au récepteur (RBD). La sous-unité S2 possède 4 domaines impliqués dans l'attachement, la fusion avec la membrane et l'entrée dans la cellule (Souza et al. 2021). La protéine E est une protéine transmembranaire qui est nécessaire pour l'assemblage, la maturation et la morphogénèse virale (Schoeman et Fielding 2019). La protéine M est présente à la surface du virus sous forme d'homo-dimère. Elle a un rôle dans la forme et l'assemblage des particules virales, car elle peut interagir avec les protéines E, S, N, mais aussi avec d'autres protéines dimères M (Neuman et Buchmeier 2016). La protéine N est la plus abondante, en association à l'ARN viral, elle forme une ribonucléoprotéine. Elle joue un rôle dans l'assemblage des particules virales.

Les protéines non structurales (nsp) sont au nombre de seize. De manière générale, la nsp1 et 15 sont impliquées dans l'échappement immunitaire. La nsp 3 est une protéine multifonctionnelle qui possède, d'une part une activité protéasique essentielle à la réplication virale via sa protéase de type papaine (PLpro), qui associée à la protéase de type 3C (3Cpro) présente dans la nsp 5, permettent le clivage des ORF 1a et 1b et ainsi d'obtenir des nsp fonctionnelles (Alomair et al. 2022). D'autre part, la nsp 3 a un rôle dans la maturation des virions tout comme les nsp 4 et 6. Les nsp 7, 8 et 9 permettent d'améliorer la fixation à l'ARN et d'augmenter le rendement de catalyse de nsp12. La nsp12 quant à elle, de par son activité de ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), facilite la production de nouveaux virus. La nsp 13 permet de rendre accessible l'ARN lors de la réplication. La nsp 14 permet à la fois d'éviter la dégradation des ARNm viraux par des RNase cellulaire, de recruter des ribosomes, mais aussi de corriger les erreurs de réplication et d'exciser les analogues nucléotidiques utilisés comme antiviraux. La nsp 16 en association à la nsp 10 forme un complexe protéique. Celui-ci permet à l'ARN viral d'imiter les ARNm cellulaires et ainsi empêcher leur reconnaissance par l'immunité innée de l'hôte (Shu et al. 2020; Shannon et al. 2020).

Egalement, au moins cinq ORF codent des protéines accessoires : les ORF 3a, 6, 7a, 7b et 8 et potentiellement les ORF 3b et 9b (Davidson et al. 2020). Cependant, tous ces ORFs n'ont pas encore été étudiés expérimentalement. Ils sont supposés jouer un rôle important dans l'échappement immunitaire (V'kovski et al. 2021).

La protéine M, très abondante, d'environ 230aa, la protéine d'enveloppe E d'environ 100aa présente en faible quantité, et la Spike d'environ 1300aa formant des péplomères trimériques, sont ancrées dans l'enveloppe. Ces péplomères sont responsables de la liaison aux récepteurs et de la fusion membranaire. Ils s'étendent radialement à partir de l'enveloppe. (Figure 4)



**Figure 4** : Représentation schématique de la structure du Coronavirus ainsi que la structure 3D de la protéine Spike - Depuis Biorender

#### d. Cycle de réplication

L'interaction entre le domaine RBD (Receptor Binding Domain) de la protéine Spike et le récepteur cellulaire ACE (Enzyme de conversion de l'angiotensine de type II) amorce le processus d'entrée du virus dans la cellule. L'entrée, quant à elle, peut se dérouler, *in vitro*, de 2 manières différentes suivant les propriétés biologiques conférées par la Spike et si la cellule exprime ou non la protéase TMPRSS2 (TransMembrane PRotease, Serine 2) (Figure 3).

Si la cellule exprime la protéase TMPRSS2 alors une succession de clivages de la protéine Spike va conduire à la fusion des membranes. Les clivages entraînent un réarrangement de conformation qui conduit à l'exposition du peptide de fusion qui va s'insérer dans la membrane cellulaire de l'hôte et permettre la fusion des membranes et la libération de la capsid dans le cytoplasme. (Mohan et Wollert 2021).

Si la protéase n'est pas exprimée, l'entrée se fera par endocytose clathrine-dépendante, suivie d'une maturation sous l'action d'enzymes endosomales, aboutissant à la fusion des membranes virale et endosomale et permettant de libérer l'ARN viral dans le cytoplasme. (Hoffmann et al. 2020). Une fois libéré dans le cytosol, l'ARN viral se désolidarise des nucléoprotéines N et est traduit en deux polyprotéines, pp1a et pp1ab, qui permettront à leur tour de cliver et de libérer les nsp.

Une fois le RTC (complexe de réplication-transcription) assemblé, la réplication de l'ARN viral commence grâce à l'intermédiaire d'un brin à polarité négative complémentaire du génome. Les gènes situés après les ORF1a et ORF1ab sont transcrits en 9 ARN subgénomique (sg). (Kim et al. 2020). Ces ARNsg sont ensuite traduits par les ribosomes de la cellule hôte pour donner les protéines structurales : S, E, M et N. Les protéines structurales, à l'exception de la protéine N, sont adressées au réticulum endoplasmique (RE) en raison de leur nature transmembranaire. La nucléocapside est ensuite formée dans le cytosol par assemblage de l'ARN génomique et de protéines N. S'en suit un bourgeonnement dans la lumière du compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique-Golgi, où viennent s'ajouter les autres protéines structurales, présentes dans la membrane du RE, puis la particule virale est libérée de la cellule par exocytose (Atri et al. 2020). (Figure 3)

## 2. Coronavirus Félin (FCoV)

### I. Histoire du virus

Les coronavirus félines (FCoV) sont omniprésents dans les populations de chats domestiques. Habituellement, les chats sont infectés par le coronavirus entérique félin (FeCoV) qui un biotype entérique du FCoV et restent le plus souvent asymptomatiques ou présentent une simple entérite (N. C. Pedersen et al. 1981). Le FeCoV est excrété dans les matières fécales 9 à 10 semaines post-infection (Niels C. Pedersen, Allen, et Lyons 2008). La contamination se fait de manière oro-fécale et cible l'épithélium intestinal. Les premiers signes d'entérite sont légers ou inapparents (Niels C. Pedersen, Allen, et Lyons 2008; Vogel et al. 2010). L'immunité est de courte durée et non stérilisante et les infections récurrentes sont fréquentes (Niels C. Pedersen et al. 2016). L'immunité se développe et augmente avec l'âge et les chats âgés de plus de 3 ans sont moins susceptibles d'excréter le virus dans leurs selles (Addie et al. 2003). Le FeCoV subit continuellement une dérive génétique en clades identifiables localement et régionalement (Herrewegh et al. 1997; Niels C. Pedersen 2009). En cas d'infection chronique ou intermittente,

des mutations (délétions) génomiques surviennent dans l'ORF 3c et conduisent à un l'émergence d'un mutant plus virulent : le virus de la péritonite infectieuse féline (PIFV) (Vennema et al. 1998; Le Poder 2005). Ce mutant possède un tropisme cellulaire différent du FeCoV et est responsable d'une maladie systémique très grave appelée péritonite infectieuse féline (PIF) (Poland et al. 1996; Vennema et al. 1998; Niels C. Pedersen 2009).

Le virus de la PIF (PIFV) est un agent infectieux félin décrit pour la première fois en 1963 par des vétérinaires de l'Angell Memorial Animal Hospital de Boston (Holzworth 1963). Bien qu'il ne soit pas efficacement transmis entre individus, le PIFV est très virulent. En effet en infectant efficacement les macrophages et les monocytes, les particules virales PIFV peuvent sortir de l'intestin et ainsi provoquer une maladie systémique mortelle avec atteinte de plusieurs organes, accompagnée fréquemment d'un épanchement abdominal. Ainsi, les premières descriptions cliniques chez l'animal font état de deux formes de PIF : humide et sèche. La première, est caractérisée par une inflammation diffuse des tissus tapissant la cavité péritonéale et des organes abdominaux, accompagnés d'un épanchement de liquide inflammatoire important (Wolfe et Griesemer 1971). La seconde forme, moins fréquente, se manifeste par des lésions granulomateuses moins diffuses et plus étendues impliquant le parenchyme des organes, décrite pour la première fois en 1972 (Montali et Strandberg 1972). L'agent viral a été isolé et identifié pour la première fois en 1970 et classé par la suite phylogénétiquement au sein des Alphacoronavirus (Ward 1970).

## II.Écologie du virus

### a. Transmission et épidémiologie

Dans les conditions naturelles, la transmission du FeCoV a lieu par voie oro-fécale, avec une inoculation oro-nasale directe du virus, ou via des supports passifs tels que le bac à litière ou des surfaces contaminées. Après inoculation, le FeCoV infecte les entérocytes, où a lieu la réplication virale. Les infections par le FeCoV sont souvent asymptomatiques, mais peuvent entraîner de légères diarrhées transitoires puisque le virus impacte l'épithélium intestinal.(Barlough et al. 1985)

Le FeCoV étant très contagieux, dans les foyers où il est présent, la prévalence des anticorps indiquant une exposition est souvent proche de 100 %, néanmoins seulement 5 % des chats développent une péritonite infectieuse féline (PIF). La PIF est souvent décrite comme une maladie présente dans des environnements denses en présence de chat comme les élevages.

En conséquence, la présence de chats infectés, même de manière asymptomatique, peut être une source de danger pour les autres individus et peut provoquer à l'apparition de la PIF dans la population. Et bien que les chats de tout âge et de toute race peuvent développer une PIF, il a été montré que la PIF affecte d'avantage les chats de race de moins de deux ans. (Rohrbach et al. 2001).

Cependant, il ne faut pas exclure le fait qu'une souche de coronavirus bénigne puisse quand même provoquer une PIF, selon l'individu infecté, en raison de facteurs de susceptibilité (âge, infection concomitante, facteurs génétiques). Il est également possible qu'un animal initialement infecté par une souche FeCoV développe une PIF suite à une mutation génétique au cours de la multiplication virale (Vennema et al. 1998).

La PIF est présentée comme l'une des plus importantes causes infectieuses de décès chez les chats, bien qu'il n'existe pas de chiffres précis sur sa prévalence. On estime que 0,3 à 1,4 % des décès de chats présentés aux institutions vétérinaires sont associés à la PIF (Rohrbach et al. 2001; Pesteanu-Somogyi, Radzai, et Pressler 2006; Riemer et al. 2016), et jusqu'à 3,6-7,8 % dans certains refuges et chatteries (Cave et al. 2002).

### III. Traitement et prévention

#### a. Traitement

Pour les chats sains mais séropositifs pour le FeCoV, aucune donnée ne permet de conclure quant à l'utilisation d'un traitement préventif contre l'évolution de l'infection du FeCoV en PIF. Quant aux symptômes gastriques provoqués par le FeCoV, ils sont traités avec un traitement symptomatique (réhydratation et alimentation adaptée).

Concernant les chats présentant des symptômes de la PIF, plusieurs approches de traitement ont été testées, mais aucune n'est encore validée. Voici une liste non exhaustive des plus utilisées.

- **Inhibiteurs de protéase**

Une autre approche thérapeutique prometteuse est de cibler la protéase virale pour traiter la PIF. En effet en bloquant le clivage protéolytique des précurseurs protéiques nécessaires à la production de particules virales, on bloque la réplication. (Kim et al., 2013) (Kim et al., 2016). Une étude a montré que le GC376, un inhibiteur sélectif de la protéase des coronavirus, était prometteur dans le traitement des chats atteints de certaines présentations de PIF et a permis d'ouvrir la porte à une thérapie médicamenteuse antivirale ciblée (Niels C Pedersen et al. 2018).

- **Analogues nucléosidiques**

Un autre traitement prometteur est l'utilisation d'analogues nucléosidiques qui agissent comme un substrat alternatif pour la synthèse de l'ARN viral, entraînant la terminaison de la chaîne d'ARN lors de la transcription de l'ARN viral via l'inhibition de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN. L'un de ces analogues est le composé GS-441524 (qui est le deuxième médicament antiviral ciblé développé après le GC376), il ne présente pas de toxicité *in vitro* et a permis l'inhibition efficace de la réplication virale de souches FeCoV associées à la PIF dans plusieurs échantillons isolés cultivés dans des systèmes différents. (Murphy et al., 2018). Ce composé a également été évalué dans une étude de terrain sur 31 chats atteints de la PIF (Pedersen et al., 2019) lors de laquelle il a été injecté par voie sous-cutanée. Les résultats de l'étude étaient prometteurs puisque 25/31 chats traités ont survécu et n'ont pas présenté de signe de rechute. Mais le mode d'utilisation du GS-441524 pour traiter la PIF évoluent en permanence (la dose, la durée, la surveillance et les éventuels effets secondaires) (Pedersen, 2021b). De plus malgré les nombreux résultats encourageants des études menées depuis 2018, les laboratoires Gilead (« propriétaire » de la molécule GS-441524) ont préféré se concentrer sur le développement du Remdesivir (molécule leur appartenant aussi) en médecine humaine lors de l'épidémie de SARS-CoV-2. Le développement de GS-441524 en médecine vétérinaire a donc été ralenti mais de nouvelles études ont été publiées en 2022 (Krentz et al. 2022; Roy et al. 2022). Ce ralentissement a provoqué la vente à grande échelle de molécules similaires au marché noir en Chine (où la PIF a une prévalence extrêmement importante). En 2019, des milliers de chats chinois ont reçu le composé GS-441524 sans que des données fiables d'efficacité aient pu être formellement collectées (S. Zhang 2020).

- **Remdesivir**

Le remdesivir, GS-5734, un promédicament du GS-441524, a été suggéré comme traitement des maladies respiratoires à coronavirus chez l'homme lors de la crise sanitaire due au SARS-CoV-2, (Beigel et al., 2020 ; Williamson et al., 2020) et a aussi été envisagé pour le traitement des coronavirus félines (Izes et al., 2020c). Le remdesivir est transformé par les cellules infectées en principe actif GS-441524. Néanmoins l'innocuité et l'efficacité du remdesivir pour lutter contre la PIF chez les chats n'ont pas pu être démontrés (Pedersen, 2020b), cela malgré des preuves anecdotiques basées sur la description de cas de terrain pour lesquels un traitement au remdesivir en injection aurait été efficace (Spanner, 2020).

Encore récemment, la PIF était considérée comme incurable. Toutefois, aux Etats-Unis, en Chine ou encore dans certains pays d'Europe, des traitements sont testés et mis en place (GS-

441524). Mais ce médicament n'étant pas encore homologué en France, les vétérinaires ne sont actuellement pas autorisés à l'administrer. En attendant, des mesures pour soulager les symptômes cliniques sont utilisées afin d'atténuer la souffrance des chats.

## b. Vaccin

Actuellement, un seul vaccin commercial, Primucell FIP de Pfizer, est disponible pour aider à protéger les chats contre les infections par le FIPV et le FeCoV (Christianson et al. 1989). Il s'agit d'un mutant MLV, thermosensible, produit grâce à l'atténuation de l'isolat virulent original de la souche FIPV-DF2 (virus P2) par passage successif dans des cultures cellulaires à basse température. Le mutant thermosensible se multiplie à faible température (celle de l'appareil respiratoire supérieur). Primucell FIP est autorisé pour une administration intranasale, avec deux doses administrées à 3-4 semaines d'intervalle chez les chats âgés d'au moins 4 mois. Une revaccination annuelle est recommandée par le fabricant. Ce vaccin stimule les titres d'anticorps locaux IgA et VN dans le sérum (Gerber et al. 1990; Gerber 1995).

Si le vaccin est considéré comme sûr, puisqu'il ne provoque ni PIF, ni aggravation des symptômes par l'intermédiaire d'une augmentation du taux d'anticorps, son efficacité, elle, est contestée. En effet, il est inefficace sur des chats déjà séropositifs et comme la prévalence de la maladie est très élevée son champ d'action est très restreint. De plus, l'inconvénient majeur reste que la plupart des chats vaccinés deviennent séropositifs au FeCoV, ce qui empêche tout contrôle ultérieur de l'évolution de la prévalence de la maladie.

Le vaccin n'est pas encore disponible en France même si les risques de la vaccination avec Primucell FIP semblent être minimes. La nature grave, généralement mortelle, de la PIF impose la nécessité d'un vaccin sûr et efficace, d'autant plus qu'il n'existe aucun traitement homologué efficace pour cette maladie. (D. Fehr et al. 1995; Hoskins, Taylor, et Lomax 1995).

## 3. Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-Cov-2)

### I. Histoire du virus

Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) est apparu fin 2019 à Wuhan en Chine (Zhu et al. 2020), et est l'agent causal de la COVID-19, une maladie qui, chez une proportion de patients, est associée à une pneumonie grave entraînant une détresse respiratoire et dans de nombreux cas, la mort.

L'hypothèse d'une origine animale reste la plus probable bien que les origines de l'émergence du SARS-CoV-2 n'ont toujours pas été clairement élucidées. Le principal argument pour cela est la présence, dans la même région, de la chauve-souris fer à cheval porteuse d'une souche nommée RaTG13, proche génétiquement à 96.2 % du SARS-CoV-2. La souche a été isolée en 2013 dans une grotte du Yunnan en Chine (Zhou et al. 2020). Due au contexte agroalimentaire et sanitaire (peste porcine africaine ayant provoquée une pénurie de viande de porc) les consommateurs se sont tournés vers des animaux exotiques d'élevage ce qui aurait pu mettre le patient zéro en contact avec le SARS-COV-2. Cette hypothèse a été renforcée par des travaux de 2022 qui ont retracé l'émergence du virus. En mettant en évidence que le marché de Huanan et son commerce d'animaux sauvages a été l'épicentre de la pandémie de COVID-19 (Worobey et al. 2022).

Le virus est isolé pour la première fois le 07 janvier 2020 et sa séquence génétique est rendue publique par les autorités chinoises 5 jours plus tard. Le premier décès a été déclaré début janvier 2020 puis des cas ont commencé à apparaître dans les quelques jours suivants dans des pays voisins de la Chine. Fin janvier, le virus avait gagné l'Europe, l'Océanie, l'Amérique du Nord. S'en est suivi le nord de l'Afrique à la mi-février. A la suite de cela, l'OMS déclare que la COVID-19 est considérée comme une pandémie le 11 mars 2020. Après la Chine, c'est au tour de l'Europe de devenir l'épicentre de l'épidémie suivie très rapidement par les Etats-Unis et l'Amérique latine.

## II. Ecologie du virus

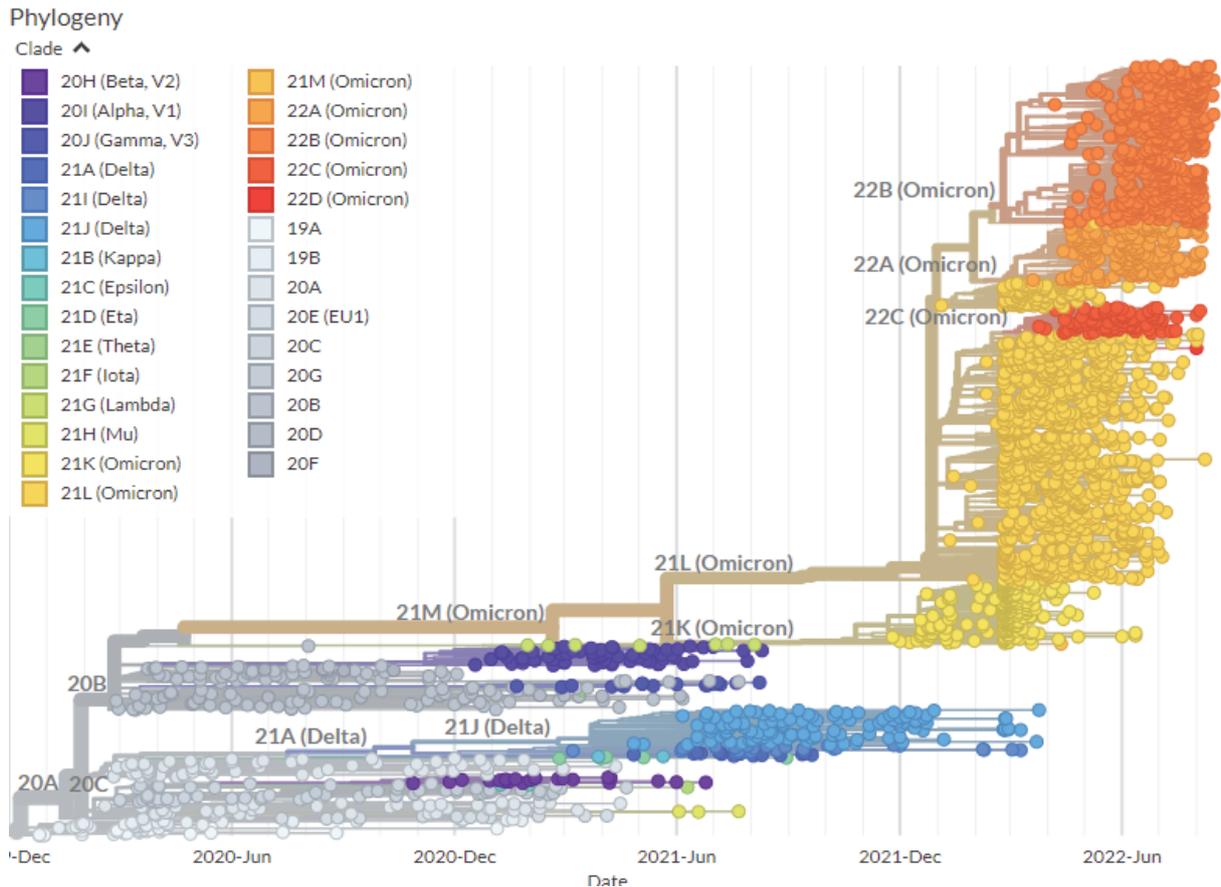
### a. Transmission et épidémiologie

Le mode de transmission reconnu du SARS-CoV-2 à ce jour est par voie aérienne. C'est-à-dire par le biais des excréments d'une personne infectée soit par la salive et sécrétions respiratoires (toux, éternuements) soit par des gouttelettes respiratoires (Harrison, Lin, et Wang 2020). La transmission verticale n'est, à ce jour, toujours pas confirmée, cependant plusieurs cas de transmission post-natale ont été rapportés (Huijun Chen et al. 2020; Qiao 2020; Fenizia et al. 2020). De plus, quelques cas d'animaux atteints par le SARS-CoV-2 ont été recensés, animaux de compagnie (chien et chat), grands félins, rongeurs, gorilles, visons, ce qui permet d'affirmer que le SARS-COV-2 n'est pas un pathogène exclusif de l'Homme.

Actuellement, le SARS-CoV-2 s'est propagé dans le monde entier avec plus de 540 millions d'individus infectés et a provoqué plus de 6.3 millions de décès. (Korber et al. 2020; Dong, Du, et Gardner 2020; SPF 2022b).

Au cours de la pandémie et à travers le monde, des mutations génétiques de la protéine Spike sont associées à l'apparition de variants. Un variant européen avec la mutation D → G en position 614 de la protéine Spike, qui présente une augmentation de titre viral *in vitro* et *in vivo*, une augmentation de la charge virale, s'est rapidement dispersée dans le monde et est devenue la souche pandémique la plus répandue et la plus dominante (Korber et al. 2020). Plus tard, en 2020, d'autres variants ont été détectés au Danemark (Oude Munnink et al. 2021), dans le sud-est de l'Angleterre (Wise 2020), au Brésil (Voloch et al. 2021) et en Afrique du Sud (Tegally et al. 2021). Depuis fin 2021, la dynamique de la pandémie a permis l'émergence de plusieurs variants, plus ou moins virulents. Ces variants ont également subi des mutations donnant naissance à plusieurs sous-lignées pour chacun d'entre eux, provoquant de manière récurrente de nouvelles vagues qui constituent un véritable problème de santé publique.

Afin de contrôler la progression des variants et détecter l'émergence de nouveaux, une surveillance a été mise en place permettant de détecter les mutations et cartographier les types de virus en circulation. Les indicateurs sont produits par Santé publique France (SPF) à partir des données issues de SIDEP (criblage des mutations d'intérêt) et du consortium EMERGEN (séquençage complet du génome viral), coordonné par SPF et l'ANRS-Maladies Infectieuses Emergentes. (Extrait de : (« Coronavirus : chiffres clés et évolution de la COVID-19 en France et dans le Monde » s. d.) Grâce au site SPF, il est possible de visualiser les données hebdomadaires de la situation des variants préoccupants (VOC) dominants en France. Egalement en parallèle, une étude hebdomadaire menée par SPF permet de suivre l'émergence de sous lignage au sein de ces VOC (« Coronavirus : circulation des variants du SARS-CoV-2 » s. d.). Les données mondiales, quant à elles, sont répertoriées sur le site de Nextstrain (Figure 5).



**Figure 5** : Instantané en date du 25/08/2022 de l'épidémiologie génomique du SARS-CoV-2 avec les sous-lignages à l'échelle mondiale depuis décembre 2019, d'après nextstrain.org.

### III. Traitement et prévention

#### a. Traitement

A ce jour, les molécules ciblant les virus à tropisme respiratoire concernent seulement le virus de la grippe et le virus respiratoire syncytial (VRS), et il n'existe pas de médicament approuvé et homologué contre la famille des *Coronaviridae*, qui comportent des virus hautement pathogènes tels que le MERSCoV, le SARS-CoV et depuis peu le SARS-CoV-2. Diverses plateformes ont été développées pour aboutir à un vaccin contre la COVID-19. (Conforti et al. 2020).

La Covid-19 étant majoritairement asymptomatique, les personnes infectées ne nécessitent pas de traitement particulier (si présence de symptômes, traitements au cas par cas). En revanche, pour les individus présentant des comorbidités ou des facteurs de risques pouvant conduire à des formes graves, la recherche de traitement préventif et/ou curatif est un enjeu majeur de santé publique.

Sommairement, voici quelques stratégies antivirales explorées :

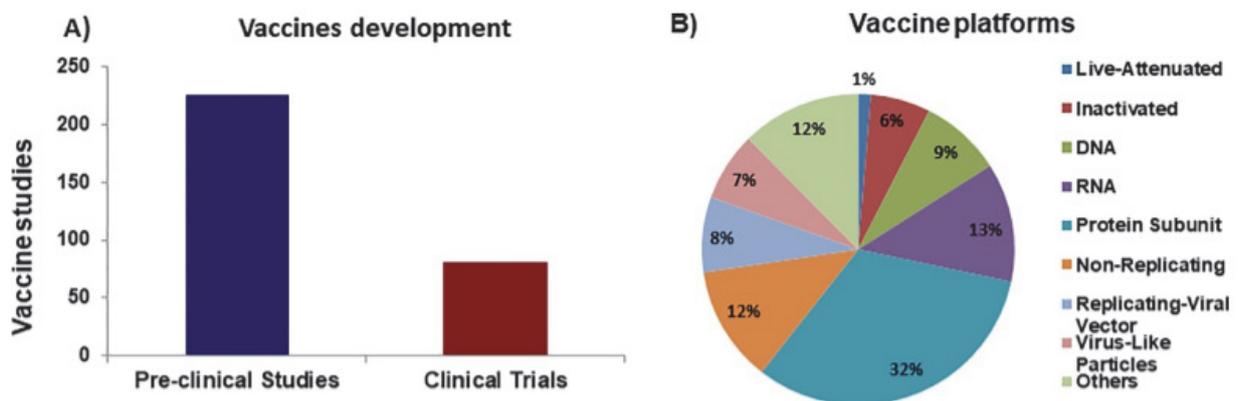
- Anticorps : consiste à empêcher la première étape du cycle infectieux viral (interactions protéine Spike – récepteur cellulaire) grâce à des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.
  - Plasma de convalescents (PC) : l'utilisation d'anticorps polyclonaux de PC permet d'offrir un traitement aux individus vulnérables en attendant l'apparition de vaccins et traitements spécifiques homologués. (Brown et McCullough 2020)
  - Anticorps monoclonaux (AcM) : anticorps synthétisés par une même lignée de lymphocytes B et reconnaissant le même épitope d'un antigène, après avoir été isolés chez un patient guéri ils sont en général modifiés pour augmenter leur demi-vie. Suite à l'émergence d'Omicron BA.1 la plupart des anticorps thérapeutiques ont perdu leur activité neutralisante (Touret et al., 2022). Seul reste utilisé une association d'AcM à savoir : le cocktail Evusheld (composé des anticorps Tixagevimab et Cilgavimab), et une mono thérapie avec l'anticorps Vir-7831 appelé Sotrovimab. (Gupta et al. 2021; Fitzsimmons 2022)
- Molécules antivirales : vise à bloquer ou à interférer avec un moment précis du cycle de réplication viral.
  - Inhibiteur de protéases : empêche les protéases de cliver les pp1A et pp1B ne permettant pas la maturation des 16 nsp. Ces molécules ont montré une activité contre le SARS-CoV-2 *in vitro*. Des études complémentaires *in vivo* ont été menées avec le Paxlovid développé par Pfizer Inc qui ont montré une réduction du risque d'hospitalisation ou de décès de 89% (Wen et al., s. d.). Le paxlovid est, à l'heure actuelle, utilisé en combinaison avec le Ritonavir chez les patients à risques de développer des formes graves.
  - Inhibiteur de RdRp : permet d'inhiber la réplication du matériel génétique viral. Aucune des molécules de cette catégorie n'a été pour le moment approuvée, mais des études de phase II et III sont en cours pour deux d'entre elles (AT-527 et le Molnupiravir) (Hoffmann-La Roche 2022; Ridgeback Biotherapeutics, LP 2022).

## b. Vaccin

Comme l'indique la figure 6, plusieurs plateformes ont été développées pour obtenir rapidement un vaccin contre la Covid-19. A la suite de cette mobilisation six principaux genres de vaccins ont vu le jour :

- ARN messenger : consiste à injecter un ARNm comprenant l'ORF de l'antigène cible coiffé en 5' et polyadénylée en 3'. Pour les deux vaccins disponibles en France, l'ARNm permet l'expression de la protéine Spike, bloquée dans la conformation de pré-fusion, pour imiter plus fidèlement le virus avec lequel les anticorps neutralisants générés doivent interagir (Walsh et al. 2020). A l'heure actuelle, deux vaccins ARNm sont sur le marché, le vaccin de Cominraty, Pfizer/BioNtech qui utilise l'ARNm BNT162b2 et celui de Spikevax, Moderna qui utilise ARNm 1273 (Polack et al. 2020; Baden et al. 2021). Une nouvelle stratégie a été mise en place pour les rappels, le vaccin a été modifié pour contenir, en plus de celui de la Spike original, l'ARNm d'un variant circulant (autorisé aux USA depuis le 31/08/22 et en France depuis le 20/09/2022) (Commissioner FDA 2022; Haute autorité de sante (HAS) s. d.).
- Virus vivant-atténué ou inactivé : en détruisant la capacité du virus à se reproduire, mais en maintenant la structure antigénique normale du virus, cela permet de déclencher la réponse immunitaire (Stauffer, El-Bacha, et Da Poian 2006). Le vaccin Coronavac de Sinovac Research and Development Co. est un vaccin viral entier, inactivé qui est passé en étude phase III après que les études de phase I et II aient montré son efficacité (Z. Wu et al. 2021). D'autres vaccins inactivés sont en cours d'étude de phase II ou III.
- Vecteur ADN : consiste à injecter des fragments d'ADN viral par le biais de plasmides. A ce jour une seule étude a été menée chez l'Homme (Bangari et Mittal 2006). Elle a évalué l'efficacité et la tolérance du vaccin INO-4800 (Tebas et al. 2021). Ce candidat vaccin a passé la phase II (Mammen et al. 2021) et est en cours d'évaluation pour la phase III mais les conclusions de cette étude ne sont pas encore disponibles. D'autres vaccins utilisant cette technologie sont en développement.
- A base d'antigène : utilise des protéines synthétiques, ici la protéine Spike recombinante obtenue en culture cellulaire. Le vaccin dont le développement est le plus avancé à ce jour est le vaccin NVX-CoV2373 de Novavax mais d'autres vaccins sont toujours en développement.

- A vecteur viral non répliatif : consiste a utilisé un virus vecteur génétiquement modifié (adénovirus (AdV)) pour faire synthétiser par les cellules un antigène d'intérêt. Les vaccins à ce jour commercialisés sont :
  - VAXZEVRIA d'Astra Zeneca-University of Oxford : basé sur un adénovirus de chimpanzé qui contient la séquence de la protéine Spike du SARS-CoV-2
  - Janssen COVID-19 de Janssen : basé sur un adénovirus humain code la protéine Spike du SARS-CoV-2.
  - GamCOVID-Vac/SPNUTIK V de Gamaleya Research Institute- Health Ministry of the Russian Federation : basé sur deux adénovirus humains différents (HAdV-26 pour la 1ere dose et HAdV-5 pour la 2<sup>nde</sup> dose) codant pour la protéine Spike. (Q. Wu et al. 2021)



**Figure 6 :** Représentation schématique du développement des vaccins contre la Covid-19. A) Vue d'ensemble du développement du vaccin COVID-19. B) Pourcentage de plateformes (catégories) utilisées dans les études de développement de vaccins. Extrait de : (Jadaan et Khan 2022).

## B. Arterivirus

### 1. Généralités

#### a. Classification

Les Arterivirus appartiennent à la famille des *Arteriviridae* qui fait également partie de l'ordre des *Nidovirales* et sont composés des virus de l'artérite équine (EAV), de l'élévation de la lactate déshydrogénase (LDV), de la fièvre hémorragique simienne (MVM) et du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (PRRSV) (Figure 1) (Meulenberg et al. 1993; Lefkowitz et al. 2018).

Les Arterivirus et les Coronavirus ont des caractéristiques communes importantes au niveau de l'organisation de leur génome ainsi que de son expression. Malgré ces similitudes globales, les génomes des Artérvirus sont sensiblement plus petits et la taille, la structure et la composition de leurs virions ne ressemblent pas à celles des autres membres de l'ordre des *Nidovirales* (Cavanagh 1997; Yu et al. 2006; Jaiswal et Saxena 2020).

Il a été montré une forte variation génétique, avec des taux élevés de mutation et une diversification des lignées causés par l'absence d'activité correctrice de la polymérase virale (R. Forsberg et al. 2001; Roald Forsberg 2005; Zimmerman et al. 2012).

Concernant le PRRSV, il a été classé en 2 génotypes après les analyses phylogénétiques réalisées sur la glycoprotéine 5 à la surface du virus (Delisle et al. 2012) :

- Génotype I (anciennement appelé Européen) qui comprend le prototype Lelystad.
- Génotype II (anciennement appelé Nord-Américain) qui comprend la souche de référence québécoise IAF-Klop et la souche de référence nord-américaine ATCC VR-2332.

La circulation du PRRSV est aujourd'hui bien définie. Le PRRSV de type I circule principalement en Europe, quant au type II, il est principalement retrouvé en Amérique du nord et en Asie (Shi et al. 2013). Néanmoins, le pouvoir hautement mutagène du virus nécessite de mettre à jour régulièrement ce système de classification (Larochelle, D'Allaire, et Magar 2003; Cha, Chang, et Yoon 2004; Lambert et al. 2019).

## b. Génome

Les Arterivirus possèdent un génome compris entre 12,7 et 15,7 kb et un ARN simple brin à polarité positive. Ils possèdent deux grands cadres de lecture ouverts : les ORF 1a et 1b qui représentent 75 % du génome viral et codent les 12 protéines non structurales.

Les protéines non structurales, obtenues à partir des précurseurs polyprotéiques pp1a et pp1ab, présentent des activités enzymatiques de type réplécase, protéase et polymérase nécessaires à la réplécation virale.

Les ORF 2 à 7 codent, quant à elle, les 6 ARNm sg qui expriment les 7 protéines structurales. Elles sont composées de trois protéines d'enveloppe mineures : GP2a, GP3 et GP4. L'expression de l'ORF5, ORF6 et ORF7 permet de coder respectivement trois protéines structurales majeures : la glycoprotéine d'enveloppe (E) GP5, la protéine membranaire (M) et la nucléocapside (N) (W. H. Wu et al. 2001). La GP5 forme avec la protéine M un hétérodimère (Mardassi, Massie, et Dea 1996) indispensable pour la formation des particules et pour l'infectivité virale, tandis que les protéines mineures GP2a, GP3 et GP4 ne sont essentielles qu'à initier l'infection virale (Wissink et al. 2005). La protéine N est hautement immunogène et est utilisée lors des diagnostics du PRRSV (Dea et al. 2000). La protéine N est retrouvée à la fois dans le cytoplasme (assemblage de particules virales) et dans le noyau où elle joue un rôle important en s'opposant à la fonction des gènes cellulaires. (Lunney, Benfield, et Rowland 2010). (Figure 7)

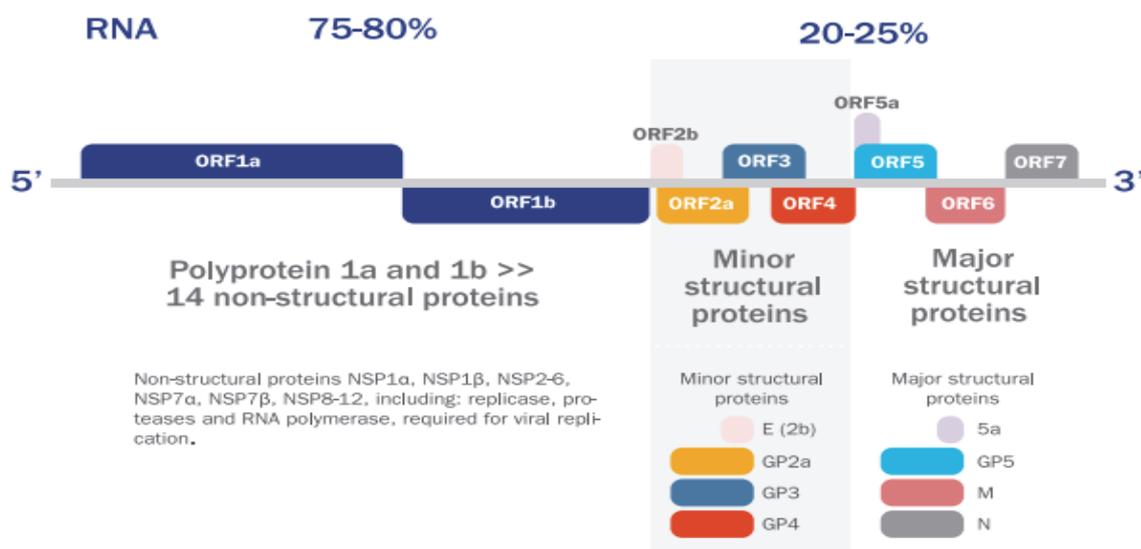


Figure 7 : Structure génomique du PRRSV. (Laboratorios Hipra 2018)

### c. Structure

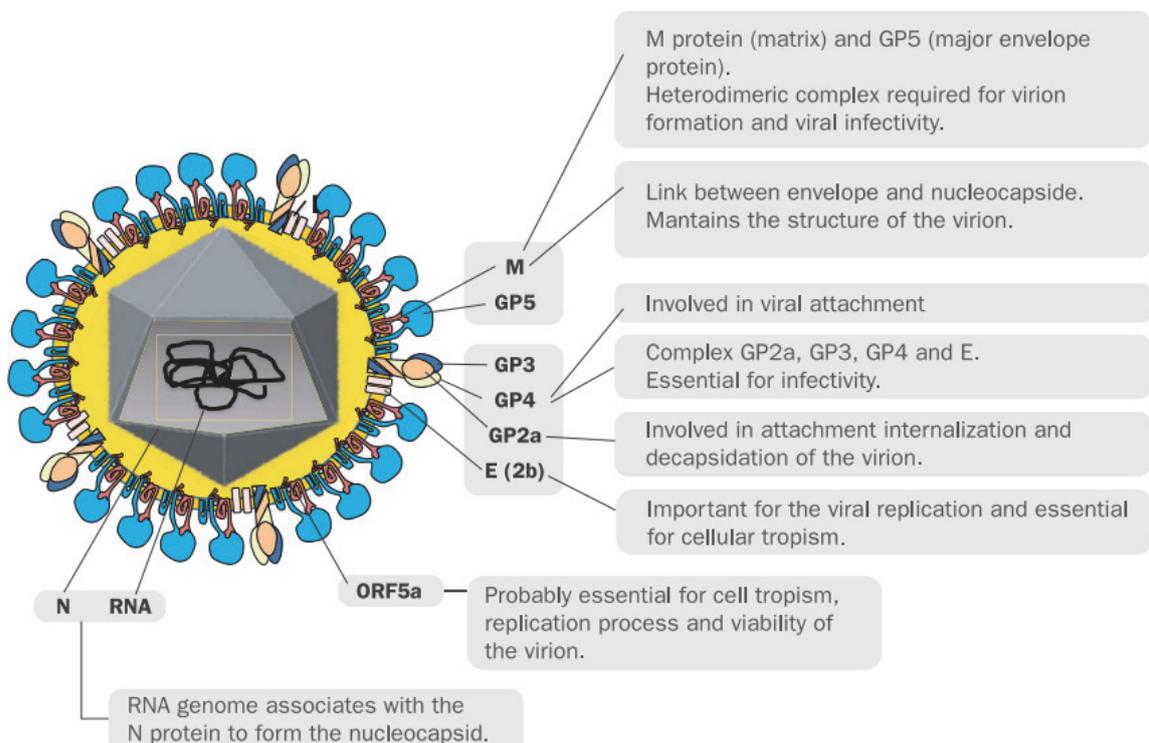
Les Arterivirus ont un diamètre compris entre 25 et 55 nm. La structure de leur capsid possède une forme sphérique avec une structure hélicoïdale (Spilman et al. 2009).

L'enveloppe est composée d'une bicouche lipidique, elle porte deux protéines majeures, la protéine membranaire M et la protéine d'enveloppe GP5, ainsi que trois autres protéines mineures, les protéines GP2, GP3 et GP4.

La protéine M possède trois domaines transmembranaires et expose à la surface du virion une extrémité N-terminale de 16aa. Sa structure est semblable à celle de la protéine M des coronavirus. Elle forme, par un pont disulfure, un hétérodimère avec la protéine GP5.

La GP2 est intégrée dans la membrane de la particule virale sous forme monomérique (Meulenberg et Petersen-den Besten 1996). Bien que la présence de la GP3 dans le virion soit confirmée par différentes études (Drew et al. 1995; van Nieuwstadt et al. 1996; Wiczorek-Krohmer et al. 1996), sa localisation précise et son rôle ne sont pas encore clairement déterminés.

De plus, la GP4 pouvant être la cible d'anticorps monoclonaux neutralisant le virus *in vitro* sa localisation doit être membranaire. Elle aurait un rôle dans l'attachement, l'endocytose ou la libération du génome du virus dans le cytoplasme cellulaire (Mardassi et al. 1998). (Figure 8)



**Figure 8 :** Représentation schématique d'une particule virale d'un Artérovirus (Laboratorios Hipra 2018).

#### d. Cycle de réplication

Les Arterivirus sont caractérisés par une spécificité d'espèce très importante. Par exemple, le PRRSV a pour spécificité d'hôte les suidés qui sont les seuls sensibles à l'infection. Les cellules sensibles à l'infection sont des dérivées de la lignée myéloïde monocyttaire (monocyte circulant, macrophage tissulaires et cellules dendritiques). Après interaction avec le récepteur membranaire de la cellule hôte cible, le virus est internalisé dans la cellule par un mécanisme d'endocytose médiée par la clathrine (Kreutz et Ackermann 1996). La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la vésicule d'endocytose se fait à un pH compris entre 5 et 6.2 (Scott, Vacca, et Gruenberg 2014). La capside virale est alors libérée dans le cytoplasme puis la décapsidation déclenche le commencement de la traduction de l'ARN génomique.

La réplication et la formation des ARNmsg reposent sur la formation de brins complémentaires de polarité négative. Il existe deux voies de synthèse pour les ARNmsg, soit par le saut de la séquence leader à partir d'un ARN génomique de polarité négative, soit par un ARNmsg positif. Par la suite, les ARNm négatifs synthétisés sont transcrits en ARNm positifs. Les ARNm sg permettent l'expression des protéines structurales. La réplication a lieu dans des usines virales ce qui permet une meilleure efficacité. Les nouveaux génomes sont assemblés et l'ARN génomique est encapsidé. Les capsides pleines acquièrent leur membrane par bourgeonnement à la membrane du REL ou de l'appareil de Golgi (Mardassi, Massie, et Dea 1996). Enfin, la libération du virus s'effectue par exocytose. (Figure 9)

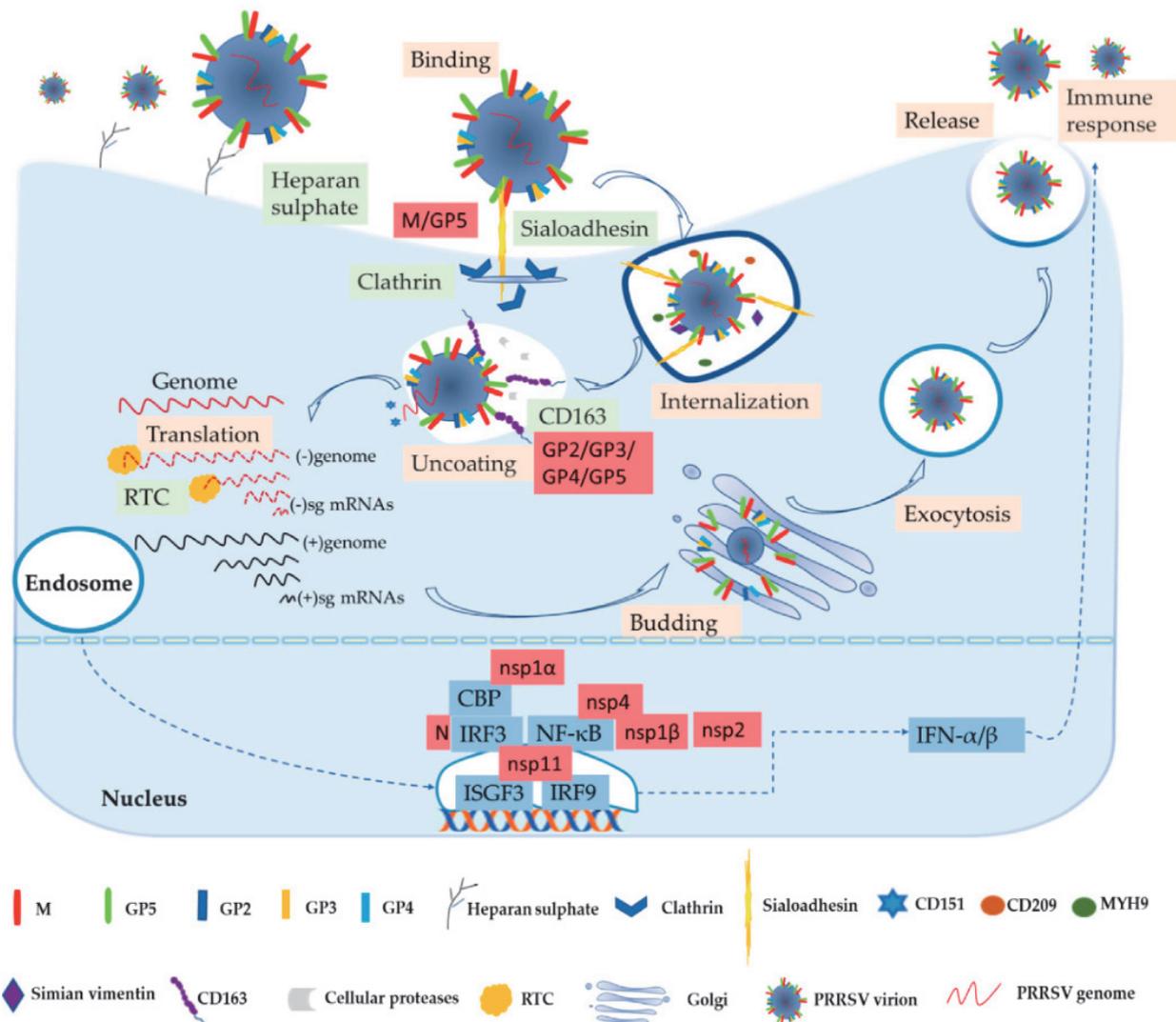


Figure 9 : Le cycle de réplication des Arterivirus. (Ma et al. 2021)

## 2. Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV)

### I. Histoire du virus

C'est à la fin des années 1980, aux USA, que des vétérinaires ont mis en évidence dans des troupeaux de porcs américains, de graves troubles de reproduction chez les truies en fin de gestation avec une augmentation du nombre de porcs mort-nés, une pneumonie grave chez les porcs nouveau-nés et en pouponnière, un ralentissement de la croissance et une augmentation de la mortalité (Wesley et al. 1990; Loula 1991). Des cas similaires ont été parallèlement décrits en Allemagne en 1990 et se sont rapidement propagés à d'autres pays d'Europe les années suivantes.

L'agent causal de cette maladie est resté inconnu durant plusieurs années malgré le nombre de cas rapportés présentant les mêmes symptômes. C'est pour cela que la maladie fut dans un premier temps appelée « maladie porcine mystérieuse » aux États-Unis et « avortement épidémique porcin et syndrome respiratoire » ou « maladie du porc à oreilles bleues » en Europe. Ce dernier nom fait référence à la cyanose des oreilles des porcs atteints de la maladie. Une fois l'étiologie de cette maladie « mystérieuse » établie, le nom « swine infertility and respiratory syndrome » (SIRS) a été suggéré par des chercheurs nord-américains tandis que les Européens l'appelaient le « syndrome reproducteur et respiratoire porcin » (PRRS). Ce dernier est maintenant le nom adopté unanimement pour cette maladie.

C'est en 1991 que des chercheurs de l'Institut Vétérinaire Central de Lelystad aux Pays-Bas ont caractérisé pour la première fois l'agent causal de cette maladie comme étant un virus à ARN enveloppé (Wensvoort et al. 1991; Terpstra, Wensvoort, et Pol 1991). Un virus similaire a été isolé au même moment aux États-Unis (Collins et al. 1992; Benfield et al. 1992) et un an plus tard au Canada (Dea et al. 1992).

La comparaison des séquences du virus isolé à Lelystad, désigné comme PRRSV de type I, et des isolats de virus nord-américains, appelés PRRSV de type II, a indiqué que ces virus partageaient des séquences similaires à celles de la famille des *Arteriviridae*, du genre *Arterivirus* et de l'ordre des *Nidovirales*. Ce qui a abouti à leur classification dans cette famille.

## II. Ecologie du virus

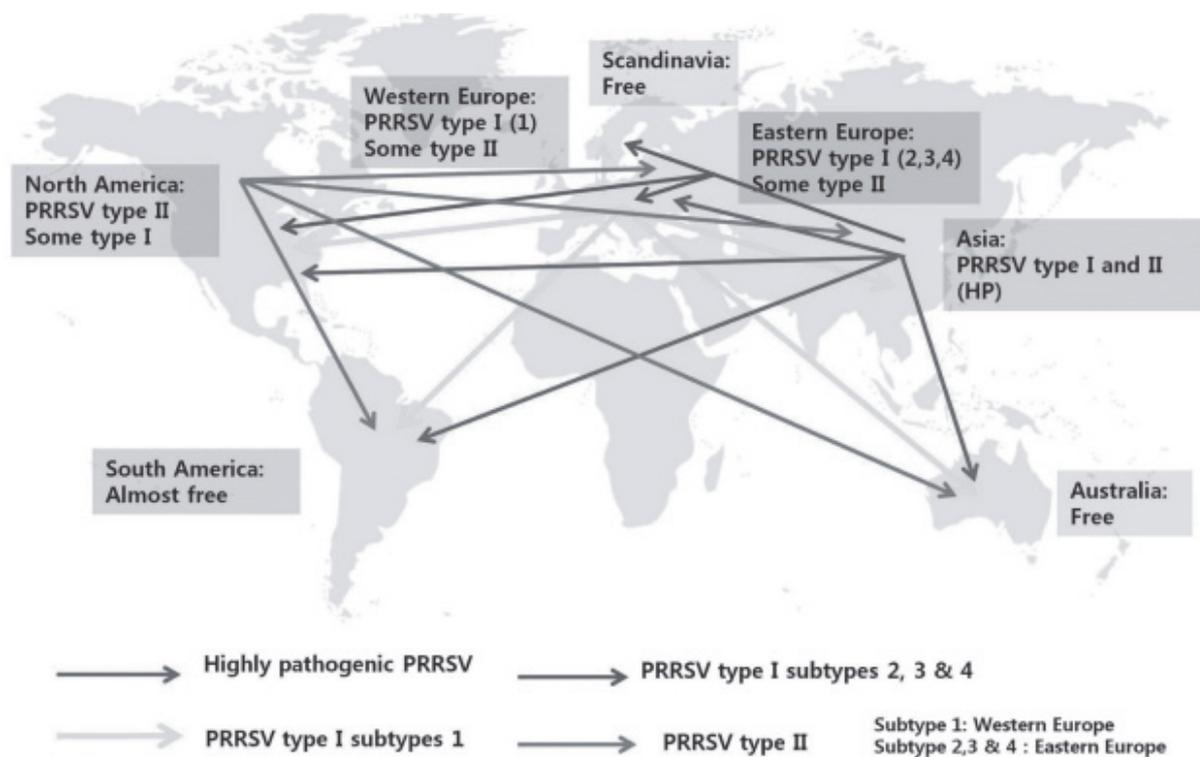
### a. Transmission et épidémiologie

Les porcs peuvent être infectés soit par contact direct, soit indirectement par l'intermédiaire de fomites. L'infection au PRRSV peut se faire par voie respiratoire, percutanée ou par les muqueuses. Le virus peut se propager par des lésions cutanées telles que des morsures, des coupures ou des éraflures, ainsi que par des pratiques d'élevage telles que l'encochement des oreilles, la coupe de la queue ou les injections (vaccins). La transmission verticale existe et est importante au cours du dernier trimestre de la gestation. (Pileri et Mateu 2016).

L'endémicité du PRRSV dans un élevage est due à une infection prolongée chez les animaux porteurs (plus de 200 jours) et à la présence continue d'animaux sensibles (généralement des porcelets allaités). De plus, la proximité des troupeaux infectés est reconnue comme un facteur

de risque. Le risque augmente avec la densité des troupeaux voisins positifs au PRRSV. (Zimmerman et al. 2012).

Les fomites (vecteurs passifs, ex : vêtements des éleveurs) et les vecteurs mécaniques (vecteurs qui transmettent le virus sans que celui-ci se réplique à l'intérieur de son corps, ex : les mouches) sont également impliqués dans la transmission du PRRSV. Des études expérimentales ont montré que les mouches domestiques et les moustiques pouvaient transmettre le virus, mais leur rôle a aussi été jugé comme négligeable. (Dee et al., s. d.; Otake et al. 2002) (Figure 10)



**Figure 10 :** Distribution mondiale du PRRSV et transmission intercontinentale hypothétique (Ko et al. 2015)

Le PRRS est aujourd'hui devenu la maladie porcine la plus répandue dans le monde, causant des pertes économiques très importantes (plusieurs milliards de dollars par an). Aux États-Unis, les pertes annuelles sont estimées à plus d'un demi-milliard de dollars (Neumann et al. 2005; Holtkamp 2013). (Figure 11)

C'est en 2006, en Chine, que l'émergence d'une souche hautement pathogène (HP-PRRSV) a fait son apparition. Cette souche qui appartient au PRRSV de type II, présente une délétion discontinue unique de 30 acides aminés sur sa protéine nsp2 rendant la souche plus virulente. Les porcs infectés par HP-PRRSV ont des températures corporelles plus élevées, atteignant 40

à 42°C, et les porcs, atteints à tout âge, présentent une morbidité et une mortalité significativement plus élevées qu'avec la souche PRRSV (Tian et al. 2007). Il semble que l'importation et l'exportation des animaux d'élevage contribuent à l'augmentation de la circulation virale mais qu'également les souches vaccinales recombinent avec les souches sauvages. Ces deux facteurs seraient à l'origine de l'émergence de nouvelles souches HP-PRRSV. Ces nouvelles souches se sont rapidement répandues dans le monde en conservant un pouvoir pathogène très important. Cela met souligne la nature mutagène de ce pathogène et le danger pour l'industrie agroalimentaire.



Figure 11 : Conséquences économiques du PRRSV dans l'industrie porcine (Laboratorios Hipra 2018).

### III. Traitement et prévention

#### a. Traitement

Il n'existe aujourd'hui aucun traitement homologué et donné en systématique pour le PRRS. Les symptômes sont traités individuellement. Toutefois beaucoup de molécules (antiviraux et antibiotiques principalement) ont été testées et plusieurs études mettent en évidence l'efficacité de certaines d'entre elles *in vitro*. Egalement, des études complémentaires *in vivo* devront être effectuées avant de pouvoir les utiliser sur le terrain (Cafruny et al. 2008; Du et al. 2017; Pathak et al. 2022).

## b. Vaccin

Le premier vaccin vivant modifié contre le PRRSV, RespPRRS<sup>®</sup> (plus tard RespPRRS<sup>®</sup> Repro et maintenant Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV), a été lancé en novembre 1994 par Boehringer Ingelheim Animal Health. Depuis la commercialisation de ce vaccin, un certain nombre d'autres vaccins à virus vivants et inactivés modifiés ont été développés (William L. Mengeling et al. 2003).

À l'heure actuelle, il y a une trentaine de vaccins différents dans le commerce, mais un grand nombre d'entre eux ne sont disponibles que dans leur pays de fabrication. L'essentiel de ces vaccins sont des MLV (virus vivant modifié) ou des IV (virus inactivé) du PRRSV génotype I ou II (Charoenchanikran et al. 2016; Kristensen et al. 2018; Madapong et al. 2021). Il existe des exceptions pour les vaccins basés sur des lignées du PRRSV2, mais les MLV sont les vaccins les plus développés actuellement (Ouyang et al. 2016; Madapong, Saeng-Chuto, Chaikhumwang, et al. 2020; Madapong, Saeng-Chuto, Boonsoongnorn, et al. 2020).

Malheureusement, les vaccins existants sont d'une efficacité insatisfaisante, car ils n'assurent pas une protection complète et/ou universelle. En général, les vaccins commerciaux offrent une bonne protection virologique et clinique contre une infection par une souche génétiquement homologue, mais pour les souches hétérologues, l'efficacité est très variable (Meng 2000; Leng et al. 2012; Guo et al. 2018). Nous pouvons mettre en parallèle les problèmes rencontrés lors de la vaccination contre le PIFV. Le vaccin de Pfizer (Primucell FIP<sup>®</sup>) montre une efficacité d'environ 80% (controversée) uniquement contre les souches virulentes homologues au vaccin (F. W. Scott, Corapi, et Olsen 1995; F. W. Scott, Olsen, et Corapi 1995; McReynolds et Macy 1997). De plus les chats doivent obligatoirement être naïve de la maladie au risque de développer une sensibilité (« antibody-dependant enhancement ») et mourir plus rapidement (F. W. Scott, Corapi, et Olsen 1995; Daniela Fehr et al. 1997). Toutefois il est relativement difficile de transposer ces cas à l'Homme, tout d'abord car les vaccins contre les coronavirus humains sont très récents, ensuite car ces vaccins sont soit des vaccins à ARNm soit avec des vecteurs à adénovirus (dans les deux cas permettant uniquement la fabrication de la protéine Spike). Néanmoins, l'efficacité croisée des vaccins contre le SARS-CoV-2 est mise-à-mal par l'apparition continue de nouveaux variants. La revue (Simon-Loriere et Schwartz 2022) soulève la question de l'émergence de nouveaux sérotypes de SARS-CoV-2 qui rendrait, à terme, les vaccins inefficaces.

Il est obligatoire de faire attention à la vaccination massive avec des vaccins vivants atténués en raison de l'accroissement des divergences génétiques. En effet, il a été montré une possibilité de réversion d'une souche atténuée vers une souche virulente (Nielsen et al. 1997; W. L. Mengeling et al. 1999). Et enfin, le plus alarmant reste les recombinaisons hétérologues possibles entre les souches vaccinales et les souches sauvages entraînant l'apparition/réapparition de souche HP-PRRSV (Eclercy et al. 2021). En effet l'épidémie de HP-PRRSV de 2006 en Chine s'inscrit dans le contexte de la vaccination avec CH-1a et Ingelvac PRRS MLV (An et al. 2010).

En conséquence, les vétérinaires et les éleveurs deviennent plus prudents et réévaluent leurs stratégies vaccinales. Certains éleveurs tentent de réduire ou d'arrêter la vaccination contre le PRRSV en essayant de prendre d'autres mesures globales de prévention, d'hygiène et sécurité afin de contrôler la maladie.

## C. Flavivirus

### 1. Généralités

#### a. Classification

La famille des *Flaviviridae*, de l'ordre des *Amarillovirales*, regroupe quatre genres : les Hepacivirus, les Pestivirus, les Pegivirus et les Flavivirus (Hayasaka et al. 2001). En 2018, l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) a créé un nouveau domaine nommé *Riboviria*, regroupant un grand nombre de virus ARN, dont les *Flaviviridae*.

Flavivirus est le seul genre des *Flaviviridae* à comprendre des arbovirus. Ce genre est composé d'environ 70 virus dont certains sont responsables de pathologie chez l'Homme.

Ce genre se décompose en 4 groupes de virus : ceux transmis par les moustiques, les tiques, les sans vecteur connu et certains virus atypiques (Calisher et Gould 2003).

Le premier groupe, composé des virus transmis par les moustiques, se nomme « mosquito-borne flaviviruses ». Il est organisé en deux sous-groupes, en fonction de l'espèce du moustique vecteur.

Le groupe des « tick-borne flaviviruses », les virus transmis par les tiques, est organisé en deux sous-groupes en fonction de l'hôte. Le premier sous-groupe est nommé « seabird tick-borne flaviviruses », puisqu'il est associé aux oiseaux marins, les virus de ce groupe ne sont pas pathogènes chez l'Homme (Gritsun, Nuttall, et Gould 2003). Le second sous-groupe est appelé

« mammalian tick-borne flaviviruses » et est associé aux mammifères. Le sérocomplexe « tick-borne encephalitis » fait partie de ce groupe, on y retrouve les virus responsables d'encéphalites, dont le TBEV, et des fièvres hémorragiques.

Le TBEV est constitué de 3 sous-types, nommés selon leur répartition géographique : le sous-type « Far-Eastern » comprenant les souches Sofjin et Oshima, le sous-type « Siberian » comprenant les souches Vasilchenko et Aina, et le sous-type « Western European » comprenant les souches Neudoerfl, Hypr et Kumlinge (Gritsun, Nuttall, et Gould 2003). La classification des sous-types du TBEV est en permanente évolution. Récemment, deux lignées ont été ajoutées comme nouveaux sous-types. La lignée « 178–79 » qui est composée d'un seul virus et la lignée « 886–84 » (« Baikalien ») qui comprend 13 souches. (Dai et al. 2018; Ruzek et al. 2019; Radzišauskienė et al. 2020).

Quatorze virus considérés aujourd'hui comme non vectorisés composent le troisième groupe qui est celui des « no-known vector flaviviruses ». Il est aussi organisé en deux sous-groupes, mais selon l'hôte.

Le quatrième groupe regroupe des virus isolés uniquement chez l'insecte, principalement le moustique, et dont aucun hôte vertébré n'a été identifié à ce jour.

## b. Génome

Les Flavivirus possèdent un génome à ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 11 kb. Ce génome contient un seul cadre de lecture ouvert et code une seule polyprotéine d'environ 3400aa (UniProt : Q01299, P14336 et P07720) qui est transformée de manière co- et post-transcriptionnelle en trois protéines structurales. La protéine de la capsid (C), de la membrane (prM/M) et de l'enveloppe (E) et sept protéines non structurales (nsp) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (Lindenbach et al. 2013; Gritsun, Lashkevich, et Gould 2003).

La protéine C est une protéine de haute densité chargée positivement, ces caractéristiques jouent un rôle dans son affinité pour l'ARN et l'ADN (Tan, Fibriansah, et Lok 2020). Elle est composée de quatre hélices  $\alpha$  reliées par de courtes boucles. L'hélice  $\alpha_3$  permet la formation de dimère de protéine C (Sirohi et Kuhn 2017). Ses rôles sont multiples, elle détermine l'infectivité du virus, protège le génome viral et participe à la formation de l'enveloppe. Elle permet aussi le maintien de la structure spatiale de la protéine E. (Schrauf et al. 2009; Xingcui Zhang et al. 2017). La découverte de la présence de la protéine C dans le noyau des cellules signifie qu'elle

pourrait aider à la médiation du transfert des antigènes du cytoplasme au noyau (Oliveira et al. 2017).

Au cours de sa maturation, la protéine E est glycosylée sur trois sites d'acides aminés (Asn130, Asn175 et Asn207). Elle contient deux hélices transmembranaires facilitant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Perera-Lecoin et al. 2014). Elle possède trois domaines DI, DII et DIII constitués de feuillet béta et d'un domaine transmembranaire. Le domaine DI joue un rôle essentiel dans la stabilisation des protéines et permet de relier entre eux DII et DIII. Le domaine DII participe à la fusion membranaire et le domaine DIII est le domaine putatif de liaison au récepteur de la protéine E.

L'extrémité 5' possède une coiffe utilisée pour la traduction cellulaire. L'extrémité 3' n'est pas polyadénylée mais forme une structure en boucle. Cette structure secondaire conduit à la formation d'un ARNsg par dégradation de l'ARN génomique (Zhao et al. 2021) (Figure 12).

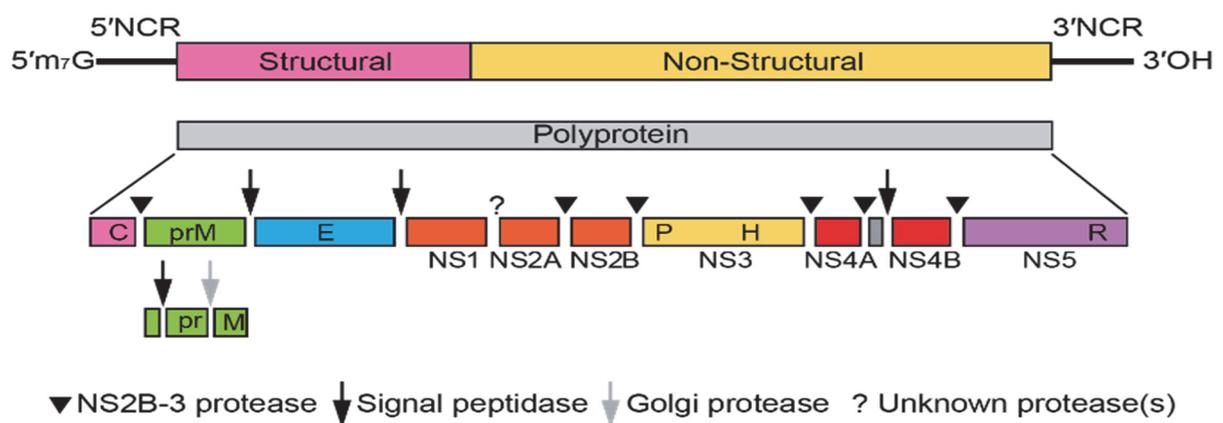


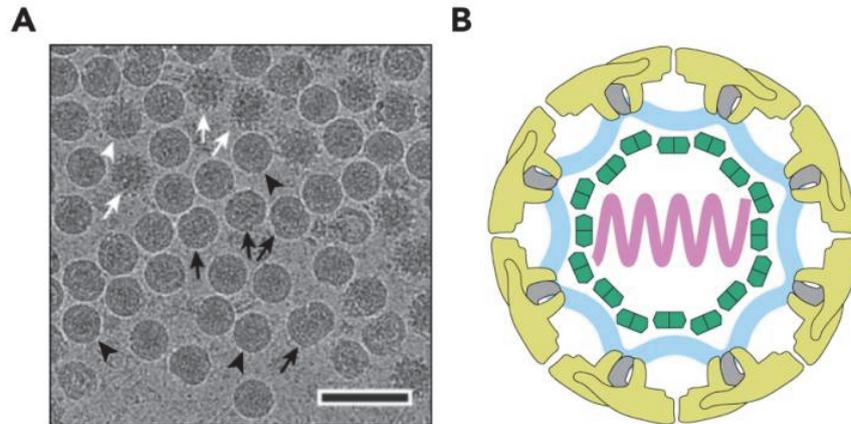
Figure 12 : Structure du génome du TBEV (Lindenbach et al. 2013)

### c. Structure

Les Flavivirus sont des virus sphériques d'environ 50 nm. Leur nucléocapside icosaédrique fait environ 30nm et est entourée d'une enveloppe lipidique issue du réticulum endoplasmique de la cellule hôte (Füzik et al. 2018).

Ils subissent une maturation durant leur cycle de répliation. En effet, les cellules infectées produisent au moins trois types de particules : des particules immatures non infectieuses, des particules partiellement matures et des particules infectieuses matures. La présence de ces trois stades protéiques est observée chez la majorité des virus et son processus de maturation sera décrit dans la partie « cycle de répliation » (Figure 13A) (Smith et al. 1970; Lindenbach et al.

2013; Sirohi et Kuhn 2017; Füzik et al. 2018). Le virion est constitué d'une nucléocapside entourée d'une membrane dans laquelle les protéines de E et M sont intégrées (Figure 13B). Les domaines transmembranaires des protéines E et M déforment l'enveloppe lipidique en la rendant rugueuse. La nucléocapside est formée de la protéine de la capsid et l'ARN viral (Füzik et al. 2018; Pulkkinen, Butcher, et Anastasina 2018).



**Figure 13** : Structure du virion de Flavivirus.

(A) Cryo-micrographie électronique de particules de Flavivirus purifiées à partir de cellules infectées. Pointes de flèches noires = particules matures lisses, flèches blanches = particules immatures, pointes de flèches blanches = partiellement matures et flèches noires = particules endommagées. L'échelle = 100 nm. (B) Représentation schématique du virion (Pulkkinen, Butcher, et Anastasina 2018)

#### d. Cycle de réplication

L'entrée du virus dans la cellule hôte s'effectue par endocytose grâce à l'interaction entre les protéines d'enveloppe et les récepteurs cellulaires membranaires. Sous l'acidité des endosomes, les dimères de protéines E changent de conformation pour exposer un peptide de fusion. Grâce à ce peptide, la membrane du virus et de l'endosome fusionnent ce qui libère la nucléocapside dans le cytosol (Heinz et Allison 2003). Par un mécanisme encore non défini, la nucléocapside se désintègre pour libérer l'ARN génomique viral qui sera traduit en polyprotéine par la machinerie cellulaire de l'hôte. Cette polyprotéine s'intègre ensuite dans la membrane du RER de manière co-translationnelle par le biais de domaines transmembranaires (Pulkkinen, Butcher, et Anastasina 2018; Stringfixer Flavivirus s. d.). Elle est ensuite clivée afin de produire les protéines structurales et non-structurales. Une protéase cellulaire clive les jonctions entre les protéines de structures contrairement aux jonctions entre les protéines non-structurales qui sont clivés par une protéase virale.

En parallèle du clivage de la nucléocapside, un brin d'ARN génomique de polarité négative est répliqué par le complexe protéique NS5/NS3. Les protéines non structurales hautement

conservées, présentes dans les UTR 5' et 3', aident à la cyclisation et la synthèse de ce brin (Lindenbach et Rice 1997; Rastogi, Sharma, et Singh 2016). Ce brin sert de matrice pour la synthèse de plusieurs ARN de polarité positive : les ARN génomiques destinés à être encapsidés dans les nouvelles particules virales et les ARN de matrices nécessaires à la réplication. Les protéines NS5 et NS3 participent également à la coiffe de l'extrémité 5' de l'ARN, tandis que la NS1 a un rôle important dans la sécrétion, la virulence et la réplication virale (Crabtree, Kinney, et Miller 2005; Somnuk et al. 2011; Rastogi, Sharma, et Singh 2016).

Les génomes viraux nouvellement synthétisés dans le cytosol s'entourent de protéines de capsid grâce à des interactions électrostatiques. Ces nucléocapsides acquièrent leur double couche lipidique par bourgeonnement en entrant dans le RER. Les virions passent alors par l'appareil de Golgi, et une fois dans le réseau trans-Golgi, et sous l'effet du pH, le précurseur prM change de conformation, exposant ainsi un site de clivage à la furine. Cette protéase clive le « pro peptide » de cette protéine permettant la libération de la forme mature de la protéine M. Les nouvelles particules virales matures sont alors secrétées par exocytose hors de la cellule hôte. Elles sont généralement accompagnées de particules subvirales non infectieuses dépourvues de nucléocapside (Figure 14).

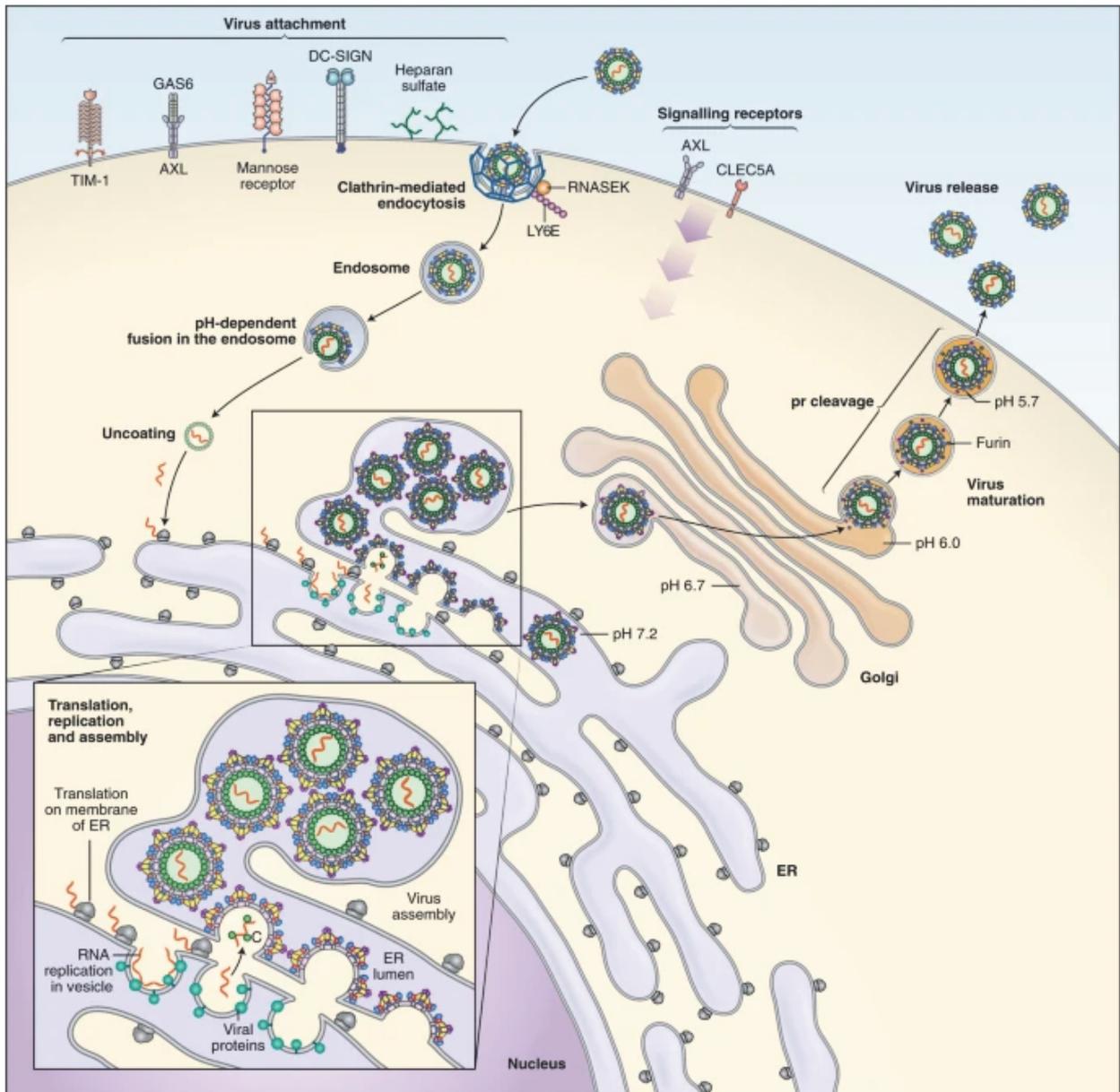


Figure 14 : Cycle de réplication des Flavivirus. (Pierson et Diamond 2020)

## 2. Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)

### I.Histoire du virus

Les premiers cas d'encéphalites à tiques ont été découverts au XVIII<sup>ème</sup> siècle par l'Eglise scandinave en Finlande, néanmoins, il faudra attendre 1931 pour que la première description clinique soit réalisée. C'est le docteur Hans Schneider qui fera le lien entre plusieurs cas de méningo-encéphalites saisonnières en Allemagne. C'est plus de vingt-cinq ans plus tard que le virus sera isolé pour la première fois dans cette région. (« Wehrmedizin » s. d.; Moritsch et Krausler 1957)

Bien que la maladie semble être apparue pour la première fois en Russie, en 1898. C'est en 1939 que l'agent pathogène responsable sera isolé dans le pays (Chumakov et Seitlenok 1940). C'est à la même période que la tique *Ixodes persulcatus* sera identifiée comme étant le vecteur de la maladie et responsable de la transmission du virus aux mammifères. Ce virus est donc un arbovirus c'est-à-dire un virus transmis par les arthropodes. La maladie est dans un premier temps nommée « Russian spring-summer encephalitis » (RSSE) et le virus « Russian spring-summer encephalitis virus » (RSSEV) avant de devenir « Tick-borne encephalitis virus » (TBEV).

En 1943, une nouvelle souche du virus est isolée en Biélorussie et est retrouvée chez une nouvelle espèce de tiques, *Ixodes ricinus* (Pogodina et al. 2004). Ce virus sera nommé plus tard « Western tickborne encephalitis virus ». A partir de cette date, le virus sera isolé dans toute l'Europe de l'Est puis dans l'Europe du Nord et en Asie puis considéré endémique dans ces mêmes régions (Vaptsarov et al. 1954; Pattyn et Wyler 1955; Kmet et al. 1955; Draganescu 1959; Mázló et Szántó 1978; Donoso Mantke, Karan, et Ruzek 2011).

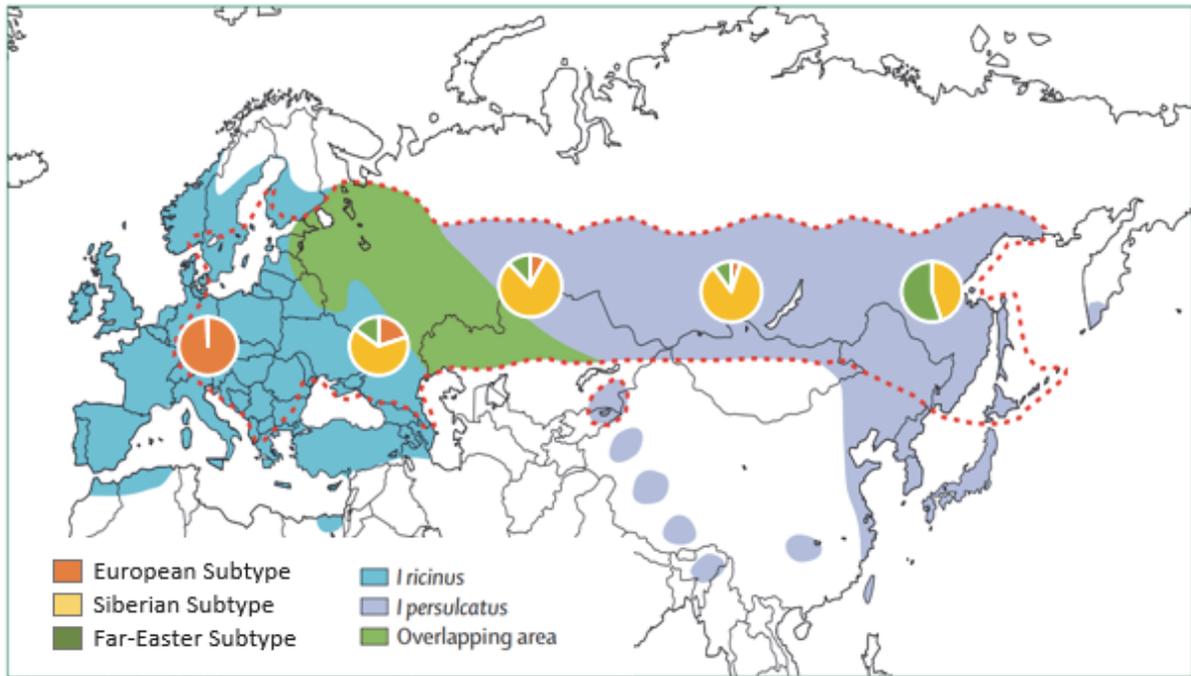
Le 5 juin 2020, au vu de l'augmentation permanente du nombre de cas, la France a placé le TBEV comme maladie à déclaration obligatoire, afin de mettre en place une surveillance et facilité la centralisation des données.

## II. Ecologie du virus

### a. Vecteur et épidémiologie

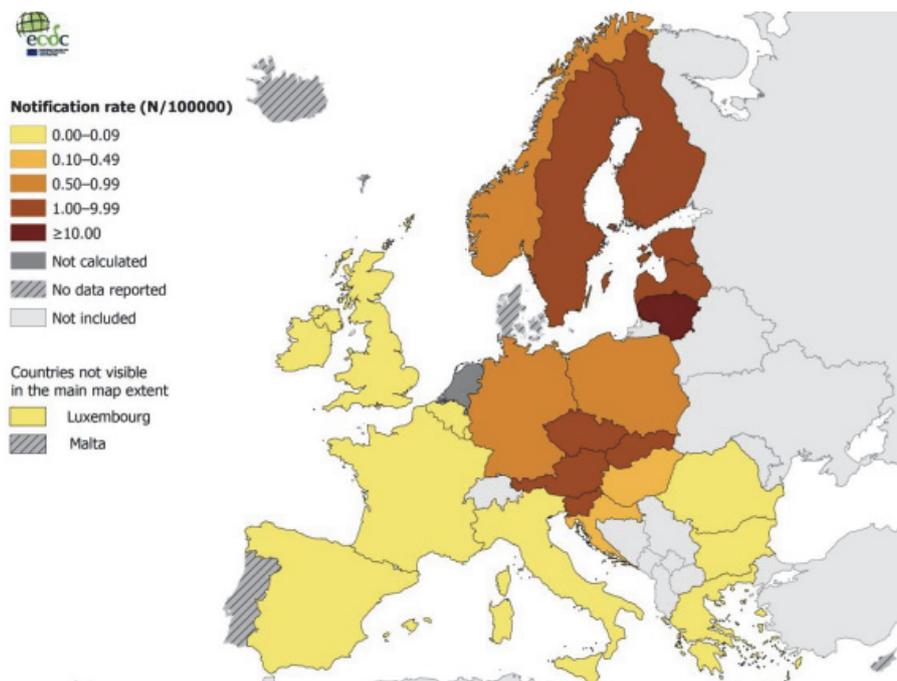
Le vecteur du TBEV est la tique hématophage, il en existe deux genres différents. Le genre *Ixodes*, *Ixodes ricinus* en Europe et *Ixodes persulcatus* à l'Est de l'Oural, et le genre *Haemaphysalis* en Russie.

Pour que le virus se maintienne dans la nature, il est nécessaire que la tique puisse vivre dans un environnement propice à son développement. Généralement, les foyers naturels des tiques se trouvent dans des endroits humides et abrités, sous-bois, lisières de forêt, bord de rivière, etc. Les tiques se nourrissent et se reproduisent dans des conditions climatiques particulières : températures entre 5 et 7°C et taux d'humidité supérieur à 92%. Dans les régions tempérées ces conditions sont généralement réunies au printemps et à l'automne (Estrada-Peña et de la Fuente 2014). Le réchauffement climatique a permis aux tiques de coloniser et s'installer dans des régions plus au Nord. En Suède, Norvège ou encore en Finlande, ainsi que dans des régions de plus hautes altitudes comme en Autriche (Süss et al. 2008; Holzmann et al. 2009) (Figure 15).



**Figure 15 :** Répartition géographique du virus du TBEV et de ces vecteurs. Les cercles représentent les sous-type de TBEV. La ligne pointillée définit la bordure de la zone d'endémie du virus de l'encéphalite à tiques. Adaptée de (Jaenson et al. 2012; Lindquist 2014)

Au cours des dernières décennies, le TBEV a été déclaré endémique en Europe où le sous-type « Western European » prédomine. En Sibérie, dans l'est de la Russie où l'on retrouve principalement le sous-type « Sibérien ». Enfin, dans le nord de la Chine et au Japon c'est le sous-type « Far-Eastern » qui est le plus représenté. (Randolph 2004) (Figure 15 et 16). (Süss 2011; Dobler et al. 2012).



**Figure 16 :** Répartition des cas confirmés de TBEV pour 100 000 habitants en Europe en 2019 (ECDC 2021)

SPF rapporte, en France, en mai 2020, 33 cas confirmés de TBEV par le Centre national de référence des Arbovirus (CNR ArboVirus). De plus, en observant les rapports de « European centre for disease prevention and control (ECDC) » on remarque que le nombre de cas a été multiplié par dix en France en seulement 8 ans. (Figure 17)

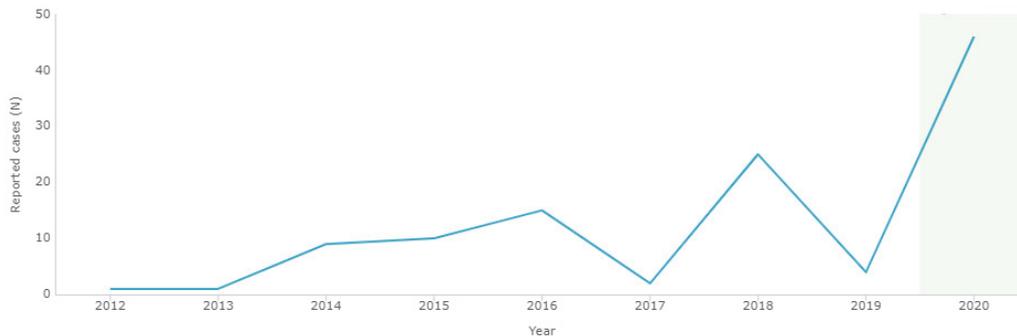


Figure 17 : Nombre de cas reportés de TBEV en France (ECDC 2021).

## b. Réservoir et transmission

Les tiques constituent le premier et le plus important réservoir pour le virus, en plus d'être vectrices de la maladie, puisqu'elles ont une longévité relativement importante et ne développent pas la maladie.

Les tiques sont les parasites de plus d'une centaine de mammifères, oiseaux et reptiles. Toutefois, ces espèces ne sont pas toutes des réservoirs pour le virus. Pour qu'un hôte soit considéré comme réservoir, il est nécessaire que sa virémie soit suffisamment longue et le titre infectieux assez élevé pour que la tique s'infecte lors de la morsure. De plus, comme la première infection entraîne une immunité à vie, il faut que le nombre de jeunes animaux non protégés soit également élevé. Parmi les mammifères, les meilleurs hôtes sont les petits rongeurs puisqu'ils présentent une virémie longue (Jaenson et al. 2012) contrairement aux ruminants qui ont une virémie de courte durée. Toutefois, ces derniers présentent, par leur grande taille, l'avantage de pouvoir nourrir simultanément plusieurs tiques, favorisant ainsi le co-feeding (Labuda et al. 1993). Les oiseaux quant à eux ne sont pas considérés comme réservoirs ayant une virémie trop courte, ils contribuent cependant au déplacement des tiques sur de grandes distances, et ainsi leur dissémination (Matile et al. 1981).

Les tiques peuvent s'infecter de plusieurs façons, tout d'abord durant leurs repas sanguins sur des hôtes virémiques. Par transmission trans-ovarienne quand la femelle transmet le virus à ses

œufs. Par transmission trans-stadiale, lorsqu'elle passe d'un stade de développement à un autre stade tout en maintenant le virus dans leur organisme. Par transmission horizontale ou co-feeding lorsqu'une tique non-infectée procède à son repas sanguin à côté d'une tique infectée, sur le même animal.

Egalement, l'Homme peut facilement rencontrer des tiques et s'infecter, et cela, de deux manières différentes (Sumilo et al. 2008). Soit lors d'une morsure directe d'une tique infectée soit en consommant du lait cru ou du fromage non pasteurisé issu d'animaux virémiques. Ce dernier point ne représente qu'un 1 % des cas de transmission du virus (Van Tongeren 1955; Bogovic et Strle 2015; Gonzalez et al. 2022). Pour autant l'Homme est considéré comme une impasse épidémiologique pour le virus. (Figure 18)

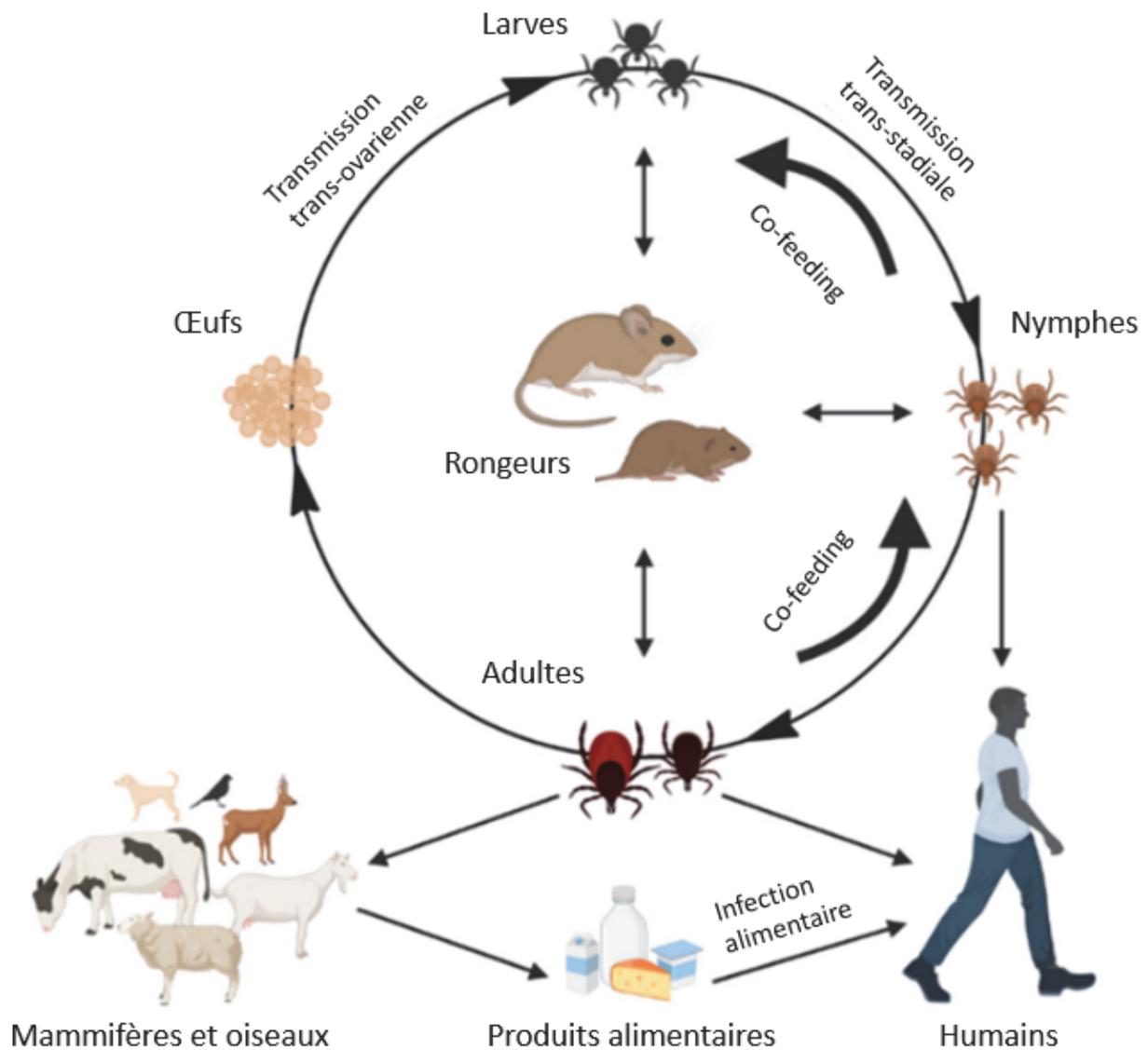


Figure 18 : Cycle naturel de la tique et transmission du TBEV aux mammifère. Adaptée de (Ličková et al. 2022).

### III. Traitement et prévention

#### a. Traitement

Il n'existe pas de traitement spécifique pour le TBEV c'est pourquoi le traitement symptomatique est le pilier de la prise en charge de l'infection.

En Russie et au Kazakhstan, des immunoglobulines spécifiques produites à partir de plasma de donneurs sont utilisées pour le traitement et la prophylaxie du TBEV (Dumpis, Crook, et Oksi 1999). En Europe, ces immunoglobulines spécifiques ne sont plus utilisées, car il semblerait que les anticorps augmentent l'effet de l'infection chez certains patients (Arras, Fescharek, et Gregersen 1996). Egalement, des agents antiviraux pourraient être de bons candidats pour le traitement de l'infection à TBEV mais, ils sont toujours en développement et aucun n'est utilisé en clinique (Haviernik et al. 2018).

#### b. Vaccin

Les vaccins européens sont utilisés depuis plus de 30 ans et se sont révélés extrêmement efficaces. En Europe, deux vaccins sont actuellement disponibles sur le marché : FSME-IMMUN (Pfizer, USA) et Encepur (GlaxoSmithKline, Allemagne) préparés respectivement avec la souche Neudoerfl du sous-type « European » et la souche « Karlsruhe ». Ces deux vaccins sont produits sur cellules embryonnaires de poulet (Girgsdies et Rosenkranz 1996; Barrett, Schober-Bendixen, et Ehrlich 2003).

Le protocole de vaccination du vaccin FSME-IMMUN, qui est efficace sur les 3 sous-types de TBEV, comprend trois doses (Hayasaka et al. 2001). Deux vaccinations à un mois d'intervalle et un rappel un an plus tard. Il existe également un schéma accéléré de vaccination, qui comprend 4 injections : J0, J7, J21 et un an après (Bock et al. 1990). Afin d'optimiser la protection virale, il est recommandé de renouveler ce protocole tous les 3 à 5 ans (Kunz 2003). Dans les régions européennes d'endémie, l'incidence du TBEV a considérablement diminué après la mise en place de la vaccination (Ruzek et al. 2019).

Trois vaccins sont produits et utilisés en Russie. Le « TBE vaccin Moscow® » et le « Tick-E-Vac® » sont produits à Moscou et sont basés sur la souche « Sofjin ». Le vaccin EnceVir® est basé sur la souche « 205 » du sous-type « Far-Eastern » (Ruzek et al. 2019).

### c. Lutte anti-vecteur

Il est relativement difficile de lutter contre les vecteurs, car le virus persiste chez les animaux sauvages ce qui implique de devoir contrôler toutes les populations de l'ensemble des espèces faisant partie des réservoirs du virus dans la nature.

Pour se protéger contre le TBEV, le meilleur moyen est d'éviter les morsures de tique. En évitant les zones d'endémies ou à risque et en portant des vêtements couvrants, serrés à leurs extrémités et clairs. Cela pour facilement repérer une tique si nécessaire. L'objectif premier étant de rendre le plus difficile possible l'accès à la peau au vecteur. Enfin, il est également possible de recouvrir sa peau de N,N-diéthyl-m-toluamide (DEET) ou de perméthrine (Banzhoff, Bröker, et Zent 2008). La vaccination reste néanmoins le moyen le plus sûr et le plus efficace de se protéger contre le TBEV.

### D. Systèmes de génétique inverse

La génétique « classique » est définie comme la voie permettant de déterminer le génotype responsable d'un phénotype particulier. Par exemple, des mutations spontanées ou des mutants induits par des composés mutagènes. La démarche est réalisée à « l'aveugle » mais va permettre, *in fine* d'obtenir la cartographie d'un gène.

Dans le contexte de la génétique inverse, il s'agit de déterminer l'impact d'une ou plusieurs mutations sur un gène déterminé sur le phénotype. Cette technique sélective et prédéfinie permet d'étudier et de comprendre la fonction d'un gène. Cette dernière est fréquemment utilisée pour étudier les virus à ARN, et pour diverses raisons comme par exemple leurs modes de réplication, leurs pathogénicités, ou encore pour les études d'antiviraux ou de vaccins.

Aujourd'hui, il existe plusieurs outils différents de génétique inverse avec leurs propres avantages et inconvénients. Ici, sont présentées deux méthodes adaptées aux virus à ARN : celle du clone infectieux et celle appelée « ISA » (Infectious Subgenomic Amplicons).

## 1. Clone infectieux

Un clone infectieux est un fragment d'ADNc, qui peut être issu de la transcription inverse d'un ARN viral génomique, inséré dans un vecteur (plasmide). Ce fragment est par la suite amplifié par clonage à l'intérieur d'un hôte généralement bactérien. Une fois extrait de cet hôte, il est transféré à l'intérieur de cellules permissives et permet la production de virus infectieux.

Pour pouvoir utiliser cet outil, il est nécessaire d'obtenir la séquence d'ADNc du virus d'intérêt. Il y a deux manières d'obtenir ces fragments, soit par synthèse *de novo* (de plus en plus utilisée car elle ne nécessite pas d'avoir accès à un isolat viral) soit par RT-PCR (Gritsun et Gould 1995a). Ensuite, il faut incorporer cet ADNc dans un vecteur, généralement un plasmide bactérien. Une fois l'ADNc vectorisé, il est amplifié par clonage au sein de l'hôte. L'hôte le plus commun est la bactérie *Escherichia coli* (Casali 2003). Mais il est également possible d'utiliser des Chromosomes Artificiel de Levure (CAL) qui sont des plasmides possédant des séquences de levures (Polo et al. 1997).

Pour initier la transcription de l'ADNc en ARN viral, un promoteur est situé en amont de la séquence. Ce promoteur est généralement le promoteur du cytomégalovirus (pCMV) quand le processus se déroule dans des cellules eucaryotes. Une autre technique consiste, avec ce clone infectieux, à conduire une transcription *in vitro* à l'aide d'un promoteur bactériophage (T7 ou SP6) ce qui permet par la suite de transférer directement un ARN infectieux complet dans des cellules (Khromykh et al. 2001).

Toutefois, les plasmides sont hautement susceptibles de subir des réarrangements génétiques ou d'acquérir des mutations, c'est pourquoi il est obligatoire de les séquencer afin de s'assurer de leur intégrité génomique (Hohn et Collins 1980; Monaco et Larin 1994; Gritsun et Gould 1995b; Polo et al. 1997) (Figure 19).

D'autre part, certaines séquences virales peuvent être toxiques pour la bactérie. En effet, l'étape de clonage est réalisée afin d'obtenir une quantité importante de plasmides afin de récupérer suffisamment de matériel génétique viral. Cette accumulation de plasmides, et de ce fait de protéines virales, peut devenir toxique pour la bactérie. C'est pourquoi cela nécessite des conditions spécifiques de production pouvant nuire ou diminuer le rendement de colonie bactérienne et donc de matériel génétique récupéré (Ruggli et Rice 1999). Également, il est

possible d'utiliser des levures lorsque l'utilisation de bactéries est trop complexe comme par exemple *Saccharomyces cerevisiae*.

Il est encore aujourd'hui difficile de construire et d'isoler certains clones infectieux. C'est pourquoi de nombreuses variantes de cette technique, mais aussi des nouvelles méthodes ont vu le jour.

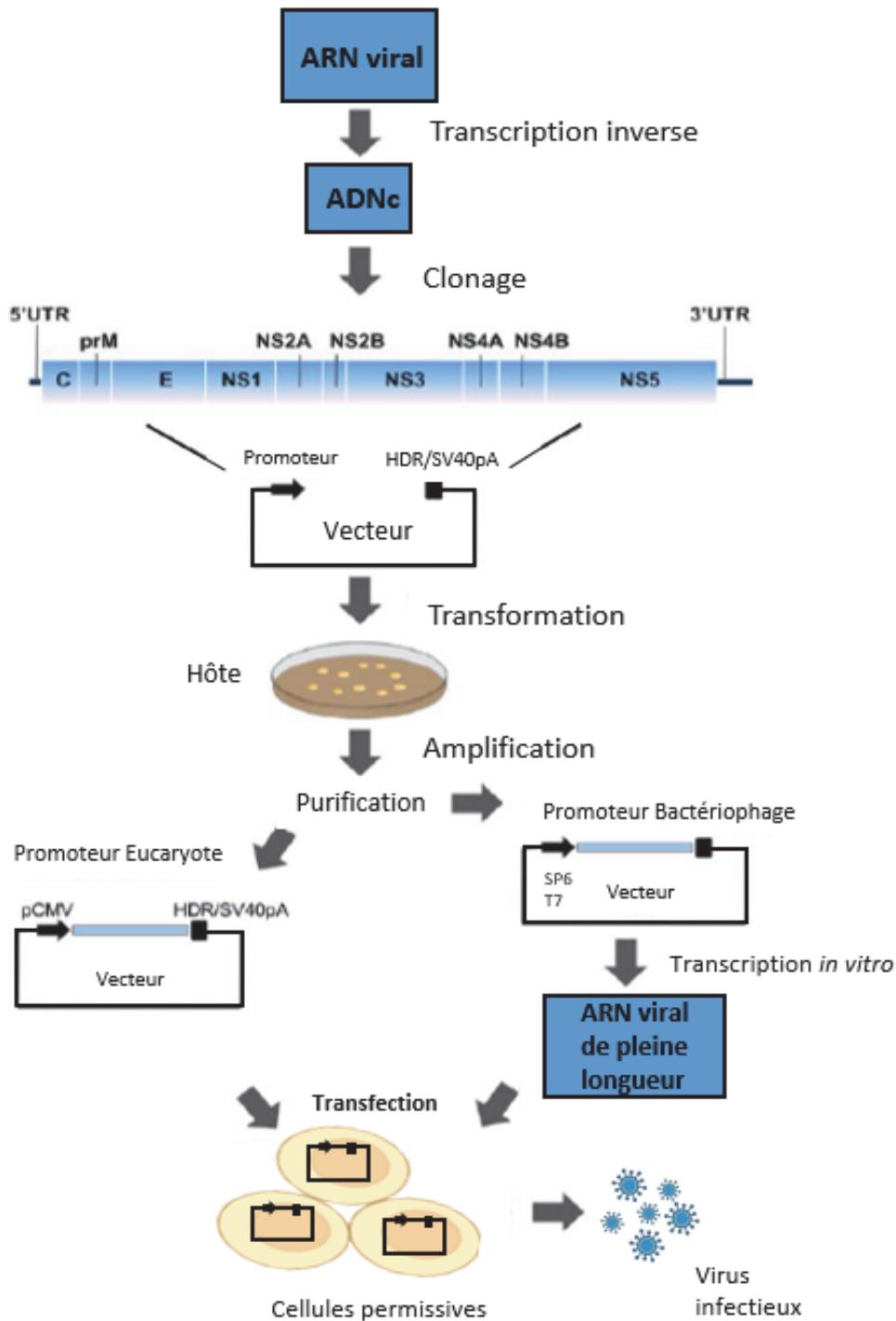


Figure 19 : Schéma résumant les différentes étapes de la méthode du clone infectieux – Adaptée de (Aubry, Nougairède, Gould, et al. 2015)

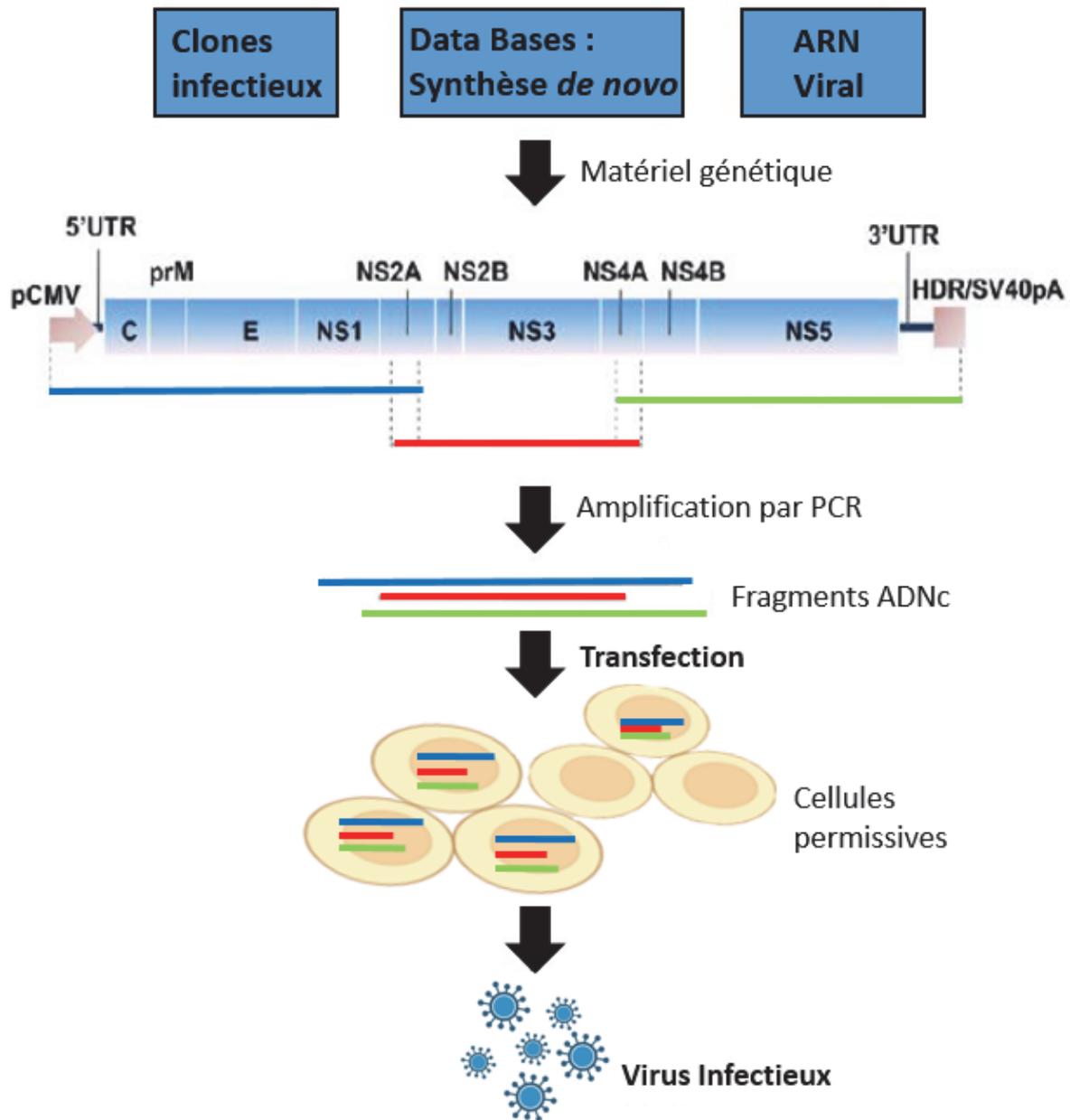
## 2. Méthode « Infectious Subgenomic Amplicons » (ISA)

La méthode ISA est un exemple de méthode simple et rapide ne nécessitant pas d'étape en bactérie. Elle a été développée ces dernières années pour les virus à génomes à ARN monocaténaire à polarité positif, comprenant les membres des familles *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Picornaviridae* et plus récemment *Nidovirales* (Aubry et al. 2014; Aubry, Nougairède, de Fabritus, et al. 2015; Atieh et al. 2016; 2017; Touret et al. 2019; Mélade, Piorkowski, Touret, et al. 2021).

Alors que les systèmes génétiques inverses conventionnels sont chronophages et/ou nécessitent des étapes de clonage fastidieux ou encore la manipulation *in vitro* de longues molécules d'ARN, la méthode ISA s'affranchit de ces difficultés et permet de produire en quelques jours des virus infectieux sauvage et génétiquement modifiés. La méthode ISA est basée sur la simple transfection de fragments d'ADNc sg chevauchants, recouvrant l'ensemble du génome viral, dans des cellules permissives. La recombinaison de l'ADNc ainsi que la production d'ARN génomique viral de pleine longueur, sous des signaux de transcription, sont accomplies par la machinerie cellulaire.

Cette technique, publiée en 2014, consiste en l'amplification par PCR de plusieurs fragments chevauchants d'ADNc d'un génome viral entier. Le premier fragment possède à son extrémité 5' la séquence promotrice du pCMV. Le dernier fragment dispose à son extrémité 3' le ribozyme du virus de l'hépatite delta suivi du signal de polyadénylation du virus simien 40 (HDR / SV40pA).

La transfection directe de ces fragments d'ADN, en quantité équimolaire au sein de cellules permissives permet la production de virus infectieux. L'assemblage de ces fragments, comme la production d'ARN viral, se réalisent directement *in cellulo*, simplifiant ainsi la procédure. Cette méthode de production virale est un nouvel outil qui permet une étude facilitée des caractéristiques des virus (Figure 20).



**Figure 20** : Schéma résumant les différentes étapes de la méthode « Infectious Subgenomic Amplicons ». Adaptée de (Aubry, Nougairède, Gould, et al. 2015)

Ces dernières années, des variantes de cette méthode ont été développées. La méthode « ISA-lation » permet d'isoler des virus à ARN monocaténaire à partir d'échantillons cliniques ou animaux (Aubry, Nougairède, de Fabritus, et al. 2015). La méthode « Haiku » cherche à simplifier encore plus la méthode ISA en fournissant les séquences de pCMV et HDR/SV40pA terminales sous forme d'amplicons d'ADN distincts supplémentaires. De plus, pour certains virus et dans des conditions bien spécifiques, la présence du HDR/SV40pA n'est plus indispensable à la production du virus (Atieh et al. 2018).

## I. Applications

### a. En recherche

Les systèmes de génétique inverse permettent la manipulation et la mutagenèse dirigée de génomes viraux (délétion/insertion/mutation et/ou réarrangement). L'étude des caractéristiques de ces virus modifiés a permis d'enrichir nos connaissances sur les caractéristiques répliquatives, biologiques et pathogènes de ces virus.

Ces outils nous permettent d'étudier les conséquences d'introduction de mutations unique dans les génomes viraux. Une étude a permis de mettre en évidence que l'introduction de 5 mutations ponctuelles dans le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et du virus du Nil occidental (WNV) et 3 dans le TBEV provoquaient une neurovirulence réduite chez la souris. A contrario, une seule mutation dans le génome du JEV provoquait une augmentation de la neurovirulence (Mandl et al. 2000; Thomas P. Monath et al. 2002).

Ces systèmes permettent de mieux comprendre la nature des interactions virus/hôte concernant les déterminants de la virulence, les interactions avec la machinerie cellulaire et la spécificité d'hôte. Mais aussi d'étudier le rôle des protéines virales.

Les méthodes de génétique inverse ont permis de développer de nouvelles approches concernant la production de candidats-vaccins comme par exemple le développement de virus chimériques. Les premiers virus de cette sorte ont été construits en utilisant comme « base » une souche du virus de la dengue DENV-4 et en remplaçant certaines régions par les gènes correspondants des virus DENV-1, DENV-2 ou DENV-3 (W. Chen et al. 1995). Mais aussi de découvrir et caractériser de potentielles molécules antivirales, et de comprendre certaines pharmaco-résistances (T. P. Monath et al. 1999).

En introduisant dans un génome par génétique inverse, la ou les mutation(s) suspectée(s) d'être responsable(s) de la résistance acquise d'un virus à un antiviral donné, le phénotype de l'ensemble des virus mutés peut être déterminé. C'est ce mécanisme qui a été utilisé, par exemple, pour caractériser le mécanisme de résistance des virus de la dengue à la molécule de Brequinar (Qing et al. 2010). Plus récemment, des travaux sur le SARS-CoV-2 et la molécule Remdesivir ont montré qu'une mutation dans la NSP12 (E802D) provoquait une diminution de la sensibilité du virus vis-à-vis du Remdesivir (Szemiel et al. 2021; Gandhi et al. 2022)

## b. Clonalités des populations virales

La faible fidélité des ARN polymérase virales aboutit, au cours de la réplication, à des taux de mutations élevés. Il en résulte que les populations virales sont généralement composées d'une distribution complexe de génomes variants non-identiques mais étroitement apparentés, appelés quasi-espèces virales. On parle alors de « spectre de mutant » (Holmes et Moya 2002).

Ce « spectre de mutant » est encore élargi chez les arbovirus en raison de l'alternance entre arthropodes vecteurs et les hôtes vertébrés imposant des contraintes de spécificités d'hôte. Le phénotype viral observé est dépendant de ce « spectre de mutant » (Ciota et al. 2007). Néanmoins pour les Flavivirus, les contraintes sont doubles car le virus doit être à la fois capable de se répliquer en mammifère et en insecte, ce qui est un frein à une grande diversité virale. En effet, s'il acquiert spécifiquement des mutations dans l'un des hôtes, il est possible qu'il ne puisse plus se répliquer dans le deuxième ce qui conduit à un phénomène appelé « bottle neck ».

Suivant la méthode de génétique inverse utilisée, la population virale produite pourra être plus ou moins homogène : si le virus est cloné au sein d'un vecteur alors la population sera clonale appauvrissant le « spectre de mutant ». A l'inverse les méthodes de type « ISA », grâce aux étapes de PCR qu'elles mettent en œuvre, permettent de conserver une certaine hétérogénéité en fonction de la fidélité de la polymérase utilisée. Plus la polymérase sera de haute-fidélité, moins le « spectre du mutant » sera important. L'utilisation de polymérase permet également de « mimer » l'hétérogénéité rencontrer naturellement au sein de quasi-espèces virales.

Il est donc indispensable de sélectionner en amont de l'expérimentation le système le plus adapté afin de répondre à la question posée. Chaque méthode présentant ses propres avantages et inconvénients.

## Objectifs du projet

Dans le cadre de mon projet EPHE, j'ai appliqué cette méthode de génétique inverse pour développer des outils thérapeutiques contre les virus FeCoV, PRRSV, SARS-CoV-2 et TBEV. Les objectifs de mon projet sont (i) d'utiliser des pathogènes animaux stricts (FeCoV et PRRSV), pour générer des virus sauvages puis des virus atténués d'intérêt vétérinaire. Le but étant d'obtenir des candidats vaccins dans le cadre d'une collaboration avec VIRBAC, une entreprise française spécialisée dans les produits de santé animal notamment les vaccins.

Plus spécifiquement, ma mission est d'optimiser la méthode de génétique inverse « ISA » et de mettre au point un protocole de couplage aux outils de génie génétique (technique de réencodage aléatoire de codons, délétions de nucléotides, mutagenèse dirigée) pour la production rapide de clones génétiquement modifiés et atténués à visée vaccinale permettant par la suite d'appliquer ce modèle à des pathogènes humains.

Le deuxième objectif (ii) est de pouvoir transférer cette technologie pour produire des virus fluorescents pour le criblage et la caractérisation d'antiviraux qui pourront par la suite être utilisés dans le cadre des activités de la plateforme de criblage viral (PCVMT) ou des projets de recherche interne. En se délestant des contraintes d'extraction d'acide nucléique, de la réalisation de RT-PCR en temps réel ou encore d'évaluation de la viabilité cellulaire, l'utilisation d'un virus fluorescent permettrait une économie de temps et de matériel.

Initialement, je devais générer des Flavivirus fluorescents, notamment le TBEV, mais suite à l'émergence du SARS-CoV-2 nous nous sommes prioritairement intéressé à celui-ci. J'ai donc travaillé sur la génération d'un SARS-COV-2 recombinant fluorescent et j'ai caractérisé une molécule antivirale comme preuve de concept en amont du travail initialement prévu sur TBEV. Une fois la méthode validée sur SARS-CoV-2 j'ai pu procéder à la génération d'un TBEV fluorescent mCherry et au criblage primaire d'une bibliothèque de molécules antivirales.

# Matériel et méthode

## A. Design, production et purification des fragments ADNc

### Design:

Coronavirus (FeCoV/SARS-CoV-2):

Huit fragments d'ADN synthétiques se chevauchant ont été conçus et synthétisés *de novo* par les fabricants (GenScript ou Thermo Fisher Scientific) sur la base de séquences complètes. Le premier a directement été synthétisé avec le pCMV à son extrémité 5'. Le dernier fragment a été synthétisé avec le HDR/SV40pA à son extrémité 3'. Pour construire les souches D614, un codon GGT (Glycine) situé en position 614 de la protéine Spike, correspondant au génome de la souche Wuhan SARS-CoV-2 (Genbank : NC045512), a été remplacé par le codon GAT (Acide aspartique) sur le nouveau fragment (Fragment 7). Ce fragment 7 « D614 » a été synthétisé *de novo* par ThermoFisher Scientific. Pour construire la souche fluorescente mCherry, l'ORF3a du « Fragment 7 D614 » (position 25 392–26 221 ) a été supprimé et remplacé par la séquence codante de la protéine fluorescente rouge (Genbank : AY678264 ) puis synthétisé *de novo* (Thermo Fisher Scientific).

PRRS :

A partir de la séquence cible, 4 fragments d'ADN synthétiques se chevauchant ont été conçus *in silico* et commandés (GenScript). Le premier et dernier fragment étaient directement flanqués à leurs extrémités 5' et 3' par le pCMV et le HDR/SV40pA respectivement lors de la synthèse *de novo*.

TBEV :

Trois fragments d'ADN synthétiques se chevauchant ont été conçus *in silico* et clonés dans un vecteur pUC57 ou PC11 et fournis par le fabricant (GenScript). Le premier et dernier fragment étaient flanqués respectivement en 5' et 3' du pCMV et du HDR/SV40pA. Le gène mCherry était situé dans le fragment I en aval du 5'UTR complet et des 72 premiers nucléotides du gène codant pour la protéine C. La séquence codant mCherry était flanquée des séquences de saut de ribosome P2A et T2A à ses extrémités 5' et 3' respectivement, et suivie de la séquence codant la protéine C pleine longueur (comprenant également les 72 premiers nucléotides insérés avant la séquence mCherry).(Haviernik et al. 2021)

## **PCR :**

Les ADNc ont été amplifiés à partir de ces fragments synthétiques en tant que matrices. Un kit de polymérase PCR Super Fidelity (Thermo Fisher Scientific) a été utilisé. Les séquences, les temps d'élongations (TE) et la température de demi-dénaturation (T<sub>m</sub>) sont décrits dans les tableaux I, II, III, IV.

Le mélange final contenait 25 µl de mélange réactionnel, 2 µl d'ADN (1 ng/µl), 100 nM de chaque amorce et 20 µl d'eau sans nucléase. Les réactions de PCR ont été réalisées sur un thermocycleur Biometra TProfessional Standard Gradient dans les conditions suivantes : 98°C pendant 2 min suivi de 35 cycles de 98°C pendant 10 s, 55–65°C (suivant le virus) pendant 10s, 72 °C pendant 30s/kb, et 72°C pendant 5 min.

## **Purification :**

Les amplicons ont été purifiés sur colonne avec le Kit de nettoyage PCR et ADN Monarch<sup>®</sup> (New England Biolabs) en respectant le protocole du fabricant.

## **Electrophorèse sur gel d'agarose :**

La taille des produits de PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel d'agarose est composé de Tris-Borate-EDTA 0,5X, d'agarose en poudre (1 %) et d'un intercalant d'ADN permettant leur visualisation : SyberSafe (Invitrogen). Les échantillons sont mélangés à un tampon de charge 6X Loading Dye (Promega), puis déposés dans les puits du gel d'agarose avec un marqueur de taille 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). La migration est réalisée à 100 V pendant 20 minutes.

L'intégrité de chaque fragment d'ADN a été par la suite confirmée par séquençage NGS à l'aide de la technologie Ion Torrent (Thermo Fisher), avant transfection.

**Tableau I :** Tailles des fragments d'ADNsg et séquences des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification de l'ADNc du FeCoV.

Amorces				TE	Tm
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorce (pb)	Taille fragments (pb)		
<b>F1</b>					
PIF S1 F	GAATAAGGGCGACACGAAA	20	3297	2min15	60
PIF S1 R	GCATCAGAATCGCTTTG	18			
<b>F2</b>					
PIF S2 F	GGGTGTAGAACTTGAAGGCT	20	3387	1min45	58
PIF S2 R	GGGTTGTTGCATGGTAGGAA	22			
<b>F3</b>					
PIF S3 F	GCTGGTTTTTGCATGTTGTC	20	4318	2min15	56
PIF S3 R	AAACTAAGAATCATAGCA	18			
<b>F4</b>					
PIF S4 F	GTGTTTACCAATTTACGGTT	20	4484	2min15	60
PIF S4 R	GGCTAGCATAAAACTCTTCA	20			
<b>F5</b>					
PIF S5 3 F	GGGTAAACATCTACAGAAAAA	22	5728	3min30	58
PIF S5 3 R	AAATAATAATGGTTTACCACGT	22			
<b>F6</b>					
PIF S6 4 F	GCCTTTATTTTGTATGGAAGC	23	2964	1min45	55
PIF S6 4 R	GGTTTTTATTCAATACATCAGTT	24			
<b>F7</b>					
PIF S7 F	GCAGTAGCAGTACAGGCTAG	20	3542	2min15	58
PIF S7 R	ATCATTATTCTCCGACC	18			
<b>F8</b>					
PIF S8 F	AAATGGCCACACAGGGAC	18	2346	2min15	58
PIF S8 R	CTCAGGGTCAATGCCAGCGC	20			

**Tableau II :** Tailles des fragments d'ADNsg et séquences des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification de l'ADNc du PRRSV

Amorces				TE	Tm
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorce (pb)	Taille fragments (pb)		
<b>F1</b>					
PRRS S1 F	GAATAAGGGCGACACGAAA	20	4406	2min15	64
PRRS S1 R	ACTCCCGCGGCGATATCAGGG	21			
<b>F2</b>					
PRRS S2 F	AAATGGGAGACGCTAACGAAC	21	3770	2min15	64
PRRS S2 R	GCTAATATGGACCTCTTCAT	20			
<b>F3</b>					
PRRS S3 F	GTACCAGAAATTTGGGACA	20	4700	2min15	64
PRRS S3 R	AAATGAAACCTCATGTTGGT	20			
<b>F4</b>					
PRRS S4 F	GTGAGGACTGGGAGGATTAC	20	4045	2min15	64
PRRS S4 R	CTCAGGGTCAATGCCAGCGC	20			

**Tableau III :** Tailles des fragments d'ADNsg et séquences des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification de l'ADNc du TBEV Hypr.

Amorces				TE	Tm
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorces (pb)	Taille Fragments (pb)		
<b>F1</b>					
F1 Hypr F	GAATAAGGGCGACACGGAAATGT	23	4400	2min30	64
F1 Hypr R	CGAGAACGACGATGCCTCCCC	21			
<b>F2</b>					
F2 Hypr F	CGGAATAGTGGCATTGTTTGTGGT	24	4500	2min30	64
F2 Hypr R	AGTTCCAACCCAGGCTTGTTACC	23			
<b>F3</b>					
F3 Hypr F	GTGTCAGGGCATAACCATTGGT	24	3100	2min30	64
F3 Hypr R	TACTGGAACGTTGTGAGGGTAAAC	24			

**Tableau IV :** Tailles des fragments d'ADNsg et séquences des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification de l'ADNc du SARS-CoV-2.

Amorces				TE	Tm
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorce (pb)	Taille fragments (pb)		
<b>F1</b>					
pCMV F-1	TCAATATTGGCCATTAGCCATA	22	3777	2min	55
NCoV_R-1 Mut	GGGTAAAAAGAACAATACATATGTG	25			
<b>F2</b>					
NCoV_FII F-1	GCATTGATTTAGATGAGTGGAGTAT G	26	4279	3min	55
NCoV_FII R-1	GCAGTTAAATCCCATTAAAAGATG	25			
<b>F3</b>					
NCoV_FIII F-1	GTGGTTTAGATTCTTTAGACACC	23	4254	3min	55
NCoV_FIII R-1	GTGTCCACACTCTCCTAGCACC	22			
<b>F4</b>					
NCoV_FIV F-2	GTGTTATGTATGCATCAGCTG	21	3876	2min30	61
NCoV_FIV R-1	GTGGCGGCTATTGATTTCAAT	21			
<b>F5</b>					
NCoV_FV F-1	AGTACTATGACCAATAGACAGTTTC	25	4212	3min	60
NCoV_FV R-1	ACTTTTATCAAAAAGCTGGTGTGTGG	25			
<b>F6</b>					
NCoV_FVI F-1	GCTATCTAACCTTAACTTGCC	21	3874	2min30	57
NCoV_FVI R-1	GCTGGTGCATGTAGAAGTTC	20			
<b>F7</b>					
NCoV_FVII F-1	GCACACCTTGTAATGGTGTG	21	3727	2min15	60
NCoV_FVII R-1	GCAAATTGTAGAAGACAAATCC	22			
<b>F8</b>					
NCoV_FVIII F-1	GCAGATTCCAACGGTACTATTACC	24	3555	2min	60
HDRSV-40 R-1	AATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTC	26			

## B. Générations de virus recombinants (Méthode ISA)

### 1. Souches virales et sérums humains

- Le FeCoV a été obtenu auprès de l'American Type Culture Collection (référence ATCC : VR-2126)
- Un isolat original de PRRSV a été fourni par le laboratoire VIRBAC (numéro d'accès Genbank : MW366748)
- Une souche clinique ancestrale européenne (D614G) de SARS-CoV-2 a été fournie par le Pr. Christian Drosten (Charité, Berlin) de la plateforme EVAg (isolat humain BetaCoV/Allemagne/BavPat1/2020 p.1 ; référence : 026V-03883)
- La souche Hypr du TBEV utilisée a été obtenue via la plateforme EVAg (Ref-SKU : 001V-03676)
- Sérums humains : 24 sérums humains ont été testés pour la présence d'anticorps neutralisants du SARS-CoV-2 (nAbs). Ces échantillons étaient excédentaires aux besoins d'un programme de recherche sur le SARS-CoV-2 (Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2020-A01653- 36, financé par l'Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille et labellisé par le Comité d'Ethique du Sud-Ouest et d'Outre-Mer II) où les participants ont fourni un consentement écrit à la recherche sur l'immunité humorale contre le SARS-COV-2. Tous les sérums humains ont été inactivés par la chaleur à 56°C pendant 30 min avant anonymisation et test.

### 2. Culture cellulaire

#### **FeCoV :**

Des expériences antérieures ont montrés que les cellules de reins de bébés hamsters (BHK-21; ATCC CCL-10) étaient les cellules les plus permissives à la transfection. Celles-ci ont été cultivées dans du milieu essentiel minimum (MEM) avec 5 % de sérum de veau foetal (FCS) inactivé à 50 °C pendant 30 minutes, 1 % de L-glutamine (200 mM), 5 % de tryptose phosphate et 1 % de pénicilline/streptomycine (P/S ; 5000 U/mL ; 5 mg/mL). Les cellules permissives à l'infection sont des cellules de fibroblastes embryonnaires félines (FeA appartenant à Virbac, non répertoriées ATCC), cultivées dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM ; Life Technologies) avec 10 % FCS et 1 % P/S, et des cellules épithéliales pulmonaires félines (AK-D; ATCC CCL-150) cultivées dans un mélange de milieux Ham's F12 (F12) et Leibovitz (L-

15) (v/v) avec 7% FCS et 1% PS. Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère à 37 °C et contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **PRRS :**

Les cellules permissives à la transfection sont des BHK-21 ; Les cellules permissives à l'infection sont des cellules rénales de singe MARC-145 exprimant le récepteur de sialoadhésine CD-169 (cellules MARC-Sn), elles ont été cultivées dans du MEM, GlutaMAX avec 10 % de FCS, 1 % de P/S (10 000 U/mL ; 10 mg/mL) et 0,5 % de gentamycine (10 000 U/mL). MARC-Sn ont été aimablement fournies par le Dr Hans Nauwynck (Université de Gand, Belgique). Ces cellules ont été cultivées à 37° dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **SARS-CoV-2 :**

Les cellules utilisées pour les transfections sont des BHK-21. Les cellules utilisées pour les passages sont des Vero-E6 (cellules épithéliales de rein extraites d'un singe vert africain, ATCC CRL-1586). Elles ont été cultivées du MEM additionné de 7,5 % de FCS avec 1 % de P/S (5000 U.mL<sup>-1</sup> ; 5000 µg mL<sup>-1</sup>) et supplémenté avec 1 % d'acides aminés non essentiels. Elles sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>

#### **TBEV :**

Les cellules utilisées pour les transfections sont des BHK-21, cultivées dans les mêmes conditions que précédemment. Le criblage de molécules antivirales a été réalisé sur de cellules BHK-21.

### **3. Transfection cellulaire**

#### **Coronavirus :**

Les 8 fragments d'ADNc sg recouvrant l'intégralité des génomes du SARS-CoV-2 ou du FeCoV ont été mélangé de manière équimolaire (entre 25 et 55 ng/fragment selon leur longueur, pour une quantité totale de 300ng/plaque de transfection). Ils ont ensuite été transfecté dans des plaques 96 puits de cellules BHK-21 pour le SARS-CoV-2 et une coculture BHK-21 et FeA pour le FeCoV, avec de la Lipofectamine 3000 (Thermo Fischer Scientific). Le mélange ADNc et Lipofectamine a été incubé 45 minutes à température ambiante avant d'être mis en contact avec les cellules. Les plaques (cellule + lipofectamine + ADNc) ont été incubé à 37° pendant

24h. Suite à cette incubation, une suspension de cellules VeroE6 a été ajoutée dans les plaques contenant le SARS-CoV-2 puis de nouveau incubées pendant 5j à 37° et 5% de CO<sub>2</sub>. Pour les plaques contenant le FeCoV, du milieu frais a été ajouté, suivi d'une nouvelle incubation pendant 5j à 37° et 5% de CO<sub>2</sub>. Deux passages en série sur cellules VeroE6 ou AK-D, pour le SARS-CoV-2 ou le FeCoV respectivement, ont été réalisés afin de s'assurer que l'ADNc utilisé pour la transfection avait disparu. Pour cela, les cellules ont été incubées pendant 1h avec du surnageant clarifié, puis lavées 2 fois avec une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS ; Gibco) enfin du milieu frais a été ajouté et les plaques ont été de nouveau incubées pendant 2j. Au dernier passage, les surnageants ont été récoltés, clarifiés par centrifugation, aliquotés et stockés à -80°C. Ces stocks de virus ont été utilisés pour réaliser l'ensemble des expérimentations. De plus, pour s'assurer de la stabilité du gène rapporteur mCherry, 3 passages supplémentaires ont été effectués dans des cellules VeroE6.

#### **PRRSV :**

Les 4 fragments d'ADNc ont été regroupés de manière équimolaire (~75 ng/fragment ; quantité finale de 300 ng) avec de la Lipofectamine 3000 (Thermo Fischer Scientific) pendant 45 min et transfectés dans une coculture de cellules BHK-21 et MARC-Sn. Du milieu frais a été ajouté 24 h après la transfection et les plaques ont été réincubées pendant 5 jours à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Par la suite, deux passages en série sur cellules MARC-Sn ont été réalisés pour confirmer la disparition de l'ADNc issu de la transfection. Pour cela, les cellules ont été incubées pendant 1h avec du surnageant clarifié, puis lavées 2 fois avec une solution saline équilibrée de Hanks enfin du milieu frais a été ajouté et les plaques ont été de nouveau incubées pendant 3j. Après le 2ème passage, les surnageants ont été récoltés, clarifiés par centrifugation, aliquotés et stockés à -80 °C. Ces stocks de virus ont été utilisés pour effectuer l'ensemble des expérimentations.

#### **TBEV :**

Les 3 fragments d'ADNc ont été regroupés de manière équimolaire (~35 ng/fragment ; concentration finale de 100 ng) avec de la Lipofectamine 3000 (Thermo Fischer Scientific) pendant 45 min et transfectés dans des cellules BHK-21. Du milieu frais a été ajouté 24 h après la transfection et les plaques ont été réincubées pendant 5 jours à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 5 jours, le surnageant cellulaire a été récolté, centrifugé et passé en série 2 fois dans des cellules BHK-21 pour assurer la disparition de l'ADNc utilisé lors de la transfection. Chaque passage a été effectué en inoculant un milieu surnageant clarifié non dilué sur des cellules BHK-21 sous-

confluentes : après 2 h d'incubation, les cellules ont été lavées deux fois à l'aide d'une solution saline équilibrée de Hanks, du milieu frais a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 5 jours. Après le 2ème passage, les milieux surnageants cellulaires ont été récoltés, clarifiés par centrifugation, aliquotés et stockés à -80 °C. Ces stocks de virus ont été utilisés l'ensemble des expérimentations.

#### 4. Détection et production virale

L'ARN viral a été extrait de 100 µL de surnageant cellulaire issu des passages post-transfection à l'aide d'un kit QIAamp Viral RNA et d'un ensemble de DNase sans RNase sur le QIAcube automatisé (Qiagen), en suivant les instructions du fabricant. La quantification relative de l'ARN viral a été réalisée à l'aide de la qRT-PCR Express One-Step SuperScript® (Invitrogen). Le mélange contenait 5 µL de express qPCR SuperMix Universal, 0,25 µL de chaque amorce (500 nM), 0,1 µL de sonde (200 nM), 1 µL de mélange express SuperScript® RT et 3,5 µL d'acides nucléiques extraits. Les dosages ont été effectués à l'aide de la machine de PCR en temps réel QuantStudio 12 K Flex (Life technologies) dans les conditions suivantes : 50 °C pendant 15 min, 95 °C pendant 20 secondes, suivis de 45 cycles de 95 °C pendant 3 s, 60 °C pendant 30 s. La collecte de données a eu lieu au cours de l'étape de 60 °C. L'ARN synthétique a été utilisé pour calculer la quantité d'ARN viral à partir de courbes standard.

Une fois que la présence de l'ARN viral confirmée et quantifiée dans les stocks de virus, l'ensemble des manipulations ont été faites à partir d'aliquots à usage unique du dernier passage. Des flasques ventilées de 75cm<sup>2</sup> avec un tapis sous confluent ont été inoculées avec 100µl de surnageant de chaque virus et 400 µl de milieu. Après 2h d'incubation les tapis cellulaires ont été rincés avec une solution de HBSS, 20ml de milieu frais a ensuite été ajouté avant de remettre les flasques à incuber à 37° et 5% CO<sub>2</sub>. Après 4 jours, le surnageant a été récupéré, centrifugé et conditionné dans des aliquots de 100µL avec de l'HEPES (Gibco – 1M) à 0.1%.

#### C. Titration souches virales

##### 1. Dosage de la dose infectieuse 50 de culture tissulaire - TCID<sub>50</sub>

Des cultures sous-confluentes de cellules permissives dans des microplaques de 96 puits ont été utilisées pour la détermination de la TCID<sub>50</sub> du SARS-CoV-2, FeCoV, PRRSV et du TBEV. Les cellules ont été inoculées avec 100µL par puits de dilutions en série de chaque

échantillon (dilutions au dixième) et incubées pendant 3 à 6 jours selon le virus. Chaque ligne comprenait six puits de la dilution et deux contrôles négatifs. La lecture du titre infectieux a été réalisée par la présence ou l'absence d'ECP dans chaque puits. La détermination de la TCID<sub>50</sub>/ml a été effectuée en utilisant la méthode de Reed et Muench (Reed et Muench 1938).

## 2. TCID<sub>50</sub> lecture en fluorescence

### **TBEV :**

Afin de contrôler la méthode de lecture, le même protocole de TCID<sub>50</sub> a été réalisé pour le TBEV fluorescent mCherry. Les plaques ont ensuite été analysées après avoir retiré le milieu surnageant, lavé deux fois avec du PBS et fixé pendant 2 h avec PFA (4%). La lecture a été effectuée avec un <sup>®</sup>S3 Live-Cell Analysis Systems (Sartorius) selon les instructions du fabricant, avec un temps d'acquisition de 800 ms pour le canal rouge. Les intensités de fluorescence de plusieurs zones ont été obtenues à l'aide du logiciel Incucyte 2020B (Sartorius).

### D. Immunofluorescence directe (dIFA)

L'expression de la protéine de nucléocapside (N) dans la souche ISA et l'isolat d'origine du virus PRRS a été déterminée comme suit : les plaques P96, ayant servi à déterminer la TCID<sub>50</sub> de chacun des virus, ont été utilisées après lecture pour réaliser la dIFA. Elles ont été lavées avec du PBS, fixées 20 min avec du méthanol froid à 100 %, lavées à nouveau avec du PBS. Un anticorps monoclonal anti-nucléocapside de souris dilué (mAb 13E2 ; gracieusement fourni par le Dr Hans Nauwynck, Université de Gand, Belgique) est ensuite déposé sur ces cellules pendant 1 h à 37 °C. Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS et incubées avec un anticorps de chèvre anti-souris IgG FITC (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/100 pendant 1 h à 37 °C. Les plaques ont été lavées avec du PBS et lues pour la présence ou l'absence de la protéine N à l'aide d'un microscope à fluorescence DMI8 Leica.

### E. Dose réponse / EC<sub>50</sub> / EC<sub>90</sub>

L'efficacité antivirale du Remdesivir sur les souches de SARS-CoV-2 a été évaluée en déterminant la concentration efficace à 50 % (CE 50) comme précédemment décrit dans (Touret et al. 2020). La veille des infections, des cellules VeroE6 ( $5 \times 10^4$ ) contenues dans 100 µl de milieu (contenant 2,5 % de FCS) ont été déposées dans des plaques à 96 puits. Le lendemain, le composé Remdesivir (BLDPHARM, Shanghai, Chine) a été dilué au 1/2 huit fois de suite (de 20 à 0,15 µM) et ajouté aux cellules (25 µl/puits). Chaque dilution a été réalisée en triplicats. Quatre puits de contrôle du virus (sans composé) ont été complétés avec 25 µL de

milieu. Après 15 min, 25  $\mu$ L d'un mélange de virus calibré dilué dans du milieu ont été ajoutés à chaque puits. A l'exception de 4 puits de contrôle cellulaire (c'est-à-dire sans virus et sans composé) qui ont été complétés avec 25  $\mu$ L de milieu de dosage. Les quantités de DMSO (< 0.1%) étant négligeables et n'ayant aucun impact ni sur la viabilité cellulaire ni sur la réplication virale, le composé n'a pas été rajouté dans les différents contrôles. Les plaques ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C avant la quantification du génome viral par qRT-PCR en temps réel comme décrit précédemment. Pour les expériences de fluorescence, les plaques ont été analysées après avoir retiré le milieu surnageant, lavées deux fois avec du PBS et fixées pendant 2 h avec du PFA (4%) puis lues à l'aide du  $\text{\textcircled{R}}$  S3 Live-Cell Analysis Systems (Sartorius) selon les instructions du fabricant, avec un temps d'acquisition de 800 ms pour le canal rouge. Les intensités de fluorescence de plusieurs zones ont été obtenues à l'aide du logiciel Incucyte 2020B (Sartorius). Les courbes dose-réponse ont été générées à l'aide de GraphPad Prism 7.00 avec une régression linéaire à quatre paramètres. L'EC50 a été estimée en utilisant une interpolation logarithmique également avec GraphPad Prism 7.00. Cette expérience a été réalisée en deux répétitions biologiques et chaque expérience a été réalisée en triplicat.

## F. Cinétique de croissance

Des infections à des multiplicités d'infection (MOI) de 0,001 et 0,01 ont été réalisées à l'aide de cellules VeroE6 ou AK-D sous-confluentes pour le SARS-CoV-2 et le FeCoV, respectivement. Les cellules ont été lavées deux fois (HBSS) à 4 et 1 h post-infection par le SARS-CoV-2 et le FeCoV, respectivement, et du milieu frais a été ajouté. Les milieux de surnageant cellulaire ont été échantillonnés toutes les 12 h pendant 48 h, clarifiés par centrifugation, aliquotés et stockés à -80 ° C. Ils ont ensuite été analysés à l'aide du test RT-qPCR comme décrit ci-dessus.

Une MOI de 0,01 a été utilisé pour infecter une flasque de culture de 12,5 cm<sup>2</sup> de cellules MARC-Sn confluentes avec l'isolat obtenu avec ISA ou le PRRSV d'origine. Les cellules ont été lavées deux fois (HBSS) 1 h après l'infection et 4 ml de milieu ont été ajoutés. 400 $\mu$ L de surnageant cellulaire ont été prélevés toutes les 12 h jusqu'à 72 h après l'infection, clarifiés par centrifugation, aliquotés et stockés à - 80 ° C. Ils ont ensuite été analysés en utilisant le test RT-PCR en temps réel ou le test TCID<sub>50</sub> comme décrit ci-dessus.

Des infections à des multiplicités d'entrée de 0,01 et 0,1 ont été réalisées à l'aide de cellules BHK-21 sous-confluentes pour le TBEV. Les cellules ont été lavées deux fois (HBSS) à 2h post-infection et du milieu frais a été ajouté. Les milieux de surnageant cellulaire ont été

échantillonnés à 6H puis toutes les 24 h pendant 72h, clarifiés par centrifugation, aliquotés et stockés à -80 ° C. Ils ont ensuite été analysés à l'aide du test RT-qPCR comme décrit ci-dessus.

### G. Criblage primaire de la banque de molécules Prestwick (1520 composés)

La chimiothèque Prestwick, comprenant 1520 composés ayant tous déjà reçu une autorisation de mise sur le marché, a été criblée avec la souche de TBEV fluorescente mCherry comme décrit dans (Touret et al. 2020). Des cellules BHK-21 contenues dans 100 µl de milieu (contenant 2,5 % de FCS) ont été déposées dans des plaques 96 puits. Le lendemain, nous avons dilué en série de 2 fois chaque antiviral puis ils ont été ajoutés aux cellules (25 µl/puits, dans du milieu de dosage) pour obtenir une concentration finale en molécule de 10µM. Six puits de contrôle du virus ont été complétés avec 25 µL de milieu (VC). Après 15 min, 25 µL d'un mélange de virus calibré dilué (1/100e) dans du milieu ont été ajoutés à chaque puit. Huit puits de contrôle cellulaire(CC) (c'est-à-dire sans virus) ont été complétés avec 25 µL de milieu. Sur chaque plaque un composé contrôle le NITD008 ayant une activité pan-Flaviviruses (Yin et al. 2009) a été déposé en duplicat à 10µM. Les 19 plaques ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C. Les plaques ont été analysées après avoir retiré le milieu surnageant, lavé deux fois avec du PBS et fixé pendant 2 h avec PFA (4%).

La lecture a été effectuée avec le ® S3 Live-Cell Analysis Systems (Sartorius) selon les instructions du fabricant, avec un temps d'acquisition de 800 ms pour le canal rouge. Les intensités de fluorescence de chaque puits ainsi que leur confluence ont été obtenues à l'aide du logiciel Incucyte 2020B (Sartorius). Du ratio intensité de fluorescence/ confluence (Ifc) nous avons d'abord soustrait des valeurs des Ifc CC aux valeurs puis des pourcentages d'inhibition ont été calculés :  $100 \times \frac{\text{Ifc moyen VC} - \text{sample Ifc}}{\text{Ifc moyen VC}}$ . L'indice d'inhibition est le ratio entre

le pourcentage d'inhibition d'un échantillon/pourcentage d'inhibition du composé NITD008. Les composés ayant un indice d'inhibition >1 sont plus actifs que le composé NITD008 dans ce système et sont considérés comme des succès (« Hits »).

### H. Séquençage

Le séquençage a été effectué à partir du milieu de surnageant de culture cellulaire issu des passages post-transfection pour déterminer les séquences entières du génome viral et s'assurer qu'il n'y a pas de dérive dans la séquence consensus. L'extraction de l'acide nucléique a été

réalisée à l'aide de la machine EZ1 advanced XL (Qiagen) avec le kit EZ1 Virus Mini v2.0 (Qiagen). Une qRT-PCR en temps réel a été réalisée comme décrite précédemment pour confirmer la présence de copie d'ARN dans les échantillons.

Une amplification par RT-PCR a ensuite été réalisée et les produits ont été envoyés à la plateforme de séquençage NGS. Le kit utilisé est le SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System (ThermoFisher Scientific). Les séquences d'amorces utilisées pour amplifier le génome entier sont disponibles dans les tableaux V, VI, VII, VIII. Les produits de RT-PCR ont été purifiés (Monarch® Kit de nettoyage PCR et ADN ; New England Biolabs) et mélangés dans des proportions équimolaires. Après quantification de la concentration d'ADN au Qubit (Qubit® dsDNA HS Assay Kit) et au fluorimètre Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific), les amplicons ont été soniqués pour produire des fragments de 200 pb environ.

La plateforme séquençage à procéder comme suit : les bibliothèques ont été construites en ajoutant des codes-barres, pour l'identification des échantillons et des amorces spécifiques, à l'ADN fragmenté à l'aide du système AB Library Builder (Thermo Fisher Scientific). Pour regrouper les échantillons possédant un code-barres dans des proportions équimolaires, une étape de quantification a été effectuée à l'aide d'une PCR en temps réel avec le kit de quantification Ion Library TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific).

La PCR en émulsion des échantillons réunis et le chargement sur une puce 530 ont été réalisés à l'aide de l'instrument automatisé Ion Chef (ThermoFisher). Le séquençage a été réalisé à l'aide de la technologie S5 Ion torrent v5.12 (Thermo Fisher Scientific) en suivant les instructions du fabricant. La séquence consensus a été obtenue après découpage des lectures (les lectures avec un score de qualité < 0,99, une longueur < 100 pb ont été supprimées et les 30 premiers et derniers nucléotides ont été supprimés des lectures) et la cartographie des lectures sur une référence (déterminée après l'explosion de De Novo contigs) à l'aide du logiciel CLC genomics workbench v.20 (Qiagen). *Des contigs de novo* ont été produits pour s'assurer que la séquence consensus n'était pas affectée par la séquence de référence. Les mutations avec des fréquences > 50% dans les lectures de séquençage ont été définies comme des mutations majoritaires. Des mutations avec des fréquences comprises entre 5 et 50 % dans les lectures de séquençage ont été identifiées et considérées comme des mutations minoritaires.

**Tableau V** : Position et séquence des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification du génome de FeCoV dans le surnageant cellulaire.

Amorces				TE	T <sub>m</sub>
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorce (pb)	Taille fragments (pb)		
<b>F1</b>					
PIF1 4 F	ACTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGC G	26	3297	2min15	58
PIF S1 R	GCATCAGAATCGCTTTTG	18			
<b>F2</b>					
PIF S2 F	GGGTGTAGAACTTGAAGGCT	20	3387	1min45	62
PIF S2 R	GGGTGTTGTCATGGTAGGAA	22			
<b>F3</b>					
PIF S3 F	GCTGGTTTTTGCATGTTGTC	20	4318	2min15	52
PIF S3 R	AAACTAAGAATCATAGCA	18			
<b>F4</b>					
PIF S4 F	GTGTTTACCAATTTACGGTT	20	4484	2min15	57
PIF S4 R	GGCTAGCATAAAACTCTTCA	20			
<b>F5</b>					
PIF S5 3 F	GGGTAAACATCTACAGAAAAA	22	5728	3min30	57
PIF S5 3 R	AAATAATAATGGTTTACCACGT	22			
<b>F6</b>					
PIF S6 4 F	GCCTTTTATTTTGTATGGAAGC	23	2964	1min45	57
PIF S6 4 R	GGTTTTTATTCAATACATCAGTTT	24			
<b>F7</b>					
PIF S7 F	GCAGTAGCAGTACAGGCTAG	20	3542	2min15	54
PIF S7 R	ATCATTATTCTTCCGACC	18			
<b>F8</b>					
PIF S8 F	AAATGGCCACACAGGGAC	18	2346	2min15	57
PIF_S8_Poly8A_R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGT GTATCACTATCAAAGGAAA	47			

**Tableau VI** : Position et séquence des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification du génome de PRRSV dans le surnageant cellulaire.

Amorces				TE	T <sub>m</sub>
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorce (pb)	Taille fragments (pb)		
<b>F1</b>					
PRRS S1 4 F	ATGACGTATAGGTGTTGGCTC	20	3625	2min15	65
PRRS S1 R	ACTCCCGCGCGATATCAGGG	21			
<b>F2</b>					
PRRS S2 F	AAATGGGAGACGCTAACGAAC	21	3770	2min15	58
PRRS S2 R	GCTAATATGGACCTCTTCAT	20			
<b>F3</b>					
PRRS S3 F	GTACCAGAAATTTGGGACA	20	4700	2min15	58
PRRS S3 R	AAATGAAACCTCATGTTGGT	20			
<b>F4</b>					
PRRS S4 F	GTGAGGACTGGGAGGATTAC	20	3472	2min15	61
PRRSV_R_Poly_A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT AATTACGGCCGCGTGGTTCT	20			

**Tableau VII :** Position et séquence des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification du génome de TBEV Hypr dans le surnageant cellulaire.

Amorces				TE	Tm
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorces (pb)	Taille fragments (pb)		
<b>F1</b>					
F1 Hypr F	GTTTGCTTCGGACAGCATTAG	21	2930	2min30	62
F1 Hypr R	GTTGGTTCCTGTCTGAAATCC	21			
<b>F2</b>					
F2 Hypr F	AGTGTCCCCTGGAGAGACG	19	2605	2min30	62
F2 Hypr R	AACCCGTCACGCCACTCTC	19			
<b>F3</b>					
F3 Hypr F	CTTGATGACAGCGACACCTC	20	2590	2min30	62
F3 Hypr R	GCAGTGCTTCTATCACTTCTG	21			
<b>F4</b>					
F4 Hypr F	GCTCATGGAGCAATGGAAAAAC	22	2690	2min30	62
F4 Hypr R	GGTGTTTTTCCGAGTCACACA	21			

**Tableau VIII :** Position et séquence des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification du génome du SARS-CoV-2 dans le surnageant cellulaire.

Amorces				TE	Tm
Nom	Séquence 5'-3'	Taille Amorce (pb)	Taille fragments (pb)		
<b>F1</b>					
NCoV F-1	ATTAAAGGTTTATACCTTCCCAGG	22	3042	2min	55
NCoV_R-1 Mut	GGGTAAAAAGAACAATACATATGTG	25			
<b>F2</b>					
NCoV FII F-1	GCATTGATTTAGATGAGTGGAGTATG	26	4279	3min	58
NCoV FII R-1	GCAGTTAAATCCCATTAAAAGATG	25			
<b>F3</b>					
NCoV_FIII_F-1	GTGGTTTAGATTCTTTAGACACC	23	4254	3min	58
NCoV_FIII_R-1	GTGTCCACACTCTCCTAGCACC	22			
<b>F4</b>					
NCoV_FIV_F-2	GTGTTATGTATGCATCAGCTG	21	3876	2min30	61
NCoV_FIV_R-1	GTGGCGGCTATTGATTCAAT	21			
<b>F5</b>					
NCoV FV F-1	AGTACTATGACCAATAGACAGTTTC	25	4212	3min	60
NCoV FV R-1	ACTTTTATCAAAAAGCTGGTGTGTGG	25			
<b>F6</b>					
NCoV_FVI_F-1	GCTATCTAACCTTAACTTGCC	21	3874	2min30	57
NCoV_FVI_R-1	GCTGGTGCATGTAGAAGTTC	20			
<b>F7</b>					
NCoV_FVII_F-1	GCACACCTTGTAATGGTGTG	21	3644	2min15	60
NCoV_FVII_R-1	GCAAATTGTAGAAGACAAATCC	22			
<b>F8</b>					
NCoV_FVIII F-1	GCAGATTCCAACGGTACTATTACC	24	3345	2min	60
NCoV_FVIII R-1	GTCATTCTCCTAAGAAGCTATAAAAT	26			

## I. Analyse statistique

La corrélation entre la fluorescence et les titres d'anticorps neutralisants (nAbs) a été déterminée à l'aide d'un modèle de régression non linéaire dans le logiciel Prism 7 (GraphPad). Le coefficient de corrélation de Pearson ( $R^2$ ) et la valeur P ont été calculés en utilisant les paramètres par défaut du logiciel Prism 7.00. L'analyse statistique et la représentation graphique ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 7.00. Les valeurs  $P \leq 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

# Résultats

## A. FeCoV et SARS-CoV-2 (Mélade, Piorkowski, Touret, et al. 2021)

### 1. Principes généraux

Afin de générer des Coronavirus en utilisant la méthode ISA, nous avons conçu 8 fragments d'ADN chevauchant couvrant l'intégralité du génome du virus ciblé. Ces fragments, d'environ 4kb, ont par la suite été amplifiés puis transfectés sur une coculture de cellule BHK-21 et Vero-E6 ou FeA pour le SARS-CoV-2 et le FeCoV respectivement. Les passages ont été réalisés sur Vero-E6- ou FeA seulement. En apportant des modifications ciblées dans la séquence de certains de ces fragments, nous avons rapidement pu générer des souches virales modifiées.

### I. Génération FeCoV

Initialement, nous avons souhaité évaluer la robustesse de la méthode ISA avec un pathogène animal strict possédant un grand génome, le FeCoV. En effet, nous voulions nous confronter et nous familiariser avec les particularités de virus possédant un si grand génome. Ces premières expérimentations nous ont permis de décider du nombre de fragments appropriés pour couvrir l'intégralité du génome, mais également où placer stratégiquement les modifications génomiques souhaitées. Une fois la partie construction *in silico* réalisée, nous avons pu appliquer la méthode ISA. Il a toutefois fallu l'optimiser afin de réussir à obtenir des « succès » de transfection. Pour cela, nous avons étudié et amélioré le mode de production des fragments d'ADNc transfectés, la purification de ceux-ci, mais également les cellules utilisées (leur confluence et leur ratio optimum dans les coculture) et pour finir les différents temps d'incubations entre transfection et passage ou passage et passage. Tout cela nous a permis de maîtriser les paramètres impliqués dans la génération d'un coronavirus par ISA. Ceci nous a permis par la suite de pouvoir l'appliquer rapidement à un pathogène humain de la même famille le SARS-CoV-2, lors de son émergence. A la suite de toutes ces étapes de mise au point, nous avons réussi à générer un FeCoV « sauvage » ISA (Figure 21). Nous avons pu observer des ECP 48 h après l'infection du premier passage post-transfection.

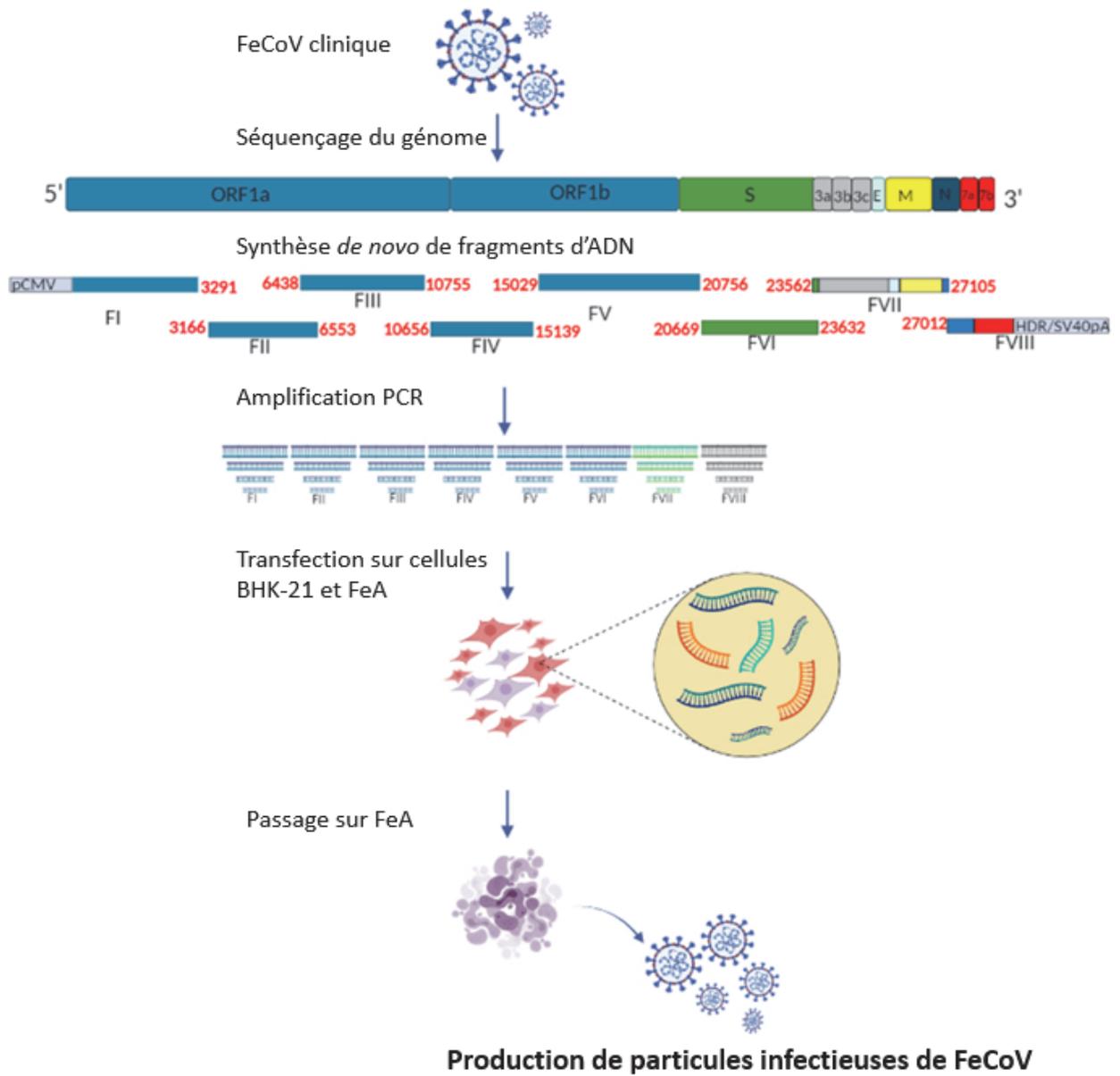


Figure 21 : Méthode ISA pour générer le FeCoV.

## II. Génération de SARS-CoV-2

Une fois la souche « sauvage » de FeCoV ISA obtenu et les paramètres de transfection fixés, nous avons pu appliquer la méthode pour générer des souches de SARS-CoV-2. Une souche « sauvage » européenne, une souche « Wuhan D614 » avec une mutation sur la protéine Spike et une souche « mCherry » fluorescente (Figure 22).

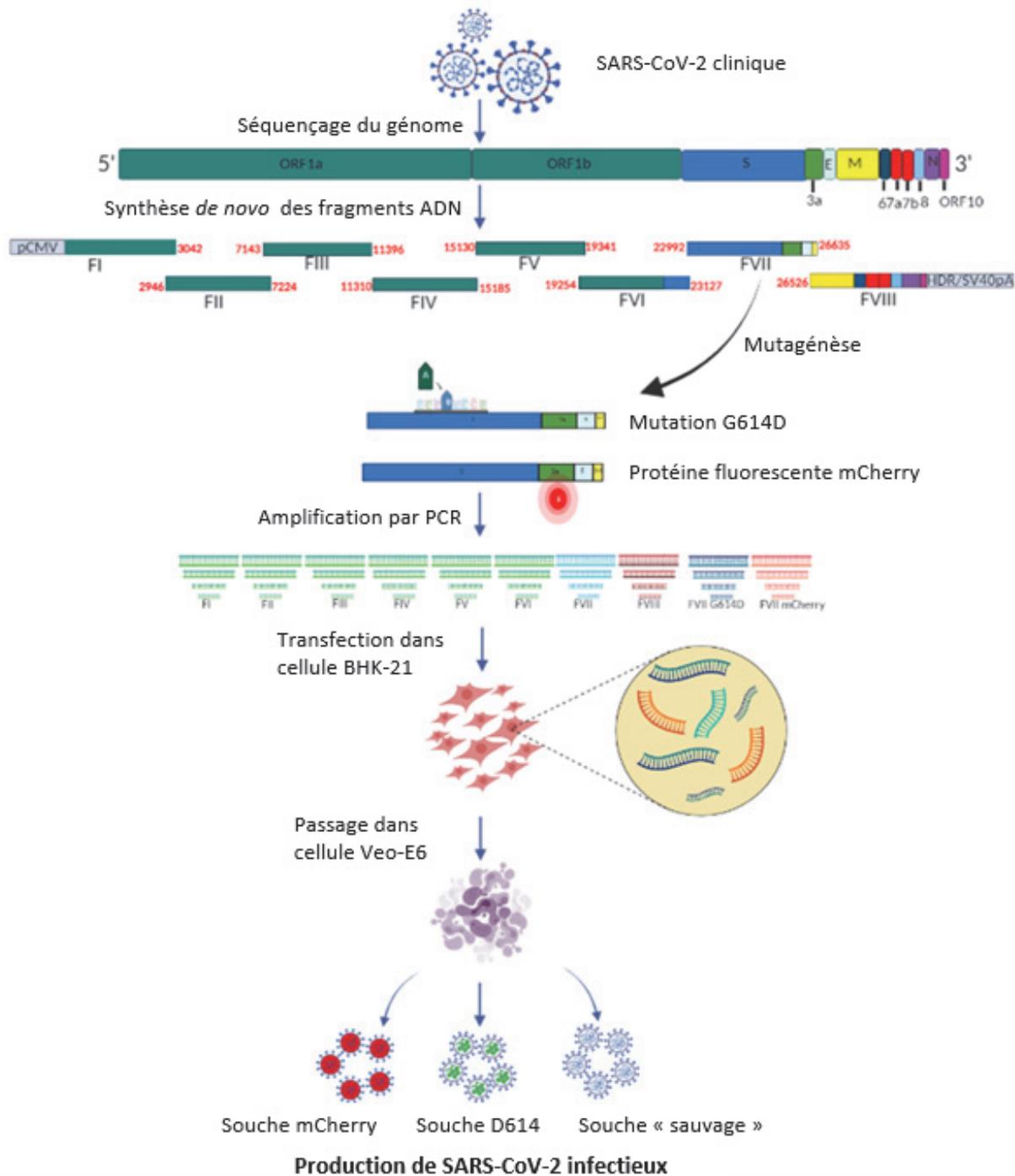


Figure 22 : Méthode ISA utilisée pour obtenir les SARS-CoV-2 recombinants.

#### a. Génération SARS-CoV-2 ISA européen

Nous avons dans un premier temps obtenu une souche clinique de SARS-CoV-2 européen (Lignage B.1 Spike D614G) que nous avons remis en culture, caractérisée puis séquencée. Cette souche et ses caractéristiques biologiques serviront de référence pour le reste de l'étude. Nous avons donc conçu puis fait synthétisé *de novo* des fragments d'ADN recouvrant la totalité du génome de cette souche afin de l'obtenir par génétique inverse avec la méthode ISA. Au premier passage post-transfection, nous avons observé des ECP dans les puits 48 h après l'infection. Confirmant ainsi que nous avons bien généré une souche avec la méthode ISA et qu'elle semblait se comporter de la même manière, *in vitro*, que la souche clinique avec la présence d'ECP 48 h post-infection.

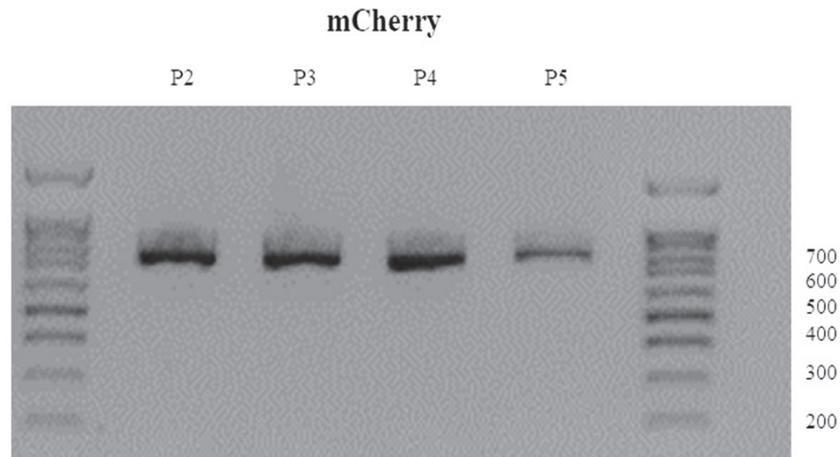
#### b. Génération de la souche D614 SARS-CoV-2

Au moment où nous avons généré la souche européenne par ISA de SARS-CoV-2, un certains nombres de publications ont montré que notre souche possédait une mutation dans la Spike modifiant les propriétés biologiques virales (Hou et al. 2020; Plante et al. 2021). Nous avons donc voulu tester notre méthode pour voir si nous étions capables de générer la souche originale Wuhan D614. Pour ce faire, nous avons remplacé la Glycine par un Acide aspartique en position 614 de la séquence originale de la protéine Spike (Fragment 7) et avons effectué la méthode ISA en utilisant ce fragment d'ADN modifié synthétisé *de novo*. Nous avons réussi à récupérer des particules infectieuses de la souche SARS-CoV-2 ISA D614 cinq jours après la transfection sur des cellules BHK-21 et deux passages sur cellules VeroE6. La réplication virale a été confirmée par la présence d'ECP.

#### c. Génération d'un SARS-CoV-2 fluorescent

Par la suite, nous avons voulu générer une souche SARS-CoV-2 D614 possédant une protéine fluorescente rouge (mCherry). Pour cela, nous avons supprimé la région 3a, qui avait été précédemment décrite comme non-essentiel à la réplication *in vitro* et en modèle murin (Yount et al. 2005), et l'avons remplacé par la séquence de la protéine mCherry (position 25 392–26 221) en aval de la séquence régulatrice de l'ORF3a. Nous avons donc appliqué la méthode ISA et avons observé des ECP 48h après l'infection du premier passage post-transfection. Une

fois la souche SARS-CoV-2 mCherry obtenue nous avons réalisé 5 passages sur cellule Vero-E6 afin d'évaluer la stabilité de la construction, c'est-à-dire la présence du gène rapporteur fluorescent mCherry après de multiples passages. Nous l'avons confirmé par électrophorèse sur gel des produits de RT-PCR (Figure 23) et séquençage NGS, et nous n'avons observé aucune mutation ou délétion par rapport au fragment synthétisé.



**Figure 23** : Image de l'électrophorèse sur gel du gène rapporteur mCherry de la souche ISA D614 mCherry SARS-CoV-2.

## 2. TCID<sub>50</sub>

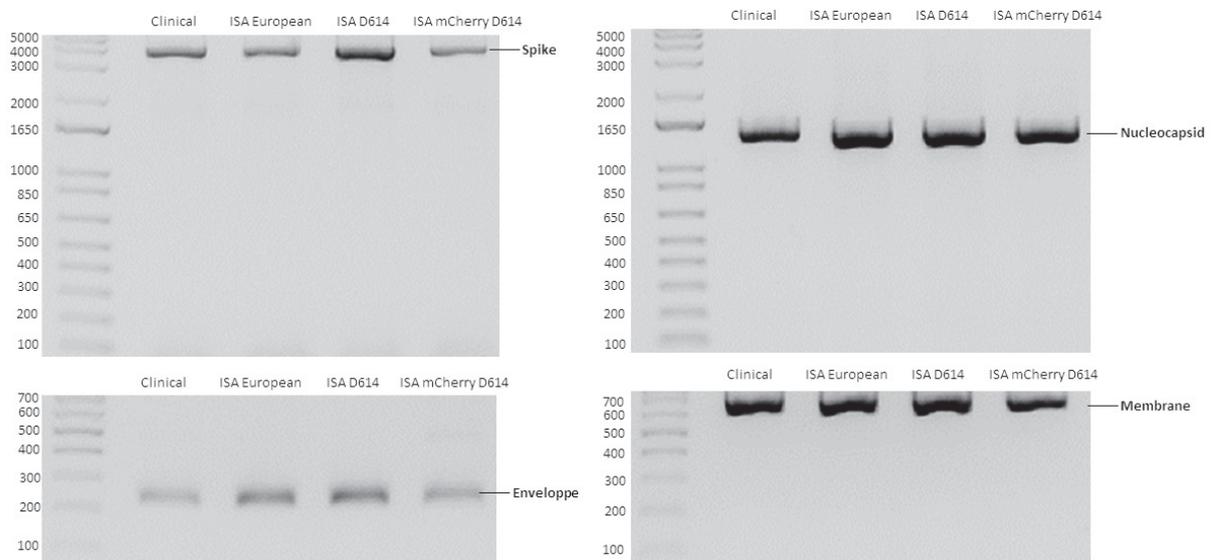
Une fois toutes les souches ISA générées, nous sommes passés à leurs caractérisations biologiques. Nous avons donc évalué, 48 h après infection, le titre infectieux, la quantité d'ARN et avons procédé à une observation au microscope pour la présence d'ECP. Nous avons réuni les résultats et ainsi que les différents paramètres de l'expérimentation dans le tableau IX. A savoir les lignées cellulaires utilisées pour les souches cliniques et ISA de SARS-CoV-2 et FeCoV, la présence ou l'absence d'effet cytopathique (ECP), la quantification de l'ARN du virus obtenue par RT-qPCR en temps réel et les titres infectieux dans le surnageant cellulaire (TCID<sub>50</sub>) après deux passages. Chaque expérience a été réalisée en triple (N = 3). Tous les virus ont montré des ECP 48 h après l'infection. Dans cette expérience et dans ces conditions, les souches obtenues en ISA ont montré des titres et quantité d'ARN viraux plus faible que les souches cliniques.

**Tableau IX :** Caractérisation *in vitro* des SARS-CoV-2 et FeCoV recombinants. Le titre infectieux de TCID50 a été exprimé en log10 TCID50/ml et la quantité de copies d'ARN a été exprimée en log10 copies/ml.

	Lignée cellulaire		ECP	Quantité d'ARN viral	Titres infectieux	
	Transfection	Passage				
<b>SARS-CoV-2</b>	Clinique "Européen"	-	VeroE6	Yes	7.1 +/- 0.2	7.6 +/- 0.1
	ISA "Européen"	BHK-21 + VeroE6	VeroE6	Yes	5.5 +/- 0.4	5.5 +/- 0.4
	ISA D614	BHK-21 + VeroE6	VeroE6	Yes	6.8 +/- 0.5	6.0 +/- 0.2
	ISA D614 mCherry	BHK-21 + VeroE6	VeroE6	Yes	5.6 +/- 0.2	5.8 +/- 0.4
<b>FeCoV</b>	Clinique	-	FeA	Yes	7.6 +/- 0.2	7.2 +/- 0.2
	ISA	BHK-21 + FeA	FeA	Yes	6.7 +/- 0.5	5.8 +/- 0.6

### 3. Séquençage

Nous avons ensuite réalisé une électrophorèse sur gel de l'amplification des gènes codant pour les protéines de la Spike, la nucléocapside, la membranaire et de l'enveloppe de l'ensemble des souches de SARS-CoV-2. Aucune différence n'a été relevée (Figure 24).



**Figure 24 :** Image de l'électrophorèse sur gel des gènes codants pour les protéines S, N, M, E des souches de SARS-CoV-2.

Le séquençage complet du génome de l'ensemble des souches a été réalisé. Il a indiqué :

- Pour la souche FeCoV ISA, après deux passages sur cellules FeA, nous n'avons détecté aucune mutation.
- Pour les souches de SARS-CoV-2 après deux passages dans des cellules VeroE6 :
  - Pour la souche ISA « européen » : une seule mutation majoritaire synonyme (position 18 538, C → A) et une mutation minoritaire non synonyme (position 27 444, C → T, fréquence : 10 %)
  - Pour la souche ISA D614 : aucune mutation majoritaire dans la séquence consensus et trois mutations minoritaires (position 14 290, C → T, fréquence : 8 % ; position 16 110, A → C, fréquence : 17 % ; position 28 663, C → T, fréquence : 5 %)
  - Pour la souche « mCherry » : une mutation majoritaire synonyme (position 1 871, A → G) et une mutation minoritaire silencieuse (position 283, G → T, fréquence : 10 %) et une minoritaire non silencieuse (position 7 789, C → T, fréquence : 11 %)

#### 4. Cinétique de répllication

Pour réaliser la cinétique de répllication, nous avons infecté des cellules FeA ou Vero-E6, à une MOI de 0.01 ou de 0.001 pour le FeCoV et le SARS-CoV-2 respectivement. Ensuite, nous avons récolté toutes les 12 h après l'infection le surnageants des cellules afin de déterminer la charge d'ARN viral et le titre infectieux. Concernant les souches FeCoV, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la souche clinique et la souche ISA. Le même résultat a été observé après la comparaison entre les souches de SARS-CoV-2 « européen » clinique et ISA et entre les souches SARS-CoV-2 D614 et D614 mCherry. Pour ce qui est de la souche SARS-CoV-2 D614 et la souche « européenne » ISA, nous avons constaté des différences significatives dans les 3 premières collectes de surnageants. En particulier à 12 h et 24 h pi. Néanmoins, au point final de la collecte, aucune différence significative n'a été observé pour l'ensemble des souches. Chacune de ces expériences a été réalisée en triplicat et les résultats sont présentés dans la figure 25.

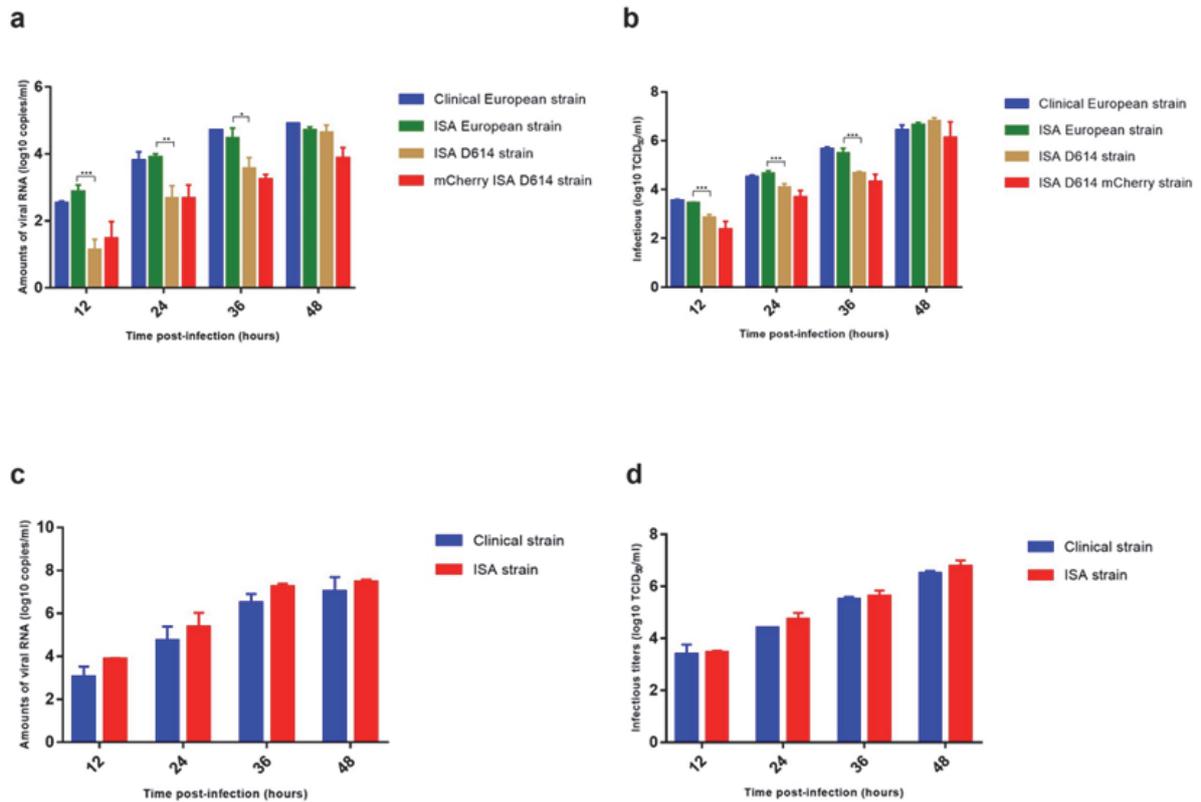


Figure 25 : Cinétique de réplication virale des souches clinique et ISA.

Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SD (indiquée par les barres d'erreur). (N = 3). Des analyses statistiques ont été effectuées avec une ANOVA à deux voies pour les comparaisons multiples avec le test de Sidak. Des comparaisons statistiques ont été effectuées entre les souches cliniques européennes du SARS-CoV-2 et les souches européennes ISA, les souches européennes ISA et ISA D614, les souches ISA D614 et mCherry D614, et entre les souches cliniques FeCoV et ISA. Les valeurs  $P > 0,05$  sont considérées comme non significatives et ne sont pas affichées sur le graphique. Les symboles \*\*\*, \*\* et \* indiquent que les titres infectieux et la charge virale de la souche ISA D614 est significativement différente de celle de la souche européenne ISA avec des valeurs  $P < 0,0001$ ,  $< 0,001$  et  $\leq 0,05$ , respectivement.

## 5. Tests de neutralisation et antiviraux utilisant le SARS-CoV-2 D614 mCherry

Nous avons développé un test de séroneutralisation basé sur la lecture de la fluorescence de la souche SARS-CoV-2 D614 mCherry comme marqueur de la réplication virale. Pour le valider nous l'avons comparé à la procédure de référence qui a aussi été développée au laboratoire et basée sur la lecture des ECP au microscope (Gallian et al. 2020). Afin de vérifier que la fluorescence correspondait à la présence d'ECP nous avons infecté, avec une MOI de 0.05, des cellules VeroE6 soit avec la souche SARS-CoV-2 D614 ISA soit avec la souche D614 ISA mCherry et les avons comparés à un témoin négatif. Nous avons observé de la fluorescence

correspondant au mCherry, ainsi qu'un effet cytopathique dans les puits infectés par la D614 ISA mCherry. Les puits infectés avec la souche D614 ISA ne montrent pas de fluorescence, mais des ECP alors que les puits négatifs ne montrent aucun des deux (Figure 26).

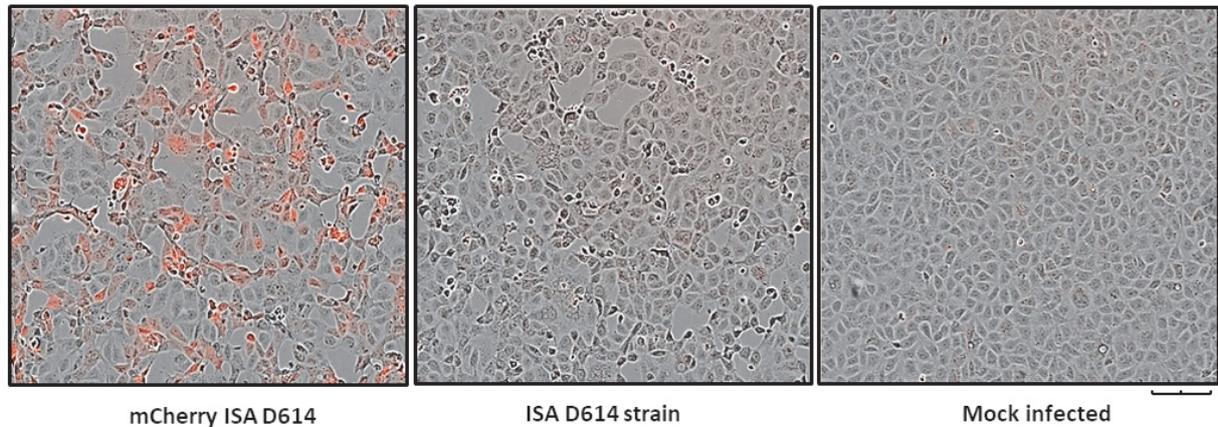


Figure 26 : Analyse par microscopie à fluorescence des souches ISA D614 et ISA D614 m Cherry de SARS-CoV-2. Barre d'échelle 200µm.

Pour réaliser ce test de neutralisation, nous avons utilisé 23 sérums humains qui avaient été collectés durant la pandémie de la COVID-19. Ces sérums ont ensuite été dilués au 1/2 cinq fois de suite et incubés, avant infection, soit avec la souche ISA D614 soit avec ISA D614 mCherry. 5 jours après l'infection, les titres d'anticorps neutralisant (nAb) ont été évalués. Les titres de nAb correspondent à la dilution la plus élevée inhibant la production d'ECP distinct avec la souche ISA D614 ou la fluorescence avec la souche D614 mCherry. Nous avons observé un comportement similaire des sérums entre la procédure standard basée sur la présence d'ECP et les tests basés sur la fluorescence. En effet, les 18 sérums présentant une neutralisation, ne montraient aucun ECP en lecture standard et aucune fluorescence contrairement aux 5 sérums négatifs présentant soit des ECP soit de la fluorescence selon la souche. De plus, nous avons également observé une corrélation significative entre les deux méthodes avec les titres de séroneutralisation obtenus sur toute la gamme de dilutions ( $P < 0,0001$ ) ainsi qu'un coefficient de Pearson proche de 1 ( $R^2 = 0,8894$ ). Nous avons noté une augmentation de la fluorescence inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps démontrant que notre souche ISA D614 mCherry de SARS-CoV-2 était utilisable pour ce genre de test (Figure 27).

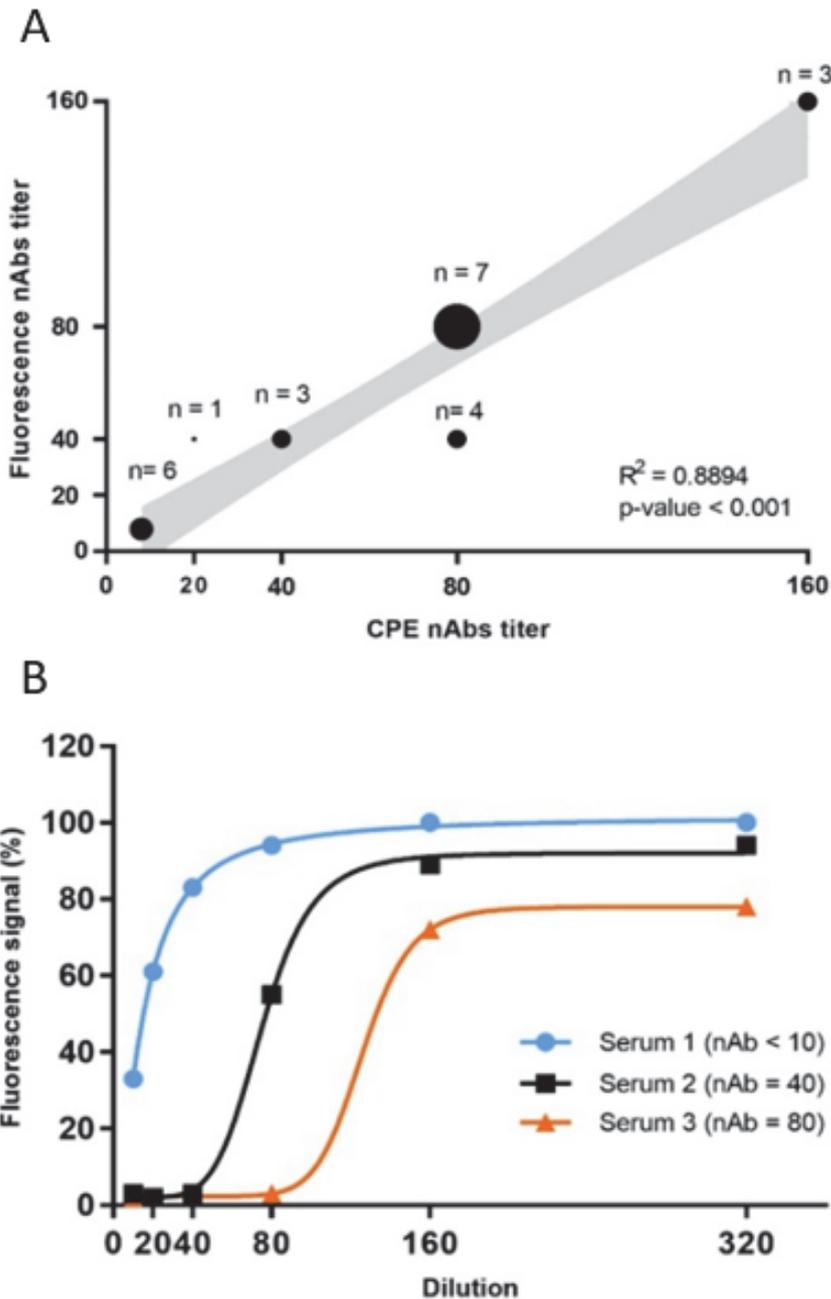


Figure 27 : Corrélation entre les titres d'anticorps neutralisants (nAb) réalisés avec les souches ISA D614 et D614 mCherry du SARS-CoV-2

A - Chaque point noir représente les résultats d'un nombre donné de sérums. Les analyses statistiques ont été réalisées par régression linéaire uni-variée. La bande d'erreurs (en gris) représente l'intervalle de confiance à 95 % de la droite de régression. B - Courbes de neutralisation représentatives du test basé sur la fluorescence en fonction de la dilution des nAbs. La courbe dose-réponse générée à l'aide d'une méthode de régression non linéaire à quatre paramètres et les atn ont été calculés dans le logiciel Prism 7.0. Pour les échantillons de sérum négatifs, une valeur arbitraire de 10 a été attribuée (seuil de détection pour les deux méthodes).

Par la suite, nous avons évalué la souche SARS-CoV-2 D614 mCherry pour réaliser un test antiviral basé sur un principe similaire que le précédent. Le composé Remdesivir étant largement décrit dans la littérature pour inhiber la réplication virale *in vitro* du SARS-CoV-2 (Touret et al. 2020; M. Wang et al. 2020) nous avons décidé de l'utiliser comme référence pour notre preuve de concept. Pour déterminer la concentration efficace à 50% (EC50) nous avons mesuré la fluorescence ou l'ARN viral dans des cellules VeroE6, en présence de concentrations décroissantes de Remdesivir. A partir de ces relevés, nous avons calculé des pourcentages d'inhibition par rapport au virus seul et construit la courbe de dose-réponse (Figure 28).

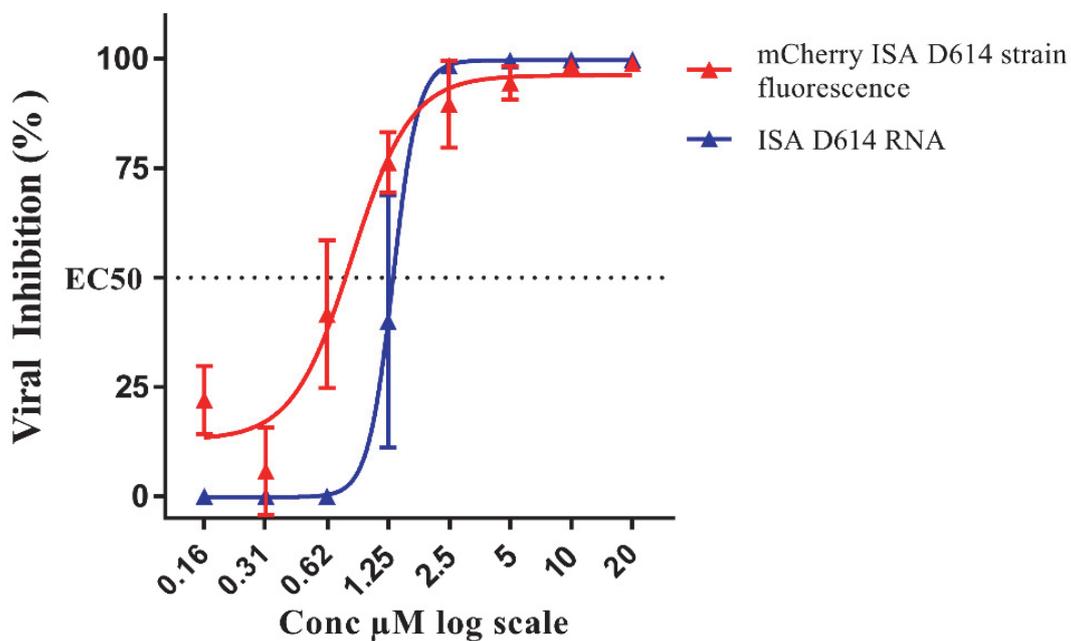


Figure 28 : Activité antivirale du remdesivir sur le SARS-CoV-2 dans les cellules VeroE6.

Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SD (indiquée par les barres d'erreur). (N=3)

Nous avons ensuite comparé l'EC50 aux valeurs obtenues par les souches ISA testées selon une procédure standard reposant sur la quantification de la charge d'ARN virale dans le surnageant. Les EC50 que nous avons obtenus sont très similaires entre les souches D614 et D614 mCherry. Nous avons obtenu un EC50 de  $0,74 \pm 0,05 \mu\text{M}$  pour la souche ISA D614 mCherry et un EC50 de  $1 \pm 0,31 \mu\text{M}$  pour la souche ISA D614. Ces valeurs sont également parfaitement cohérentes avec celles de la littérature. De plus, les valeurs sont parfaitement cohérentes avec les observations de la fluorescence au microscope, à savoir une diminution voire une absence de fluorescence aux doses de remdesivir supérieur à l'EC50 estimée (Figure 29). Notre méthode de mesure de la fluorescence comme marqueur de l'inhibition virale en présence de remdesivir semble donc pertinente.

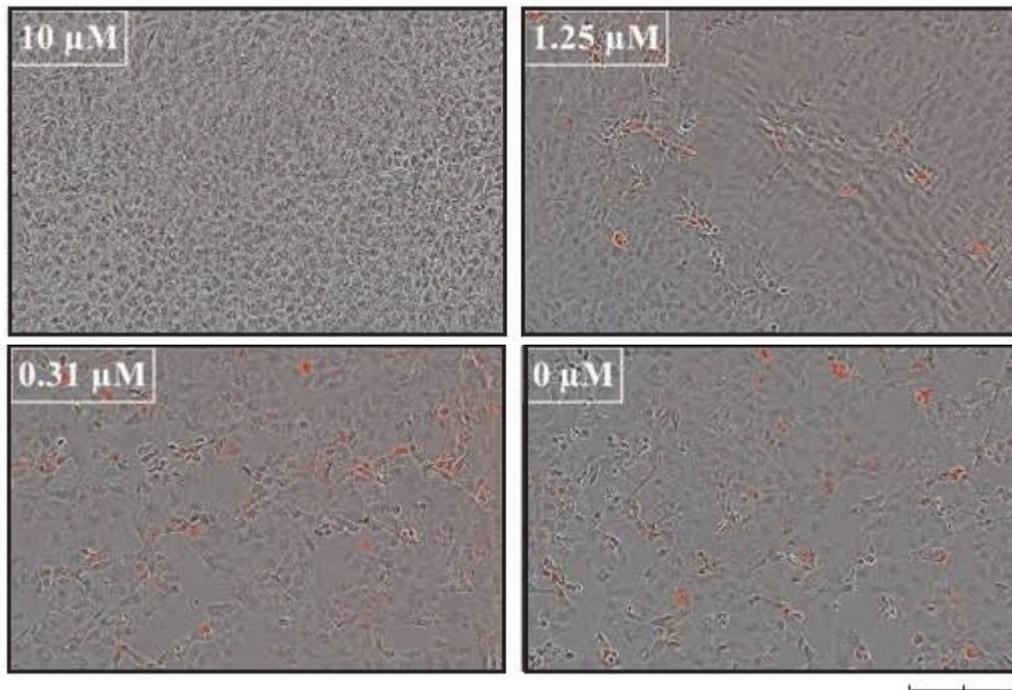


Figure 29 : Fluorescence du SARS-CoV-2 mCherry dans des cellules VeroE6 avec différentes concentrations de Remdesivir. Barre d'échelle, 200  $\mu\text{m}$ .

## 6. Discussion

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence que la méthode de génétique inverse ISA pouvait être un outil précieux pour déchiffrer et analyser les propriétés biologiques de virus de grandes tailles, tels que les coronavirus animaux ou humains. Mais aussi, de définir les mécanismes qui sont à la base d'émergence virale, d'adaptation à l'hôte ou encore permettre le développement de stratégies thérapeutiques. L'étude et le développement de techniques de production de clones infectieux de Coronavirus remontent à avant l'émergence du SARS-CoV-2 (Yount et al. 2003; Curtis et al. 2004; Rockx et al. 2007; Donaldson et al. 2008; Scobey et al. 2013). C'est pourquoi il a été rapide de les appliquer avec succès à ce pathogène. (Thi Nhu Thao et al. 2020; X. Xie, Muruato, Lokugamage, et al. 2020; Rihn et al. 2021). Toutefois, pour ces techniques, il est nécessaire de cloner le génome viral complet dans un plasmide bactérien. Cette étape est supprimée dans la méthode ISA puisque la recombinaison de l'ADNc et sa transcription se déroule directement au sein de la cellule. De plus, cette méthode ne nécessite pas de modifier le génome par l'ajout d'un site de restriction. Ainsi, aucun site de restriction ou autre modification génomique n'est nécessaire. Cette méthode a initialement été développée et est habituellement utilisée pour générer des virus à ARN de polarité positif de petite taille (<15 kb) tels que des Alphavirus, Entérovirus ou encore des Flavivirus (Aubry, Nougairède, Gould,

et al. 2015; Atieh et al. 2017). Dans ce cas, le nombre de fragments d'ADNsg nécessaire pour recouvrir l'intégralité du génome se limite à trois. Nonobstant, pour les Coronavirus, il a été nécessaire d'utiliser huit fragments ADNsg se chevauchant pour obtenir des virus « sauvages » ou mutés.

Il est bon de souligner, qu'à notre connaissance, que l'évaluation de la recombinaison *in cellulo* d'autant de fragments n'avait pas été réalisé et que la génération de virus de cette taille par une méthode comme ISA n'avait jamais été réalisée. Un de nos objectifs était donc de déterminer si le nombre de fragments transfectés et la taille du génome étaient des paramètres limitants de la méthode ISA ou s'il était possible d'obtenir un virus avec un si grand nombre de fragments. Les principales contraintes de la recombinaison d'ADNc viral de génome entier sont à la fois que tous les fragments recouvrant ce génome doivent pénétrer au sein de la même cellule ; mais aussi qu'une fois à l'intérieur, ils se recombinent ensemble et dans le bon sens. Evidemment, il faut prendre en compte que la probabilité qu'une seule cellule reçoive en même temps tous les fragments lors de la transfection, diminue lorsque leur nombre augmente. Pour prendre en compte ce facteur stochastique lors de la production virale avec la méthode ISA, l'utilisation de plaque de culture cellulaire de 96 puits peut permettre d'augmenter les « succès » de transfection ou d'infection tout en économisant la quantité nécessaire d'ADNc de chaque fragment (env. 30 ng de chacun). En effet plus on transfecte un nombre de puits élevé plus la chance d'avoir un puits où toutes les conditions sont réunies augmente. Plusieurs études ont établi qu'après un certain nombre de passages en cellules n'exprimant pas TMPRSS2 des délétions étaient possibles dans la séquence de la protéine Spike, en particulier dans le site de clivage de la furine, du SARS-CoV-2 (Liu et al. 2020). C'est pourquoi nous avons voulu évaluer la conservation de nos constructions génomiques, en procédant à trois passages supplémentaires sur des cellules VeroE6. Cette évaluation a montré une structure génomique conservée pour chacune des souches. Des travaux récents ont montré que l'utilisation de VeroE6-TMPRSS2 ou Calu-3 permettait d'éviter ces possibles délétions dans le site furine de la Spike (Hoffmann et al. 2020; Matsuyama et al. 2020).

La mutagenèse dans un site particulier du génome peut être réalisée sur seulement un fragment d'un système de génétique inverse déjà existant. Ce fragment modifié peut alors être directement utilisé dans la méthode ISA en remplaçant l'ancien fragment dans le système déjà fonctionnel et optimisé. Cela permet l'exploitation rapide de ce « nouveau » système pour comprendre les processus impliqués dans la transmission, la pathogenèse, l'évolution ou encore les interactions entre les virus et leurs hôtes (J.-M. Wang, Wang, et Shi 2008; Korber et al.

2020). Pour la preuve de concept, nous avons généré une souche de SARS-CoV-2 ISA D614 possédant une mutation sur sa protéine Spike, à partir d'un système existant, mais en concevant et mutant un seul fragment. Cependant, nous avons observé que la cinétique de répllication de la souche ISA D614 était plus lente que la souche clinique G614 (« européen »). Cette différence n'est pas surprenant et pouvait être attendue car elle a été décrite dans une publication récente (Plante et al. 2021).

L'intérêt de l'utilisation de virus fluorescent, dans des tests de neutralisation ou d'antiviraux, a largement été validé puisque la présence de la séquence rapportrice fluorescente permet une analyse directe de la répllication virale. (Hou et al. 2020; X. Xie, Muruato, Zhang, et al. 2020). En effet, ces virus fluorescents sont des outils de valeur pour pouvoir caractériser des molécules antivirales de petites tailles puisqu'ils permettent d'analyser directement les résultats sans nécessité la quantification du matériel génétique ou infectieux. Dans nos travaux, nous avons inséré une séquence exogène codant pour la protéine mCherry à la place de l'ORF3a. Le virus généré était répllicatif et stable avec une fluorescence détectable deux jours après l'infection. De plus, la séquence rapportrice est restée stable pendant 5 passages dans des cellules VeroE6 comme cela avait déjà été démontré (Rihn et al. 2021). C'est pourquoi nous pouvons affirmer qu'un tel virus fluorescent permettrait de faciliter et de simplifier les tests de neutralisation ou de criblage de molécules antivirales *in vitro* à haut débit. Nous avons prouvé que les tests de neutralisation réalisés *in vitro* avec la souche de SARS-CoV-2 ISA D614 mCherry et des sérums contenant ou non des anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2 ; ou avec le composé antiviral Remdesivir, montraient des résultats similaires que ceux réalisés avec la souche clinique ou les techniques standards. Nous pouvons donc conclure que ces procédures innovantes offrent des possibilités nouvelles pour développer des plateformes d'étude de séro-épidémiologie robustes à haut débit et faible coût. Tout comme pour les tests de neutralisation, l'application du virus ISA D614 mCherry peut être étendue au criblage et à la détermination d'EC50 de composés antiviraux en toute sécurité. Il faut également noter qu'au vu de la grande capacité d'accumulation de mutations au niveau de la Spike du SARS-CoV-2 il faudra être prudent sur l'utilisation d'un système basé sur des souches ancestrales, le système actuel pourra être utilisé pour cribler des banques de molécules, par exemple, bloquant la synthèse d'ARN viraux comme le remdesivir ou alors pour déterminer des titres d'anticorps neutralisant post-vaccination dans de grandes cohortes.

## B. PRRSV (Mélade, Piorkowski, Bouzidi, et al. 2021)

La stratégie suivante a été appliquée pour la preuve de concept de l'utilisation de la méthode ISA pour la génération de PRRSV (Figure 30).

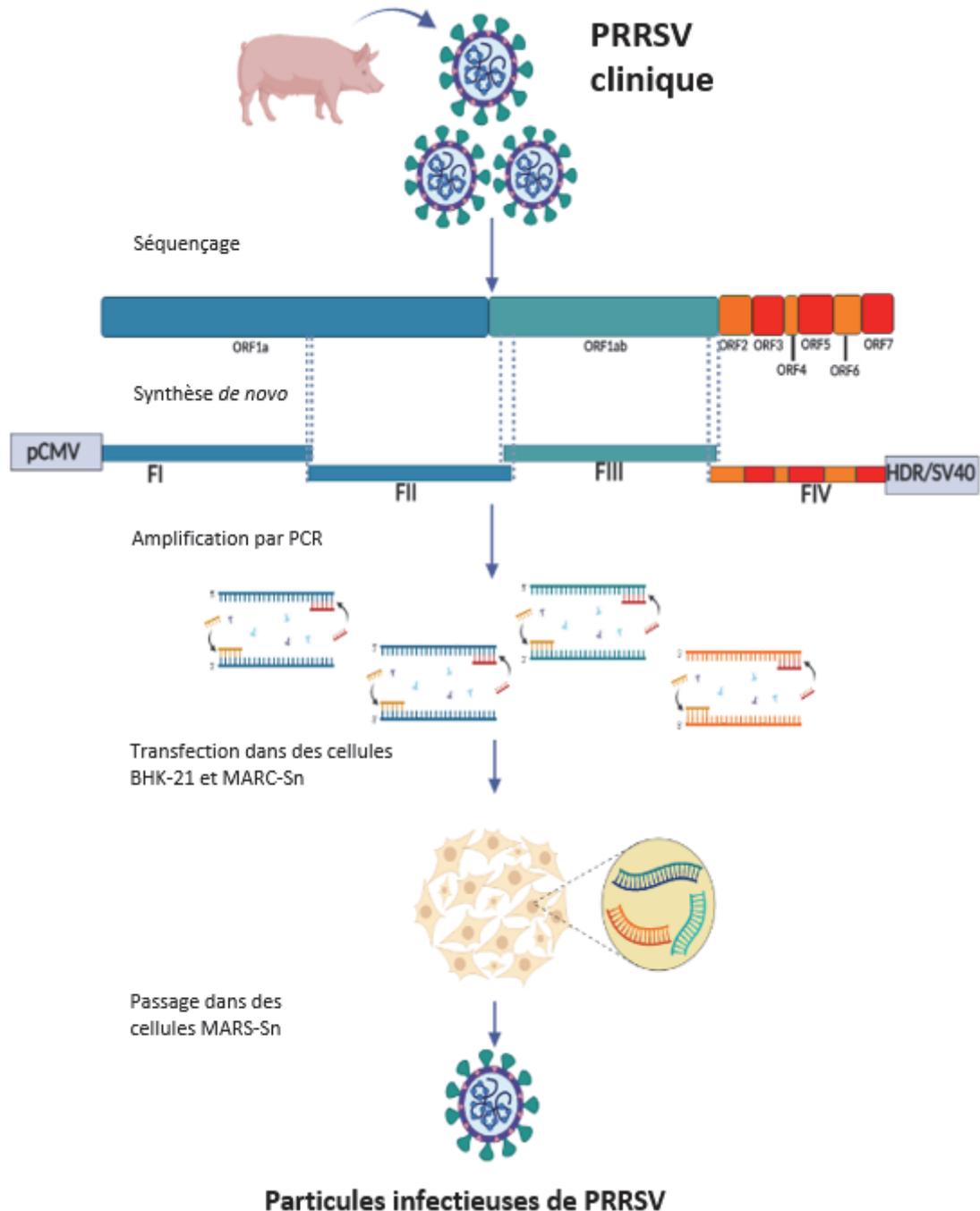
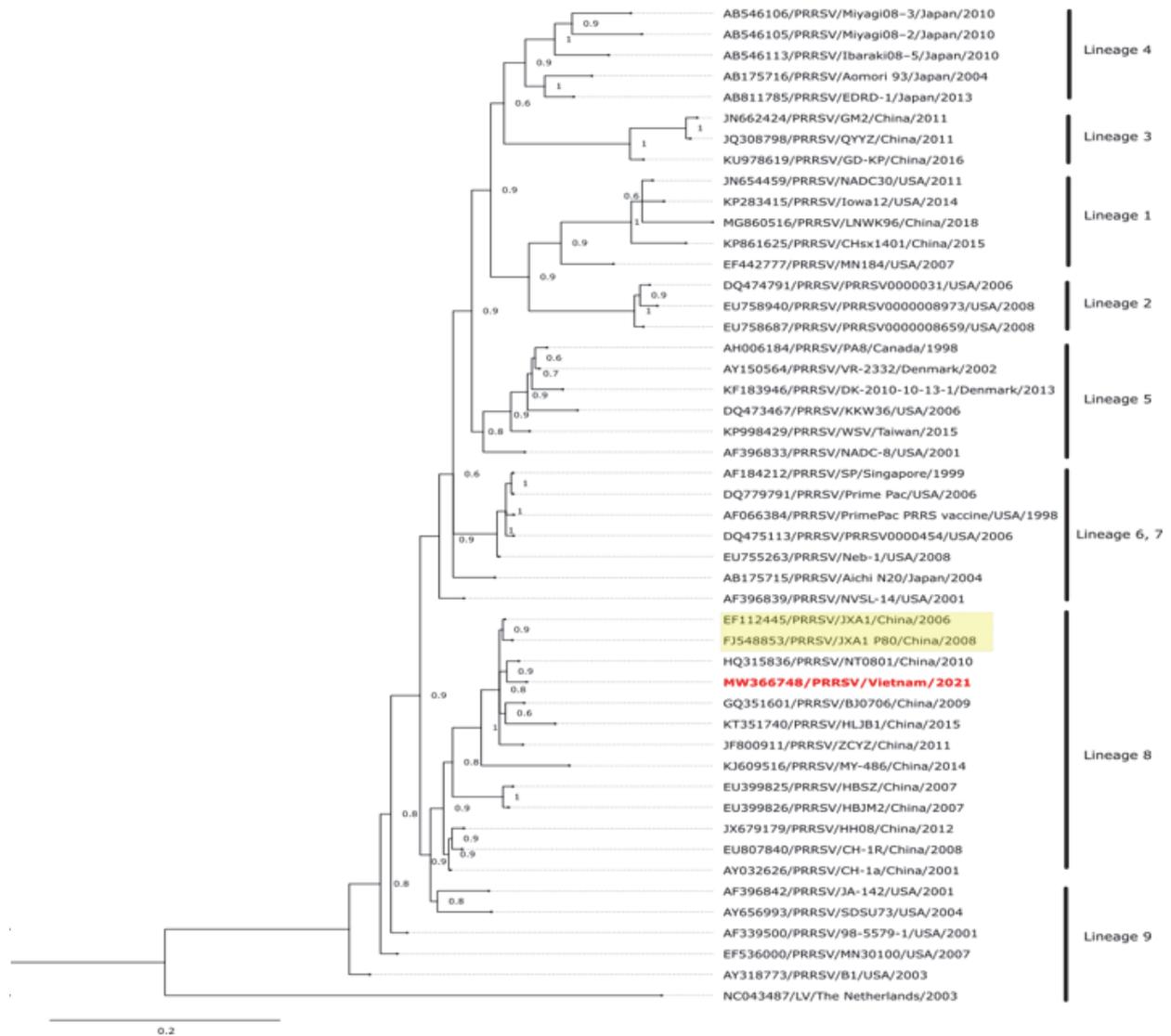


Figure 30 : Méthode ISA utilisée pour générer des virus PRRSV ISA (BioRender.com).

### 1. Alignement et analyse phylogénétique

Tout d'abord, nous avons réalisé les analyses phylogénétiques basées sur l'ORF5 de l'isolat d'origine. Pour cela, nous avons extrait une cinquantaine de séquences de PRRSV de la banque

de données du centre américain pour les informations biotechnologiques (NCBI). Nous avons ensuite effectué un alignement de toutes ces séquences pour effectuer une reconstruction phylogénétique (Figure 31). L'arbre phylogénétique généré a mis en évidence que notre isolat était regroupé dans la lignée 8. C'est dans cette même lignée que se ramifient des souches HP-PRRSV déjà décrites (Figure 31).



**Figure 31** : Arbre phylogénétique basé sur PRRSV ORF5. La séquence de l'isolat d'origine dans cette étude a été marquée en rouge gras. Chaque lignage était indiqué à droite. Les souches HP-PRRSV sont surlignées en jaune.

## 2. Génération du virus

Dans le but d'optimiser la génération du virus et sa réplication dans les cellules MARC-Sn, nous avons décidé de passer notre isolat 5 fois dans ces cellules. Nous avons ensuite comparé la séquence initiale et la séquence au cinquième passage pour voir si nous pouvions observer des mutations d'adaptation virale à cette lignée cellulaire. Nous avons observé un total de six mutations non synonymes et une mutation synonyme située dans les régions codantes ORF1a/1ab, GP3 et GP4 du génome (Tableau X).

**Tableau X :** Séquençage complet de l'isolat original de PRRSV. Caractéristiques des mutations apparues entre le premier et le cinquième passage.

Position sur le génome (nucléotide)	Région	Position sur le génome (Acide aminés)	Changement de nucléotide	Changement d'acide-aminé
3012	ORF1a (nsp2)	941	G → T	M → I
3055	ORF1a (nsp2)	956	A → G	S → G
10,717	ORF1ab (nsp10)	1044	T → G	I → S
12,71	GP3	247	T → C	L → S
13,265	GP3	43	G → A	D → N
13,561	GP4	141	C → T	–
13,783	GP4	33	A → G	N → S

Nous avons donc basé notre système de génétique inverse, composé de 4 fragments d'ADN chevauchants, sur cette séquence au cinquième passage. Après avoir produit ces fragments par PCR, et vérifié leur taille et leur intégrité sur gel (Figure 32) nous les avons transfectés dans une coculture de cellules BHK-21 et MARC-Sn. Dans chacune des transfections, deux contrôles négatifs ont été intégrés, pour le premier, seuls 3 fragments d'ADNc sur 4 ont été transfectés, pour le second, aucun fragment d'ADNc n'a été transfecté. Avant l'interprétation, nous nous sommes assuré que les puits des témoins négatifs ne présentaient aucun ECP.

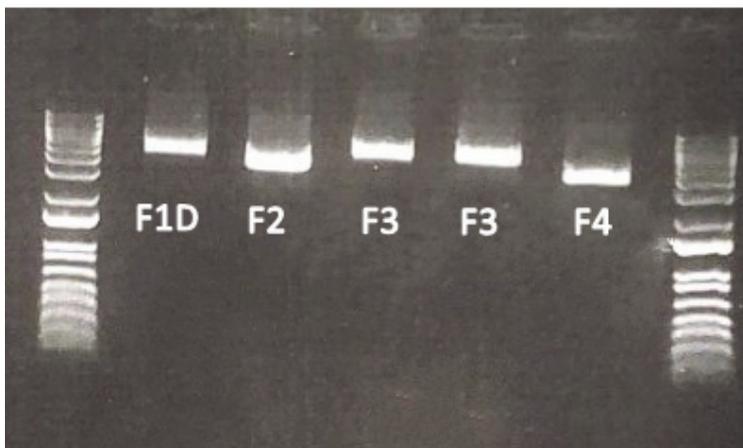
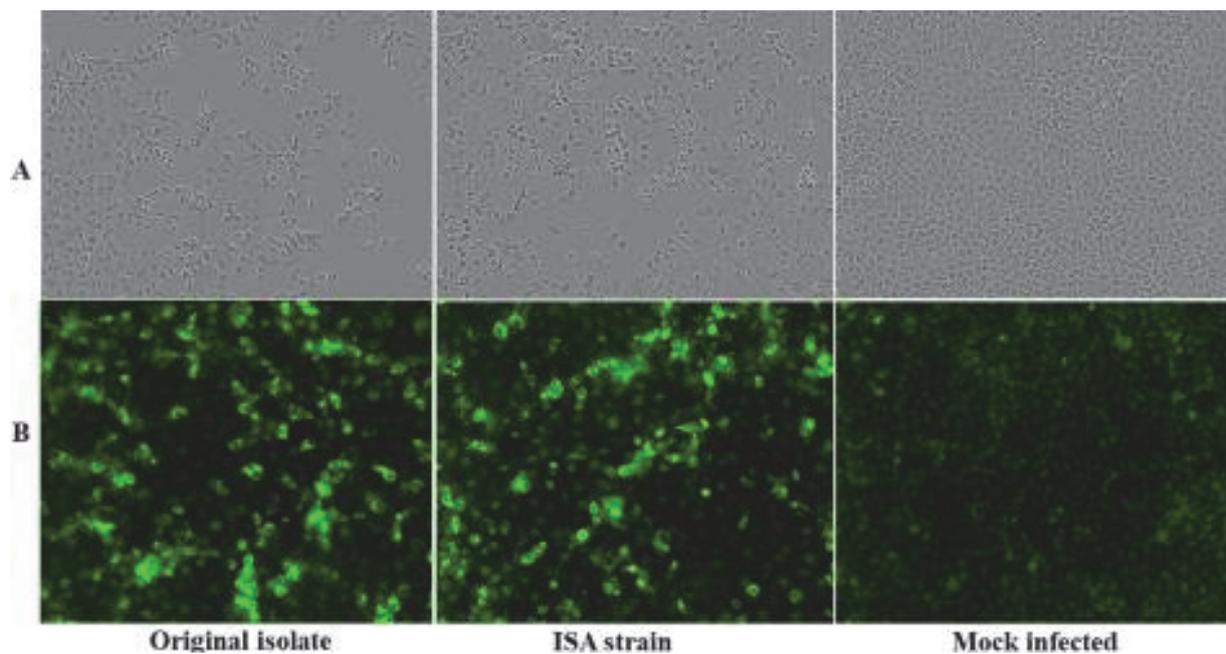


Figure 32 : Image du gel des fragments de PRRSV après PCR.

Après 5 jours post-transfection, nous avons réalisé 2 passages sur MARC-Sn en respectant un temps d'incubation de 72h entre chaque passage. La présence de particules virales infectieuses a été confirmée par la présence d'ECP ainsi que la détection de la protéine de nucléocapside par immunofluorescence indirecte (Figure 33A et B) pour l'isolat d'origine et la souche ISA. De plus nous avons confirmé ces observations par la mesure de la quantité d'ARN viral et du titre infectieux présent dans le surnageant ( $7,0 \pm 0,1 \log_{10}$  copies par mL et  $5,3 \pm 0,4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> par mL respectivement) (Tableau XI). Chaque expérience a été réalisée trois fois à l'exception du séquençage NGS.



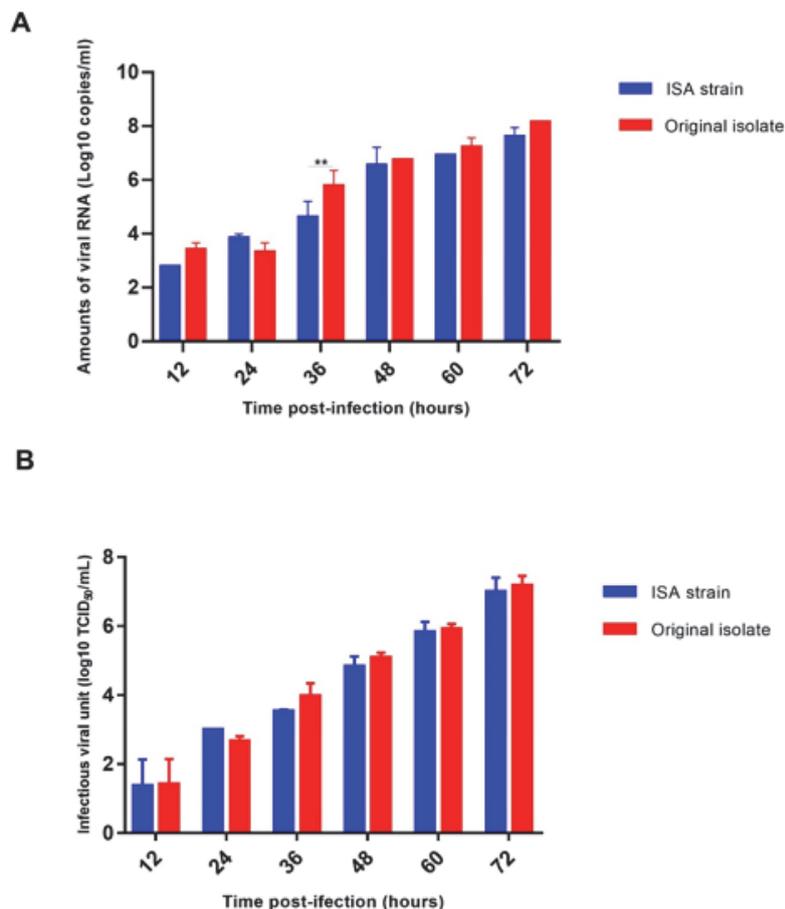
**Figure 33 :** Analyse par microscopie de l'isolat d'origine et de la souche ISA du PRRSV sur des cellules Marc-Sn. Les cellules Marc-Sn ont été infectées avec une MOI de 0,01 avec l'isolat d'origine, la souche ISA ou une fausse infection. L'effet cytopathique (A) et le dIFA pour l'expression de N (B) ont été enregistrés à 72 h pi.

**Tableau XI :** Comparaison de l'ARN viral et du titre infectieux entre l'isolat d'origine et la souche ISA dans le surnageant de cellules Marc-Sn. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Les titres infectieux et la quantité de copies d'ARN ont été exprimés en  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml et  $\log_{10}$  copies/ml respectivement (moyenne  $\pm$  ET). Les données sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes.

Virus	Quantité d'ARN viral	Titre infectieux
Isolat d'origine	$6.5 \pm 0.1$	$6.6 \pm 0.6$
Souche ISA	$7.0 \pm 0.1$	$5.3 \pm 0.4$

### 3. Cinétique de répllication

Une fois le virus obtenu avec la méthode ISA, nous avons réalisé une cinétique de croissance pour confirmer la conservation des propriétés biologiques virales. Pour cela, les cellules MARC-Sn ont été infectées à une MOI de 0,01 et les surnageants ont été récoltés toutes les 12h. Les quantités d'ARN viral ont été mesurées par le biais d'un test de qRT-PCR en temps réel et les titres infectieux par TCID<sub>50</sub> (Figure 34 A et B). La cinétique de croissance de la souche ISA et de l'isolat d'origine montre des formes très similaires malgré une différence significative dans les copies d'ARN viral observée 36 h après l'infection (pi) entre le virus ISA et l'isolat d'origine (4,9 +/- 0,1 vs 5,9 +/- 0,6 log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL ; Figure 34A). Nos résultats suggèrent que malgré cette différence significative les deux virus semblent posséder une aptitude répllicative similaire en culture cellulaire.



**Figure 34 :** Cinétique de répllication virale de l'isolat d'origine et de la souche ISA. Une MOI de 0,01 a été utilisée pour infecter des cellules MARC-Sn avec l'isolat ou la souche ISA de PRRSV. Chaque expérience a été réalisée en triplicat (N = 3). Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SD. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs pour les comparaisons multiples avec le test de comparaisons multiples de Sidak. \*\* : P < 0,05.

En parallèle de la caractérisation des propriétés biologiques des virus, nous avons procédé au séquençage (NGS) du génome complet des deux virus pour une caractérisation génomique. Pour cela, nous avons amplifié le génome viral, en 4 fragments, par RT-PCR. Nous avons d'abord vérifié leur taille et intégrité sur gel (Figure 35) avant de les purifier et de les doser. Les produits purifiés ont été mélangés de manière équimolaire et transmis à la plateforme séquençage.

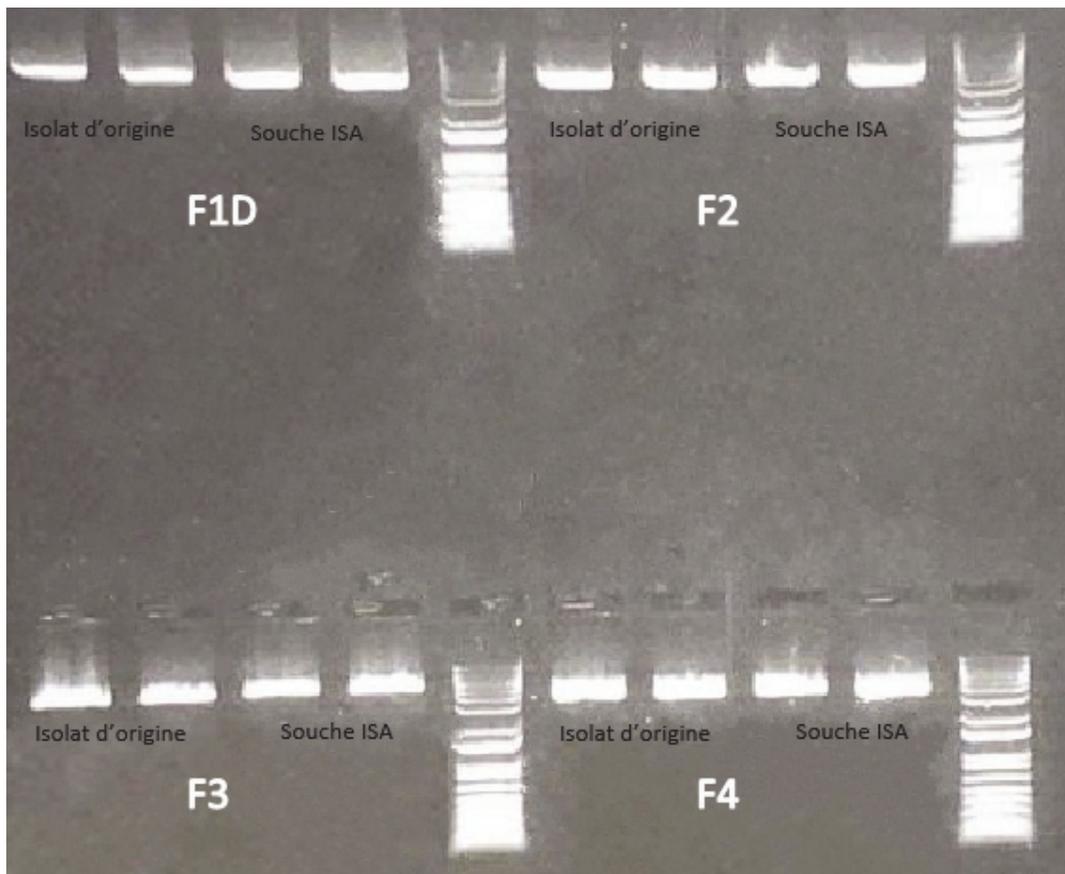


Figure 35 : Image du gel après électroporation des produits de RT-PCR des souches de PRRSV.

Après analyse des séquences nous avons mis en évidence deux mutations majoritaires et trois mutations minoritaires dans les régions codantes ORF1a et ORF1ab respectivement (Tableau XII). A noter que l'intégrité du génome du virus obtenu par la méthode ISA a été préservée à 99,98 %.

**Tableau XII** : Caractérisation génotypique et analyse complète du génome de la souche PRRSV ISA après 2 passages sur cellules MARC-Sn. La fréquence correspond aux sous-populations observées.

	Position sur le génome (nucléotide)	Région	Position sur le génome (Acide aminés)	Changement de nucléotide	Changement d'acide aminé	Fréquence (%)
<b>Mutation majoritaire</b>	3458	ORF 1a (nsp2)	1090	C → T	A → V	100
	10,230	ORF 1a (nsp10)	882	C → T	–	59
<b>Mutation minoritaire</b>	5753	ORF 1a (nsp4)	1855	C → T		7
	9467	ORF 1ab (nsp9)	627	C → T		9
	10,248	ORF 1ab (nsp10)	888	A → G		40

#### 4. Discussion

Depuis son émergence le PRRSV est devenu endémique dans de nombreuses parties du monde et l'apparition continue de nouvelles souches relève d'un véritable défi pour l'industrie porcine. Dans notre étude, nous sommes partis d'un isolat original de Betaarterivirus suid 2 et avons réussi à développer avec succès un système de génétique inverse. La méthode ISA nous a permis de reconstruire un virus répliatif avec un génome de type « sauvage » de PRRSV. Le phénotype en culture cellulaire ainsi que le génotype de la souche ISA reproduisent étroitement ceux de l'isolat d'origine, ce qui laisse supposer que les propriétés biologiques de la souche originale « sauvage » ont été préservées.

La classification phylogénétique de l'isolat d'origine a mis en évidence que celui-ci appartenait à la même lignée que des souches de HP-PRRSV (Hong et al. 2019) : la lignée 8. De plus, suite aux passages successifs en cellules MARS-Sn nous avons pu relever 6 mutations non synonymes et une mutation silencieuse réparties sur nsp2, nsp10, GP3 et GP4 du génome de l'isolat d'origine. Il a déjà été montré qu'en culture cellulaire, l'adaptation virale conduit à des changements dans la séquence consensus, mais aussi à l'apparition de mutants, favorisant la capacité répliatif des virus (Domingo et al. 2005). Dans nos travaux, il est possible que les mutations observées soient le résultat d'événements moléculaires durant les passages cellulaires (J. Xie et al. 2019). En effet, des études ont rapporté que les variations génétiques dans la région nsp10, qui interviennent dans la virulence mortelle des souches HP-PRRSV et celle hypervariable de la protéine nsp2, permettaient d'augmenter la virulence et la répliatif virale en culture cellulaire (Li et al. 2014, 10).

Entre le génome complet du virus ISA que nous avons généré et les fragments synthétisés *de novo* que nous avons conçus, nous avons observé uniquement deux mutations consensus. Ces mutations peuvent survenir soit lors de l'adaptation virale à la culture cellulaire soit pendant l'étape de production des fragments d'ADNc. En effet, l'étape d'amplification par PCR est un facteur permettant d'augmenter la diversité génétique des virus obtenus. Cependant, une étude récente sur le TBEV, prouve que l'utilisation d'une polymérase de très haute-fidélité durant l'étape de PCR a la capacité de réduire la diversité génétique de la population virale obtenue sans réduire l'aptitude ou la virulence virale aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Dans ces travaux, nous voulions diminuer la génération de sous-population et les erreurs de la polymérase qui surviennent lors de la génération de fragments de grande taille. C'est pourquoi nous avons utilisé une polymérase de plus haute-fidélité comme rapporté dans (Driouich et al. 2019). Nous avons également fait ce choix, car en utilisant une polymérase de fidélité moindre lors des PCR pour produire les ADNc, nous n'avons pas réussi à produire de particules virales infectieuses (données non présentées).

Bien que taille du génome, soit supérieure aux virus habituellement générés par ISA, nous avons réussi à obtenir un virus avec une intégrité génomique de 99,98%. Ce qui est cohérent avec l'émergence de mutations survenues lors de la génération de virus ISA, l'intégrité du génome variant entre 99,95 % et 99,99 %. C'est pourquoi lors de l'évaluation entre virus recombinants, avec ou sans mutation désirée, il est essentiel de s'assurer que les virus ISA « sauvages » reproduisent bien le phénotype de l'isolat d'origine. Bien qu'il ait déjà été montré que dans le génome du PRRSV, des mutations induisent des changements phénotypiques, ici, les deux mutations relevées n'ont pratiquement pas d'effet sur la réplication virale en culture cellulaire (Allende et al. 2000).

L'ajout du promoteur CMV sert à se servir de la machinerie de la cellule pour initier la transcription des fragments d'ADN. Cet ajout peut toutefois ajouter un risque d'erreur pendant l'épissage de l'ARN, altérant la réplication virale. Et cela en particulier pour les virus tels que le PRRSV qui possèdent une réplication cytoplasmique exclusive. C'est l'épissosome qui engage l'épissage de l'ARN, c'est-à-dire l'élimination des introns de l'ARNm précurseur et la ligation des exons conduisant à l'ARNm mature épissé. Pourtant, des études ont mis en évidence que des mutations dans le transcrit d'ARN ou au sein de l'épissosome peuvent entraîner la naissance de nouveaux sites d'épissage aboutissant à l'exclusion d'exons (Hsu et Hertel 2009; Montes et al. 2019). Sachant cela, il est possible de prédire les sites d'épissages

génomiques ou d'encore optimiser *in silico* les codons, offrant ainsi des alternatives pour supprimer les potentiels sites d'épissage.

Nous avons donc réussi à montrer que la méthode ISA était à la fois moins laborieuse que les méthodes conventionnelles et pouvait être une alternative crédible et rapide pour l'obtention de virus PRRSV biologiquement similaires aux souches « sauvages » ou possiblement modifiés génétiquement. L'approche ISA peut être également utilisée pour étudier et déchiffrer de nouvelles caractéristiques du génome viral et par la suite être exploitée pour réaliser des souches atténuées à visé vaccinal.

## C. TBEV :

### 1. Génération d'un TBEV fluorescent

Nous avons ensuite généré une souche TBEV Hypr mCherry sur la base de la séquence complète du génome de la souche TBEV Hypr. Le génome viral entier a été synthétisé *de novo* en 3 fragments chevauchants d'ADNc d'une longueur de 4,5 kb, 4,5 kb et 3,1 kb. Il a été flanqué, respectivement, à ses extrémités 5' et 3' par le pCMV et le HDR / SV40pA. Et contenant une protéine fluorescente rouge monomère mCherry. Le gène mCherry était situé dans le fragment I en aval du 5'UTR complet et des 72 premiers nucléotides du gène de la protéine C. La séquence codant mCherry était flanquée des séquences de saut de ribosome P2A et T2A à ses extrémités 5' et 3' respectivement, et suivie de la séquence codant la protéine C pleine longueur. (Haviernik et al. 2021). Ces fragments viraux sous-génomiques synthétiques ont été utilisés comme matrices pour l'amplification par PCR et transfectés dans des cellules BHK-21 (Figure 36).

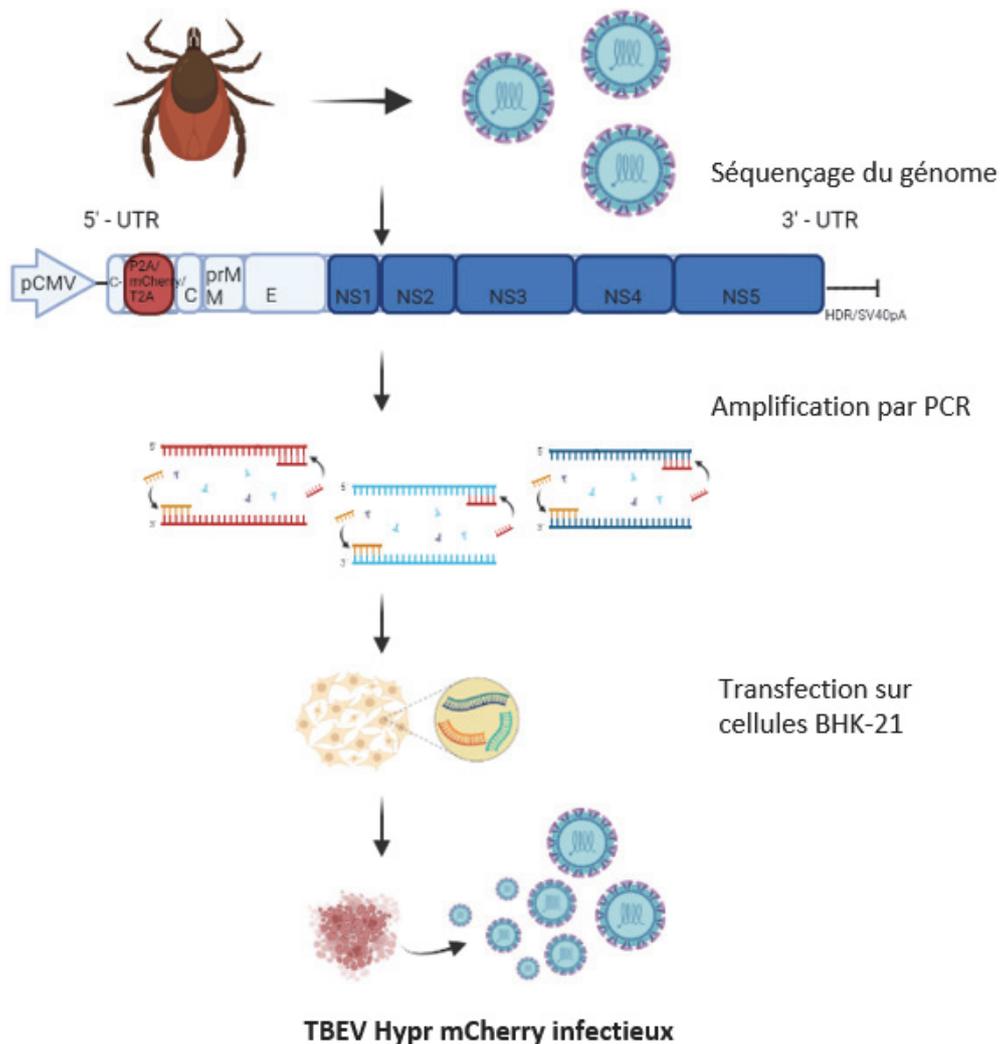
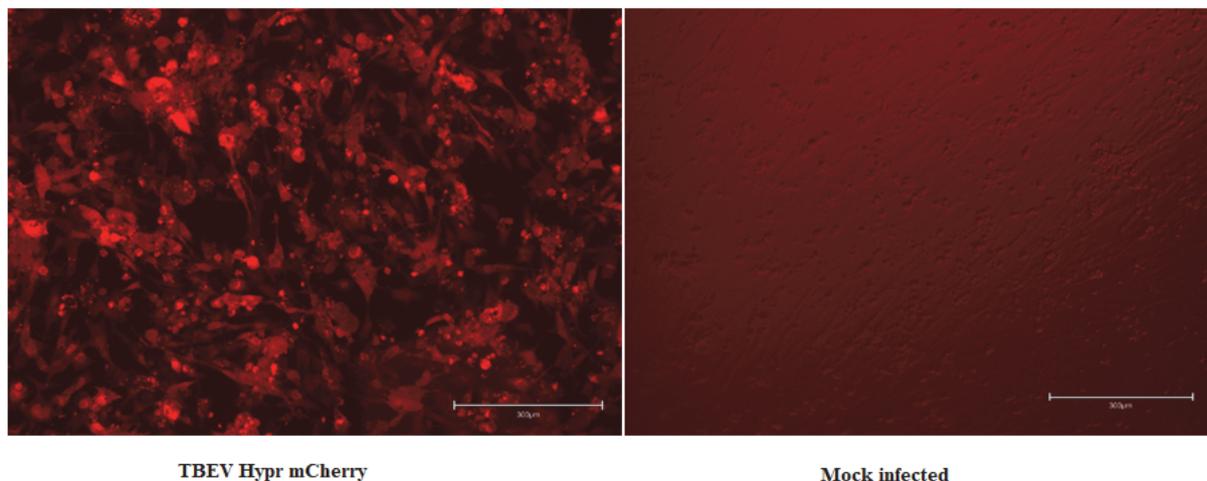


Figure 36 : Méthode ISA utilisée pour obtenir les TBEV Hypr mCherry recombinants.

Suite à la procédure ISA, 5 jours après la transfection sur BHK-21, la souche fluorescente TBEV mCherry a été obtenue et un ECP a été observé dès 72 h pi. À une MOI de 0.01, la fluorescence rouge était facilement détectable dans les cellules infectées à 72 h pi en comparaison avec le témoin négatif de cellules non-infectées (Figure 37). Les titres infectieux détectés à 3 dpi dans le surnageant de cellules BHK-21 sont indiqués dans le Tableau XIII. L'aptitude répliquative de la souche TBEV Hypr mCherry a été évaluée en TCID<sub>50</sub> et la lecture a été réalisée dans un premier temps avec la méthode standard par ECP puis par la lecture de la fluorescence via l'Incucyte (Figure 38). Les deux méthodes ont permis d'obtenir les mêmes résultats.



**Figure 37 :** Fluorescence du TBEV Hypr mCherry dans des cellules BHK-21. Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,01 avec la souche fluorescente TBEV Hypr mCherry ou non-infectées. Les photos ont été prises à 72 h pi (10×). Barre d'échelle, 300 µm.

La répllication virale est similaire entre les souches fluorescentes TBEV Hypr mCherry et Hypr et aucune différence significative dans le titre infectieux entre les deux souches n'a été observée (Tableau XIII). Après 3 passages sur cellules BHK-21, la présence du gène rapporteur mCherry a été confirmée par séquençage NGS. Par rapport au fragment synthétisé d'origine, aucune mutation ou délétion n'a été identifiée. (Pi ; N = 3 ; ANOVA à deux facteurs ;  $P > 0,05$  ; Figure 38 A et B)

**Tableau XIII :** Caractérisation phénotypique de la souche TBEV Hypr et Hypr mCherry ISA. Les titres infectieux sont exprimés en log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (moyenne +/- ET). (N=3).

Souche	Lignée cellulaire	ECP	Titre infectieux lu par ECP	Titre infectieux lu par fluorescence
TBEV Hypr	BHK-21	Oui	6.5 +/- 0.11	-
TBEV Hypr mCherry	BHK-21	Oui	6.7 +/- 0.12	6.8 +/- 0.05

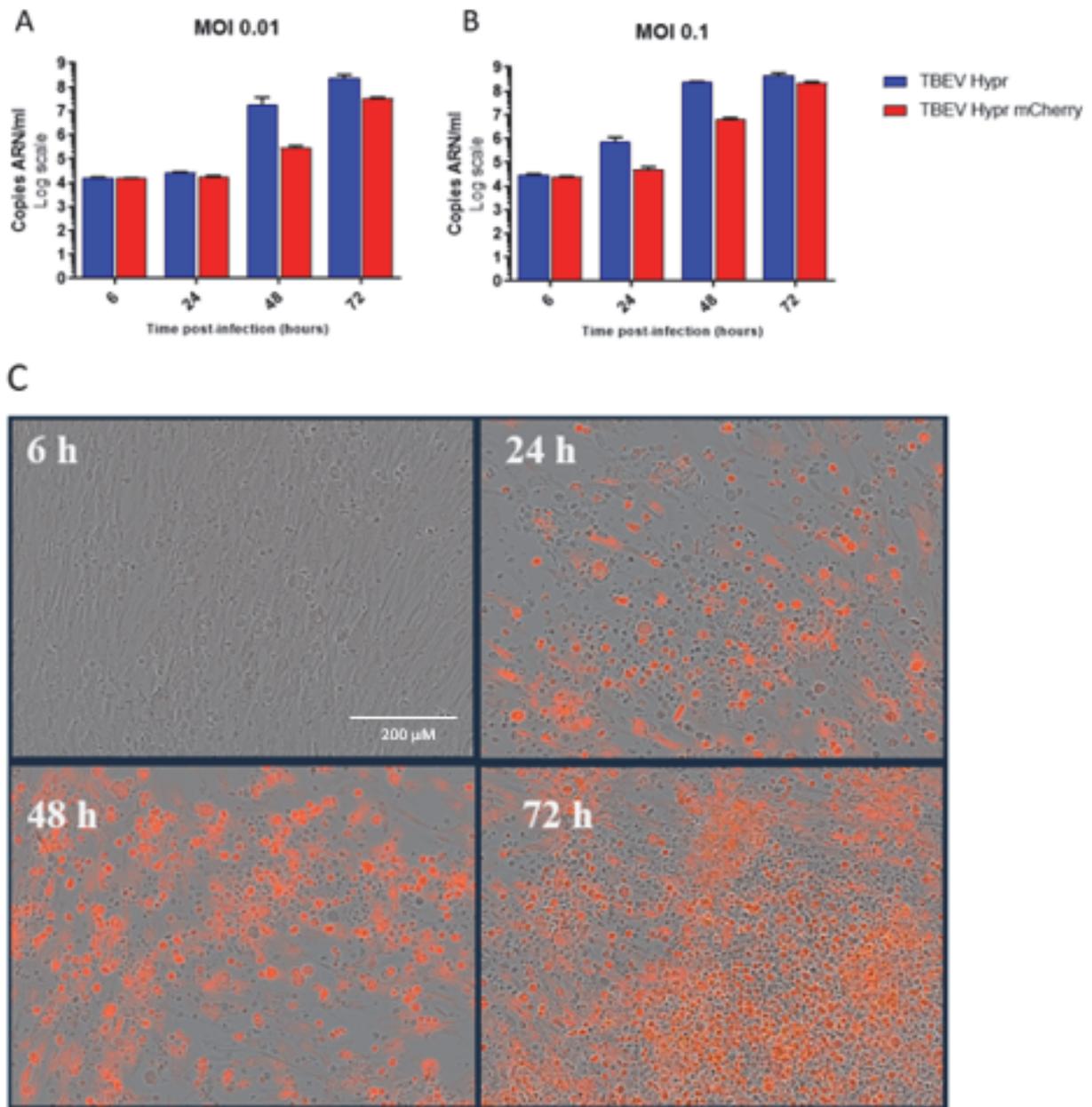


**Figure 38** : Image de la lecture fluorescente de la TCID<sub>50</sub> de la souche TBEV Hypr mCherry.

72h pi avec le logiciel Incucyte. Les lignes A et H correspondent au témoin négatif (cellules non infectées). Chaque colonne correspond à la dilution au ½ effectuée 6 fois de suite du virus. Chaque ligne correspond à la réplification d'une dilution donnée. Les cellules rouges correspondent aux cellules infectées par le virus TBEV Hypr mCherry.

## 2. Cinétique de répllication

Suite à l'obtention de virus recombinants, les cinétiques de croissance des virus TBEV Hypr et TBEV Hypr mCherry ont été étudiées dans des cellules BHK-21 en utilisant des MOI de 0.01 et 0.1. Elles ont été mesurées par qRT-PCR en temps réel, les résultats sont présentés dans figures 39 A et B. Le TBEV Hypr et Hypr mCherry ont présenté une cinétique de croissance similaire dans les cellules BHK-21 aux deux MOI testées, avec une augmentation maximale entre 24 et 48 h pi. La cinétique de croissance Hypr mCherry était en corrélation direct avec le signal de fluorescence mCherry mesuré lors de la lecture via l'Incucyte (Figure 39C). Ces données confirment que la présence du gène mCherry n'a pas affecté de manière significative les propriétés biologiques du virus *in vitro*, et l'expression du rapporteur mCherry reflète avec précision la répllication de TBEV Hypr mCherry dans les cellules infectées.



**Figure 39** : Cinétique de réplication virale du TBEV Hypr mCherry.

Des MOI de 0,01 et 0,1 (A et B respectivement) ont été utilisées pour infecter des cellules BHK-21 avec le virus du TBEV Hypr clinique ou ISA. Informations sur les données : les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SD (indiquée par les barres d'erreur). Chaque expérience a été réalisée en triple exemplaire technique (N = 3). Des comparaisons statistiques ont été effectuées entre les souches grâce au test de Mann-Whitney. Les valeurs P ( $>$  0,05) sont considérées comme non significatives et ne sont pas affichées sur le graphique. C – Analyse par microscopie de la fluorescence des cellules BHK-21 infectées à une MOI de 0,01 avec la souche TBEV Hypr mCherry lors de la cinétique de croissance. Barre d'échelle, 200  $\mu$ M.

### 3. Evaluation de la chimiothèque Prestwick utilisant le TBEV fluorescent mCherry

Ayant caractérisé biologiquement notre virus, nous avons décidé de l'utiliser pour le criblage d'une banque de 1520 molécules ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché : la banque Prestwick. La banque est constituée de 19 plaques avec 80 composés sur chaque plaque. Nous avons utilisé le plan de plaque utilisé pour le criblage de cette même banque avec le SARS-CoV-2 (Figure 40) (Touret et al. 2020). Nous avons rajouté sur chaque plaque, en duplicat, la molécules de référence NITD008 dont l'activité anti-Flavivirus a déjà été démontrée (Yin et al. 2009). Ainsi que des puits de contrôle, à savoir 8 puits sans composé ni virus et 4 puits avec les virus seuls. Les plaques étaient infectées par le TBEV Hypr mCherry à une MOI de 0.001.



**Figure 40 :** Plan de plaque du criblage des molécules antivirales. A – Contrôle cellulaire : cellule non infectée. B – Criblage antiviral : chaque puit correspond à l'activité d'un seul composé antiviral. C – Contrôle positif : composé NITD008. D – Contrôle virus : cellule infectée avec le virus seulement.

Nous avons donc criblé les 19 plaques et calculé, à l'aide de la confluence cellulaire et de la fluorescence, des pourcentages d'inhibition pour chaque puits. Sur chaque plaque, le composé NITD008 a montré une activité antivirale avec plus de 85 % d'inhibition validant nos conditions expérimentales.

Une fois ces pourcentages obtenus, nous les avons divisés par la valeur du témoin de référence, le NITD008, pour obtenir un index d'inhibition (cf. matériel et méthode). Nous avons donc obtenu 126 molécules dont l'activité antivirale est égale ou supérieure au composé NITD008 (Index d'inhibition  $\geq 1$ ) (Figure 41).

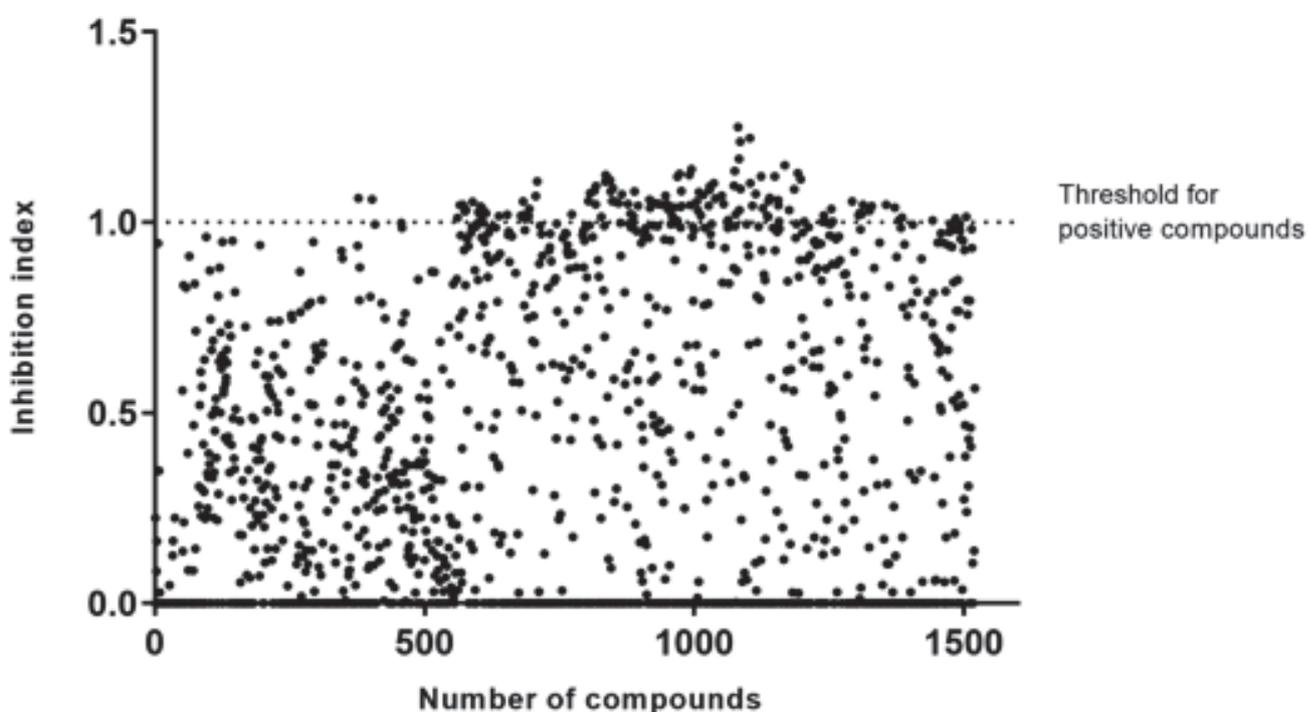


Figure 41 : Criblage de 1520 composés ayant déjà eu une autorisation de mise sur le marché (Prestwick Chemical Library®) et sélection des « HITS ». La valeur seuil est basée sur l'activité antivirale *in vitro* du composé NITD008 à 10 $\mu$ M.

Parmi ces molécules, le composé de la Ribavirin est sorti en « Hit », c'est-à-dire en « succès », un antiviral dont l'activité anti-Flavivirus a déjà été démontrée (Leyssen, Clercq, et Neyts 2006). L'ensemble des 126 molécules « hits », avec le numéro de plaque de la librairie, leur structure, leur classe thérapeutique ainsi que leur activité originale, est présenté dans l'annexe 2.

#### 4. Discussion

Dans notre étude préliminaire, nous avons inséré la séquence codant pour la protéine mCherry dans le génome viral, en aval de la région 5'UTR. Le virus obtenu après transfection était répliquatif et la fluorescence a été détectée 72 h pi. Comme déjà montré dans une précédente étude (Haviernik et al. 2021), la séquence codante pour la protéine mCherry dans le TBEV est restée stable pendant quatre passages dans des cellules BHK-21. A partir de cette souche fluorescente, nous avons développé un test d'inhibition de la réplication du TBEV Hypr mCherry basé sur la présence de fluorescence 72 h pi avec une MOI de 0,001. Dans la littérature, le composé NITD008 est reconnu pour son action antivirale vis-à-vis du TBEV (Yin et al. 2009) c'est pourquoi il a été utilisé comme référence spécifique afin de calculer l'indice d'inhibition de chaque composé.

Nous avons ensuite criblé la Prestwick Chemical Library (PCL), composée de 1 520 molécules approuvées par la Food and Drug Administration (FDA), à une concentration finale de 10  $\mu$ M. Un premier filtre basé sur la confluence cellulaire a été appliqué afin de différencier les molécules « hits » (absence de fluorescence dans le puits car activité virale) des puits sans tapis cellulaire (provoqué par la toxicité des composés) et d'éliminer ainsi de potentiel « faux positifs » en calculant un ratio fluorescence/confluence. Nous avons ensuite calculé la valeur relative du pourcentage d'inhibition par rapport au virus sans composé. Enfin, nous avons estimé un indice d'inhibition en faisant le ratio du pourcentage d'inhibition d'un composé par rapport à celui du composé NITD008.

Parmi les 1 520 composés de la PCL, 126 molécules « hits » ont montré une inhibition égale ou supérieure à celle du NITD008, soit un indice d'inhibition  $\geq 1$ . Un second filtre a ensuite été mis en place, nous avons comparé les molécules « hits » avec une liste de molécules publiées induisant de la phospholipidose, une accumulation excessive de phospholipides dans les tissus qui perturbe la réplication virale, *in vitro* (Tummino et al. 2021), mimant ainsi une activité antivirale qui n'est pas applicable *in vivo*. Grâce à ce second filtre nous avons pu réduire le nombre de molécules « hits » à 119. L'insertion de la séquence mCherry a permis une lecture semi-automatisée des résultats. Cela a permis de réduire le temps et le coût, de manière conséquente, de l'expérimentation par rapport aux analyses basées sur la mise en évidence de copies d'ARN viral/ml (pas besoin d'extraction, ni de faire de qRT-PCR) ou encore avec la méthode utilisée pour le SARS-CoV-2 basée sur la mesure de la viabilité cellulaire.

Les résultats de cette étude, basée sur une seule lignée cellulaire, devront être complétés par la répétition de cette expérience sur une seconde lignée cellulaire pour pouvoir être validés. Pour cela, l'utilisation d'un panel représentatif de lignées cellulaires plus pertinentes dérivées des tissus cible du virus TBEV (T98G : cellules de glioblastome, CCF-STTG1 : cellules astrocytaires...) pourra être utilisé (Xiaowei Zhang et al. 2016). Cela permettra également d'éliminer les molécules ayant une activité antivirale uniquement dans un type cellulaire comme cela a été le cas pour le SARS-CoV-2 et l'activité de la Chloroquine (Hoffmann et al. 2020). Les composés montrant une activité antivirale dans ces deux systèmes cellulaires seront ensuite étudiés de manière plus approfondie. Par exemple, en utilisant des systèmes *in vitro* plus aboutis tels que des organoïdes dérivés de cellules cérébrales (Qian et al. 2016). Une fois toutes ces étapes *in vitro* validées, les molécules sélectionnées pourront potentiellement être testées dans un modèle *in vivo* déjà développé au laboratoire.

## Conclusion générale et perspectives

Le PRRSV est un agent pathogène évoluant rapidement, engendrant de lourdes pertes dans l'industrie porcine. Le FeCoV, quant à lui, est un pathogène omniprésent dans les populations de chats à travers le monde, évoluant vers une maladie mortelle : la PIF. Dans cette étude, nous avons reconstruit avec succès des particules infectieuses de PRRSV et de FeCoV « sauvage » avec des caractéristiques biologiques proches des isolats d'origine. Nous avons montré que la méthode ISA représentait un atout pour la recherche vétérinaire et pouvait faciliter le développement de contre-mesures sanitaires contre le PRRSV ou le FeCoV, et plus généralement contre les pathogènes animaux.

Concernant le SARS-CoV-2 et le TBEV, nous avons utilisé cette même méthode (ISA) pour générer avec succès des particules virales infectieuses dans des conditions opératoires relativement simples. Par rapport aux technologies de génétique inverse « conventionnelles », les virus infectieux générés par ISA peuvent être obtenus sans nécessité d'étapes techniques laborieuses et souvent incertaines, comme le clonage. Elle est aussi moins laborieuse que des techniques proches comme la réaction d'extension circulaire par polymérase (circular polymerase extension reaction : CPER) (Amarilla et al. 2021; Torii et al. 2021). Dans la méthode ISA, la recombinaison des fragments d'ADN produits après PCR est directement réalisée *in cellulo*. La méthode est adaptée à la génération *de novo* de virus « sauvage » mais également à la génération de virus mutants (Aubry, Nougairède, de Fabritus, et al. 2015; Atieh et al. 2018; Touret et al. 2018; Haviernik et al. 2021). Cette approche de génétique inverse unique et simplifiée a le potentiel d'accélérer considérablement notre compréhension de la pathogenèse, de l'épidémiologie, de l'immunologie et de l'évolution des virus humains et animaux.

Mes objectifs étaient d'appliquer la méthode ISA à des Coronavirus, Arterivirus et des Flavivirus afin d'obtenir des souches virales « sauvages », délétées et réencodées recombinantes. Mais aussi de l'optimiser dans le but de pouvoir l'utiliser sur d'autres pathogènes émergents et réémergents. Lors de mon projet, j'ai réussi à générer avec succès des coronavirus félin et humain, des souches de PRRSV et TBEV. J'ai mis en évidence que cette méthode permettait d'obtenir des souches « sauvages » de pathogènes possédant un génome complexe et/ou de grande taille. D'autre part, j'ai prouvé qu'il était possible et relativement simple d'incorporer des mutations désirées au sein de ces mêmes génomes. J'ai montré

également que ces mutations permettent de faciliter l'application de ces virus dans des tests, comme le criblage de molécules antivirales. J'ai donc atteint mes objectifs fixés en début de projet et mes résultats ont pu être valorisés par l'équipe du laboratoire, conduisant à 2 articles publiés pour lesquels je fais partie des auteurs (annexe 3 et 4). J'ai aussi pu valoriser le reste de mon travail au laboratoire par une publication sur le variant Omicron, utilisant les essais antiviraux maîtrisés dans le cadre du projet SARS-CoV-2 mCherry (annexe 5).

Il est bon de souligner que les principaux phénomènes d'émergence ou de réémergence virale observés ces dernières décennies ont été causés par des virus à ARN. Et que la majorité de ces virus, comme le virus de l'encéphalite à tiques, sont des arbovirus (Saluzzo, Vidal, et Gonzalez 2013b).

Depuis la fin de la Seconde Guerre mondiale, le risque de pandémies virales est considéré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant l'une des menaces infectieuses majeures pour l'humanité. En effet, l'essentiel des nouvelles maladies infectieuses récemment découvertes sont provoquées par des agents pathogènes viraux. Plusieurs éléments peuvent contribuer à l'émergence ou la réémergence de ces virus (de Lamballerie 2016).

Les facteurs humains comme par exemple : la mondialisation, le tourisme de masse, l'urbanisation, l'import-export de marchandises ou encore l'agriculture intensive ont permis l'émergence de nombreux pathogènes. Le SARS-CoV illustre parfaitement la dissémination d'un virus émergent en lien avec la mondialisation : en 2003, un médecin chinois a propagé l'infection en dehors de la Chine continentale lorsqu'il s'est rendu à Hong Kong dans un hôtel. Cela a abouti à la contamination de dix clients de l'hôtel qui ont à leur tour transporté l'infection dans différents pays (Singapour, Vietnam, Canada et Etats-Unis) faisant du SARS-CoV la première épidémie dont la transmission par les voyages en avion a été avérée (Stadler et al. 2003).

Les facteurs environnementaux, c'est-à-dire le changement climatique ou bien la déforestation, ont également facilité l'émergence de plusieurs virus à ARN. La déforestation a engendré l'émergence du virus Nipah (NiV), un pathogène transmis par les chauves-souris provoquant des encéphalites mortelles chez l'Homme. Ce virus s'est répandu dans les populations humaines provoquant la mort de centaines de personnes depuis la fin des années 90. En effet, l'abattage des arbres a obligé les chauves-souris, réservoir du virus, à se rapprocher des habitations pour pouvoir se nourrir. C'est en 1998, que les premières interactions avec les populations locales, par le biais de la consommation de sève de dattier crue contaminée par la salive et/ou les

excréments des chauves-souris, ont provoqué la première épidémie à Sungai Nipah. Depuis, le nombre d'épidémies ne cesse d'augmenter, la plus récente date de 2018 et s'est déroulée au sud de l'Inde, où le taux de mortalité était de 91 % (Fabian Wild 2007; Soman Pillai, Krishna, et Valiya Veetil 2020).

Les facteurs politiques ou socio-économiques comprenant les crises financières, les conflits militaires ou encore l'augmentation de la démographie ont aussi été la cause de plusieurs émergences. A l'instar du virus d'immunodéficience humaine (VIH), pour qui, l'origine la plus communément admise est le saut d'espèce du syndrome d'immunodéficience simien (VIS) à l'Homme. La démographie croissante et le manque de ressources ont conduit les populations locales à chasser les animaux de brousse. Elles sont alors rentrées en contact avec des singes contaminés, les échanges sanguins (morsures/blessures) ont permis au VIS de contaminer les Hommes et par la suite se propager et évoluer en VIH (Sharp et Hahn 2010; 2011). Depuis le nombre de personnes infectées par ce pathogène ne cesse d'augmenter, chaque année, on dénombre plus d'un million de nouveaux séropositifs (OMS 2022).

L'évolution des pathogènes, à savoir les mutations génomiques aboutissant à l'adaptation et la résistance des virus par rapport aux thérapeutiques est un réel problème. Le SARS-CoV-2 en est un parfait exemple actuellement. L'évolution constante de son génome, avec l'apparition de mutations dans sa protéine Spike, a provoqué l'émergence de nombreux variants. Ces variants ont poussé la communauté scientifique à développer des vaccins de deuxième génération (Vaccins bivalents adaptés : le Spikevax Original/Omicron BA.1 de Moderna et le Comirnaty BA.4-5 de Pfizer-BioNTech). Au niveau des traitements antiviraux, l'émergence de ces variants conduit à constamment réadapter les anticorps monoclonaux disponibles et à proposer des associations (Ronapreve puis Evusheld) (Tao et al. 2021).

Les facteurs liés aux vecteurs, par exemple l'élargissement de leurs biotopes, en lien avec le changement climatique, est responsable de leur présence dans des régions jusque-là épargnées. Nous pouvons citer en exemple, le binôme *Aedes albopictus* et le virus de la Dengue (DENV) qui étaient jusque très récemment restreints aux régions sub-tropicales. L'endémisation de ce moustique en Europe est désormais à l'origine de cas de dengues autochtones en France (SPF 2022a). Les facteurs liés aux hôtes, comme l'immunodépression ou les comportements à risques sont également une cause d'émergence (Saluzzo, Vidal, et Gonzalez 2013a; Che 2019).

Pour répondre à ces futures problématiques, il est évident que les techniques de génétique inverse seront un atout incontestable afin de pouvoir étudier les propriétés biologiques des virus

(Asghar et al. 2016). Mais aussi d'évaluer leur sensibilité aux antiviraux et vaccins, ainsi que l'impact de mutations ponctuelles désirées vis-à-vis de ces outils thérapeutiques (Haviernik et al. 2021). Sur le plan « *in vitro* », cela permettra de développer de nouveaux virus rapporteurs afin d'implémenter des plateformes « haut débit » de criblage réactives et adaptatives en cas d'émergence virale. Sur le plan « *in vivo* », l'étude phénotypique associée à des mutations particulières (tropisme viral, sévérité, symptôme clinique...) sera également plus aisée (Eyer et al. 2019).

Concernant le développement de nouveaux vaccins, il est possible d'envisager la mise au point de souche vaccinale en générant des virus recombinants, moins pathogènes que les souches sauvages, mais conservant une bonne immunogénicité. On peut citer les études de (Mueller et al. 2006; Burns et al. 2006) qui ont tous deux travaillé sur l'atténuation du virus de la Polio. Les deux équipes ont apporté des modifications au niveau du génome du poliovirus (PV) par modifications des codons. Soit en les remplaçant par des codons synonymes (Mueller et al. 2006) soit en diminuant leur nombre (Burns et al. 2006). Cela a permis d'obtenir des souches avec un phénotype neuro-atténué, mais une infectiosité égale aux souches « sauvages ». Egalement, les travaux de (Billecocq et al. 2008) rapportent que des souches atténuées du virus de la vallée du Rift (RVFV) ont pu être obtenues par génétique inverse, faisant d'eux de bon candidats vaccins.

Toutefois, il est bon de souligner les faiblesses de cette méthode, à savoir les écueils rencontrés quant à l'application d'ISA à des génomes de grande taille ou présentant des particularités structurales, pour lesquels la génération de souches mutantes nécessite encore d'optimiser et d'améliorer cette méthode. C'est le cas pour la génération des nombreux variants émergents du SARS-CoV-2 et pour lesquels la technique nécessite d'être améliorée pour être réellement compétitive. Il existe également un aspect limitant d'ordre législatif, car ISA et les méthodes de génétique inverse en général, sont capables d'aboutir à l'obtention de souches virales dommageables (souches existantes ou éradiquées mortelles, gain de fonction...) en cas d'échappement de laboratoire. Certaines générées, comme la souche « sauvage » du virus de la Polio par (Cello, Paul, et Wimmer 2002), ou encore, de la grippe espagnole (Tumpey et al. 2005) pourraient avoir un impact désastreux sur la santé humaine. La genèse de telles souches soulève des considérations d'ordres éthiques et de sécurités sanitaires et amène très régulièrement à des controverses dans le milieu scientifique (Hongyu Chen, Liu, et Peng 2022). Néanmoins, au laboratoire, nous respectons scrupuleusement la législation en matière

d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ainsi qu'un travail dans des conditions de biosécurité renforcées.

Cependant, les avancées dans le domaine du génie génétique nous permettent d'être confiants sur le fait de pouvoir surmonter la première partie de ces faiblesses, car l'utilisation de méthodes polyvalentes de génétique inverse telle que « ISA » pourra répondre aux enjeux de santé publique actuels et futurs. Néanmoins, sur le point éthique, des discussions seront nécessaires pour établir une balance « bénéfiques/risques ». En effet, la possibilité de produire de telle souche (plus virulente, adaptée, potentiellement plus pathogène, etc.) amène à de nouvelles questions d'ordre morales. Faut-il le faire, car nous sommes capables de le faire ? Evidemment, la production d'OGM (avec ou non gain de fonction) est rigoureusement encadrée par le Haut Conseil des Biotechnologies (HCB). Une fois la génération d'OGM approuvée par HCB, il n'y plus aucune autorité de contrôle sur la génération de virus modifiés (Non MOT (micro-organismes et toxines hautement pathogènes)). Ce manque d'encadrement pourrait conduire à des dérives ou dans le pire des scénarios à des échappements préjudiciables de souches hautement pathogènes pour l'Homme. C'est pourquoi, la production et la manipulation de souches génétiquement modifiées doivent systématiquement se réaliser dans des laboratoires possédant une biosécurité maximale, sous un encadrement strict et avec une traçabilité exemplaire. Les comités d'éthique joueront un rôle important durant ces discussions, car comme pour l'expérimentation animale, les mœurs et mentalités évoluant, il est certain que de nouvelles mesures seront mises en place.

## Références

- Addie, D. D., I. a. T. Schaap, L. Nicolson, et O. Jarrett. 2003. « Persistence and Transmission of Natural Type I Feline Coronavirus Infection ». *The Journal of General Virology* 84 (Pt 10): 2735-44. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19129-0>.
- Allende, R., G. F. Kutish, W. Laegreid, Z. Lu, T. L. Lewis, D. L. Rock, J. Friesen, J. A. Galeota, A. R. Doster, et F. A. Osorio. 2000. « Mutations in the Genome of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Responsible for the Attenuation Phenotype ». *Archives of Virology* 145 (6): 1149-61. <https://doi.org/10.1007/s007050070115>.
- Alomair, Lamya, Sabeena Mustafa, Mohsin Saleet Jafri, Wardah Alharbi, Abdulrhman Aljouie, Fahad Almsned, Mohammed Alawad, Yahya Abdulfattah Bokhari, et Mamoon Rashid. 2022. « Molecular Dynamics Simulations to Decipher the Role of Phosphorylation of SARS-CoV-2 Nonstructural Proteins (nsps) in Viral Replication ». *Viruses* 14 (11): 2436. <https://doi.org/10.3390/v14112436>.
- Amarilla, Alberto A., Julian D. J. Sng, Rhys Parry, Joshua M. Deerain, James R. Potter, Yin Xiang Setoh, Daniel J. Rawle, et al. 2021. « A Versatile Reverse Genetics Platform for SARS-CoV-2 and Other Positive-Strand RNA Viruses ». *Nature Communications* 12 (1): 3431. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23779-5>.
- An, Tong-Qing, Zhi-Jun Tian, Yan Xiao, Ran Li, Jin-Mei Peng, Tian-Chao Wei, Yi Zhang, Yan-Jun Zhou, et Guang-Zhi Tong. 2010. « Origin of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, China ». *Emerging Infectious Diseases* 16 (2): 365-67. <https://doi.org/10.3201/eid1602.090005>.
- Arras, C., R. Fescharek, et J. P. Gregersen. 1996. « Do Specific Hyperimmunoglobulins Aggravate Clinical Course of Tick-Borne Encephalitis? ». *Lancet (London, England)* 347 (9011): 1331. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)90977-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90977-0).
- Asghar, Naveed, Yi-Ping Lee, Emma Nilsson, Richard Lindqvist, Wessam Melik, Andrea Kröger, Anna K. Överby, et Magnus Johansson. 2016. « The Role of the Poly(A) Tract in the Replication and Virulence of Tick-Borne Encephalitis Virus ». *Scientific Reports* 6 (décembre): 39265. <https://doi.org/10.1038/srep39265>.
- Atieh, Thérèse, Cécile Baronti, Xavier de Lamballerie, et Antoine Nougairède. 2016. « Simple Reverse Genetics Systems for Asian and African Zika Viruses ». *Scientific Reports* 6 (décembre): 39384. <https://doi.org/10.1038/srep39384>.
- Atieh, Thérèse, Miriam Diala El Ayoubi, Fabien Aubry, Stéphane Priet, Xavier de Lamballerie, et Antoine Nougairède. 2018. « Haiku: New Paradigm for the Reverse Genetics of Emerging RNA Viruses ». *PloS One* 13 (2): e0193069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193069>.
- Atieh, Thérèse, Antoine Nougairède, Raphaëlle Klitting, Fabien Aubry, Anna-Bella Failloux, Xavier de Lamballerie, et Stéphane Priet. 2017. « New Reverse Genetics and Transfection Methods to Rescue Arboviruses in Mosquito Cells ». *Scientific Reports* 7 (1): 13983. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14522-6>.
- Atri, Deepak, Hasan K. Siddiqi, Joshua P. Lang, Victor Nauffal, David A. Morrow, et Erin A. Bohula. 2020. « COVID-19 for the Cardiologist: Basic Virology, Epidemiology, Cardiac Manifestations, and Potential Therapeutic Strategies ». *JACC. Basic to Translational Science* 5 (5): 518-36. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2020.04.002>.
- Aubry, Fabien, Antoine Nougairède, Lauriane de Fabritus, Géraldine Piorkowski, Ernest A. Gould, et Xavier de Lamballerie. 2015. « "ISA-Lation" of Single-Stranded Positive-Sense RNA Viruses from Non-Infectious Clinical/Animal Samples ». *PloS One* 10 (9): e0138703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138703>.
- Aubry, Fabien, Antoine Nougairède, Lauriane de Fabritus, Gilles Querat, Ernest A. Gould, et Xavier de Lamballerie. 2014. « Single-Stranded Positive-Sense RNA Viruses Generated in Days Using Infectious Subgenomic Amplicons ». *The Journal of General Virology* 95 (Pt 11): 2462-67. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068023-0>.
- Aubry, Fabien, Antoine Nougairède, Ernest A. Gould, et Xavier de Lamballerie. 2015. « Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective ». *Antiviral Research* 114 (février): 67-85. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.007>.
- Baden, Lindsey R., Hana M. El Sahly, Brandon Essink, Karen Kotloff, Sharon Frey, Rick Novak, David Diemert, et al. 2021. « Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine ». *The New England Journal of Medicine* 384 (5): 403-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>.
- Bangari, Dinesh S., et Suresh K. Mittal. 2006. « Development of Nonhuman Adenoviruses as Vaccine Vectors ». *Vaccine* 24 (7): 849-62. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.101>.
- Banzhoff, Angelika, Michael Bröker, et Olaf Zent. 2008. « Protection against Tick-Borne Encephalitis (TBE) for People Living in and Travelling to TBE-Endemic Areas ». *Travel Medicine and Infectious Disease* 6 (6): 331-41. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2008.06.011>.
- Barlough, J. E., C. M. Johnson-Lussenburg, C. A. Stoddart, R. H. Jacobson, et F. W. Scott. 1985. « Experimental Inoculation of Cats with Human Coronavirus 229E and Subsequent Challenge with Feline Infectious Peritonitis Virus ». *Canadian Journal of Comparative Medicine: Revue Canadienne De Médecine Comparee* 49 (3): 303-7.
- Barrett, P. Noel, Susanne Schober-Bendixen, et Hartmut J. Ehrlich. 2003. « History of TBE Vaccines ». *Vaccine* 21 Suppl 1 (avril): S41-49. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00814-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00814-9).
- Benfield, D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorcyca, et D. Chladek. 1992. « Characterization of Swine Infertility and Respiratory Syndrome (SIRS) Virus (Isolate ATCC VR-2332) ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 4 (2): 127-33. <https://doi.org/10.1177/104063879200400202>.
- Billecocq, Agnès, Nicolas Gauliard, Nicolas Le May, Richard M. Elliott, Ramon Flick, et Michèle Bouloy. 2008. « RNA Polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses ». *Virology* 378 (2): 377-84. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.033>.
- Bock, H. L., U. Klockmann, C. Jüngst, F. Schindel-Künzel, K. Theobald, et R. Zerban. 1990. « A New Vaccine against Tick-Borne Encephalitis: Initial Trial in Man Including a Dose-Response Study ». *Vaccine* 8 (1): 22-24. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(90\)90172-i](https://doi.org/10.1016/0264-410x(90)90172-i).
- Bogovic, Petra, et Franc Strle. 2015. « Tick-Borne Encephalitis: A Review of Epidemiology, Clinical Characteristics, and Management ». *World Journal of Clinical Cases* 3 (5): 430-41. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430>.
- Brown, Bethany L., et Jeffrey McCullough. 2020. « Treatment for Emerging Viruses: Convalescent Plasma and COVID-19 ». *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis* 59 (3): 102790. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102790>.
- Burns, Cara Carthel, Jing Shaw, Ray Campagnoli, Jaume Jorba, Annelet Vincent, Jacqueline Quay, et Olen Kew. 2006. « Modulation of Poliovirus Replicative Fitness in HeLa Cells by Deoptimization of Synonymous Codon Usage in the Capsid Region ». *Journal of Virology* 80 (7): 3259-72. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3259-3272.2006>.
- Cafruny, William A., Richard G. Duman, Raymond R. Rowland, Eric A. Nelson, et Grace H. Wong. 2008. « Antibiotic-Mediated Inhibition of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection: A Novel Quinolone Function Which Potentiates the

- Antiviral Cytokine Response in MARC-145 Cells and Pig Macrophages ». *Virology: Research and Treatment* 1 (janvier): VRT.S527. <https://doi.org/10.4137/VRT.S527>.
- Calisher, Charles H., et Ernest A. Gould. 2003. « Taxonomy of the Virus Family Flaviviridae ». *Advances in Virus Research* 59: 1-19. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59001-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59001-7).
- Casali, Nicola. 2003. « Escherichia Coli Host Strains ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 235: 27-48. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:27>.
- Cavanagh, D. 1997. « Nidovirales: A New Order Comprising Coronaviridae and Arteriviridae ». *Archives of Virology* 142 (3): 629-33.
- Cave, T. A., H. Thompson, S. W. J. Reid, D. R. Hodgson, et D. D. Addie. 2002. « Kitten Mortality in the United Kingdom: A Retrospective Analysis of 274 Histopathological Examinations (1986 to 2000) ». *The Veterinary Record* 151 (17): 497-501. <https://doi.org/10.1136/vr.151.17.497>.
- Cello, Jeronimo, Aniko V. Paul, et Eckard Wimmer. 2002. « Chemical Synthesis of Poliovirus cDNA: Generation of Infectious Virus in the Absence of Natural Template ». *Science* 297 (5583): 1016-18. <https://doi.org/10.1126/science.1072266>.
- Cha, Sang-Ho, Chih-Cheng Chang, et Kyoung-Jin Yoon. 2004. « Instability of the restriction fragment length polymorphism pattern of open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential pig-to-pig passages ». *Journal of Clinical Microbiology* 42 (10): 4462-67.
- Charoenchanikran, Ponglakrit, Roongtham Kedkovid, Chaitawat Sirisereewan, Yonlayong Woonwong, Jirapat Arunorat, Panchan Sitthichareonchai, Natthawan Sopipan, Suphattra Jitimanee, Sawang Kesdangakonwut, et Roongroje Thanawongnuwech. 2016. « Efficacy of Foster® PRRS Modified Live Virus (MLV) Vaccination Strategy against a Thai Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (HP-PRRSV) Infection ». *Tropical Animal Health and Production* 48 (7): 1351-59. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1099-1>.
- Che, Didier. 2019. « Quels éléments président à l'émergence d'une épidémie virale ? Peut-on la prévoir ? » *Presse Medicale (Paris, France : 1983)* 48 (12): 1528-35. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.10.012>.
- Chen, Hongyu, Hongqi Liu, et Xiaozhong Peng. 2022. « Reverse Genetics in Virology: A Double Edged Sword ». *Biosafety and Health*, août. <https://doi.org/10.1016/j.bsheat.2022.08.001>.
- Chen, Huijun, Juanjuan Guo, Chen Wang, Fan Luo, Xuechen Yu, Wei Zhang, Jiafu Li, et al. 2020. « Clinical Characteristics and Intrauterine Vertical Transmission Potential of COVID-19 Infection in Nine Pregnant Women: A Retrospective Review of Medical Records ». *Lancet (London, England)* 395 (10226): 809-15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30360-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30360-3).
- Chen, W., H. Kawano, R. Men, D. Clark, et C. J. Lai. 1995. « Construction of Intertypic Chimeric Dengue Viruses Exhibiting Type 3 Antigenicity and Neurovirulence for Mice ». *Journal of Virology* 69 (8): 5186-90. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.8.5186-5190.1995>.
- Christianson, K. K., J. D. Ingersoll, R. M. Landon, N. E. Pfeiffer, et J. D. Gerber. 1989. « Characterization of a Temperature Sensitive Feline Infectious Peritonitis Coronavirus ». *Archives of Virology* 109 (3-4): 185-96. <https://doi.org/10.1007/BF01311080>.
- Chumakov, M. P., et N. A. Seitenok. 1940. « Tick-borne human encephalitis in the european part of USSR and Siberia ». *Science (New York, N.Y.)* 92 (2386): 263-64. <https://doi.org/10.1126/science.92.2386.263>.
- Ciota, Alexander T., Kiet A. Ngo, Amy O. Lovelace, Anne F. Payne, Yangsheng Zhou, Pei-Yong Shi, et Laura D. Kramer. 2007. « Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus ». *The Journal of general virology* 88 (Pt 3): 865-74. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82606-0>.
- Collins, J. E., D. A. Benfield, W. T. Christianson, L. Harris, J. C. Hennings, D. P. Shaw, S. M. Goyal, S. McCullough, R. B. Morrison, et H. S. Joo. 1992. « Isolation of Swine Infertility and Respiratory Syndrome Virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and Experimental Reproduction of the Disease in Gnotobiotic Pigs ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 4 (2): 117-26. <https://doi.org/10.1177/104063879200400201>.
- Commissioner FDA, Office of the. 2022. « Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Moderna, Pfizer-BioNTech Bivalent COVID-19 Vaccines for Use as a Booster Dose ». FDA. FDA. 31 août 2022. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-moderna-pfizer-biontech-bivalent-covid-19-vaccines-use>.
- Conforti, Antonella, Emanuele Marra, Giuseppe Roscilli, Fabio Palombo, Gennaro Ciliberto, et Luigi Aurisicchio. 2020. « Are Genetic Vaccines the Right Weapon against COVID-19? » *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (7): 1555-56. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.06.007>.
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2020. « The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-nCoV and Naming It SARS-CoV-2 ». *Nature Microbiology* 5 (4): 536-44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- « Coronavirus : chiffres clés et évolution de la COVID-19 en France et dans le Monde ». s.d. Consulté le 8 décembre 2021. <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-cles-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde>.
- « Coronavirus : circulation des variants du SARS-CoV-2 ». s.d. Consulté le 25 août 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-circulation-des-variants-du-sars-cov-2>.
- Crabtree, M. B., R. M. Kinney, et B. R. Miller. 2005. « Deglycosylation of the NS1 Protein of Dengue 2 Virus, Strain 16681: Construction and Characterization of Mutant Viruses ». *Archives of Virology* 150 (4): 771-86. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0430-8>.
- Curtis, Kristopher M., Boyd Yount, Amy C. Sims, et Ralph S. Baric. 2004. « Reverse Genetic Analysis of the Transcription Regulatory Sequence of the Coronavirus Transmissible Gastroenteritis Virus ». *Journal of Virology* 78 (11): 6061-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.6061-6066.2004>.
- Davidson, Andrew D., Maia Kavanagh Williamson, Sebastian Lewis, Deborah Shoemark, Miles W. Carroll, Kate J. Heesom, Maria Zambon, et al. 2020. « Characterisation of the Transcriptome and Proteome of SARS-CoV-2 Reveals a Cell Passage Induced in-Frame Deletion of the Furin-like Cleavage Site from the Spike Glycoprotein ». *Genome Medicine* 12 (1): 68. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00763-0>.
- Dea, S., R. Bilodeau, R. Athanassios, R. Sauvageau, et G. P. Martineau. 1992. « Swine Reproductive and Respiratory Syndrome in Québec: Isolation of an Enveloped Virus Serologically-Related to Lelystad Virus ». *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 33 (12): 801-8.
- Dea, S., C. A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh, et D. Rogan. 2000. « Current Knowledge on the Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus: Comparison of the North American and European Isolates ». *Archives of Virology* 145 (4): 659-88. <https://doi.org/10.1007/s007050050662>.
- Dee, Scott, John Deen, Kurt Rossow, Carrie Wiese, Satoshi Otake, Han Soo Joo, et Carlos Pijoan. s. d. « Mechanical Transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus throughout a Coordinated Sequence of Events during Cold Weather », 8.
- Dobler, Gerhard, Dieter Gniel, Robert Petermann, et Martin Pfeffer. 2012. « Epidemiology and Distribution of Tick-Borne Encephalitis ». *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)* 162 (11-12): 230-38. <https://doi.org/10.1007/s10354-012-0100-5>.

- Domingo, E., C. Gonzalez-Lopez, N. Pariente, A. Airaksinen, et C. Escarmís. 2005. « Population Dynamics of RNA Viruses: The Essential Contribution of Mutant Spectra ». *Archives of Virology. Supplementum*, n° 19: 59-71. [https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5\\_6](https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5_6).
- Donaldson, Eric F., Boyd Yount, Amy C. Sims, Susan Burkett, Raymond J. Pickles, et Ralph S. Baric. 2008. « Systematic Assembly of a Full-Length Infectious Clone of Human Coronavirus NL63 ». *Journal of Virology* 82 (23): 11948-57. <https://doi.org/10.1128/JVI.01804-08>.
- Dong, Ensheng, Hongru Du, et Lauren Gardner. 2020. « An Interactive Web-Based Dashboard to Track COVID-19 in Real Time ». *The Lancet. Infectious Diseases* 20 (5): 533-34. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1).
- Donoso Mantke, Oliver, Luidmila Karan, et Daniel Ruzek. 2011. « Tick-Borne Encephalitis Virus: A General Overview ». In *Flavivirus Encephalitis*. <https://doi.org/10.5772/21912>.
- Draganescu, N. 1959. « [Inframicrobial meningoencephalitis belonging to the group transmitted by arthropods. Identification of the pathogenic agent and study of the nerve lesions induced in white mice] ». *Studii Si Cercetari De Inframicrobiologie* 10: 363-69.
- Drew, T. W., J. J. Meulenberg, J. J. Sands, et D. J. Paton. 1995. « Production, Characterization and Reactivity of Monoclonal Antibodies to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *The Journal of General Virology* 76 ( Pt 6) (juin): 1361-69. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-6-1361>.
- Driouich, Jean-Sélim, Gregory Moureau, Xavier de Lamballerie, et Antoine Nougairède. 2019. « Reverse Genetics of RNA Viruses: ISA-Based Approach to Control Viral Population Diversity without Modifying Virus Phenotype ». *Viruses* 11 (7): E666. <https://doi.org/10.3390/v11070666>.
- Du, Taofeng, Yuchen Nan, Shuqi Xiao, Qin Zhao, et En-Min Zhou. 2017. « Antiviral Strategies against PRRSV Infection ». *Trends in Microbiology* 25 (12): 968-79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.001>.
- Dumpis, U., D. Crook, et J. Oksi. 1999. « Tick-Borne Encephalitis ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 28 (4): 882-90. <https://doi.org/10.1086/515195>.
- ECDC, Européen centre for disease prevention and control. 2021. « AER-TBE-2019.Pdf ». <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-TBE-2019.pdf>.
- Eclercy, Julie, Patricia Renson, Edouard Hirschaud, Mathieu Andraud, Véronique Béven, Frédéric Paboeuf, Nicolas Rose, Yannick Blanchard, et Olivier Bourry. 2021. « Phenotypic and Genetic Evolutions of a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Modified Live Vaccine after Limited Passages in Pigs ». *Vaccines* 9 (avril): 392. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040392>.
- Estrada-Peña, Agustín, et José de la Fuente. 2014. « The Ecology of Ticks and Epidemiology of Tick-Borne Viral Diseases ». *Antiviral Research* 108 (août): 104-28. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016>.
- Eyer, Ludek, Antoine Nougairède, Marie Uhlřřová, Jean-Sélim Driouich, Darina Zouharová, James J. Valdés, Jan Haviernik, et al. 2019. « An E460D Substitution in the NS5 Protein of Tick-Borne Encephalitis Virus Confers Resistance to the Inhibitor Galidesivir (BCX4430) and Also Attenuates the Virus for Mice ». *Journal of Virology* 93 (16): e00367-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00367-19>.
- Fabian Wild, Vanessa Guillaume. 2007. « L'émergence du virus Nipah ». Pourlascience.fr. Pour la Science. 2007. <https://www.pourlascience.fr/sd/immunologie/https://www.pourlascience.fr/sd/immunologie/l-emergence-du-virus-nipah-2707.php>.
- Fehr, Anthony R., et Stanley Perlman. 2015. « Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis ». In *Coronaviruses: Methods and Protocols*, édité par Helena Jane Maier, Erica Bickerton, et Paul Britton, 1-23. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1).
- Fehr, D., E. Holznagel, S. Bolla, B. Hauser, A. a. P. M. Herrewegh, M. C. Horzinek, et H. Lutz. 1995. « Evaluation of the Safety and Efficacy of a Modified Live FIPV Vaccine under Field Conditions ». *Feline Practice (Santa Barbara, Calif.: 1990) (USA)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Evaluation+of+the+safety+and+efficacy+of+a+modified+live+FIPV+vaccine+under+field+conditions&author=Fehr%2C+D.+%28University+of+Zurich%2C+Zurich%2C+Switzerland.%29&publication\\_year=1995](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Evaluation+of+the+safety+and+efficacy+of+a+modified+live+FIPV+vaccine+under+field+conditions&author=Fehr%2C+D.+%28University+of+Zurich%2C+Zurich%2C+Switzerland.%29&publication_year=1995).
- Fehr, Daniela, Edgar Holznagel, Stefania Bolla, Beat Hauser, Arnold A. P. M. Herrewegh, Marian C. Horzinek, et Hans Lutz. 1997. « Placebo-Controlled Evaluation of a Modified Live Virus Vaccine against Feline Infectious Peritonitis: Safety and Efficacy under Field Conditions ». *Vaccine* 15 (10): 1101-9. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00006-6).
- Fenizia, Claudio, Mara Biasin, Irene Cetin, Patrizia Vergani, Davide Mileto, Arsenio Spinillo, Maria Rita Gismondo, et al. 2020. « Analysis of SARS-CoV-2 Vertical Transmission during Pregnancy ». *Nature Communications* 11 (1): 5128. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18933-4>.
- Fitzsimmons, William E. 2022. « COVID-19 Vaccine Associated Transverse Myelitis-Evusheld as an Option When Vaccination Is Not Recommended Due to Severe Adverse Events ». *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 18 (5): 2068338. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2068338>.
- Forsberg, R., M. B. Oleksiewicz, A. M. Petersen, J. Hein, A. Bøtner, et T. Storgaard. 2001. « A Molecular Clock Dates the Common Ancestor of European-Type Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus at More than 10 Years before the Emergence of Disease ». *Virology* 289 (2): 174-79. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1102>.
- Forsberg, Roald. 2005. « Divergence Time of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Subtypes ». *Molecular Biology and Evolution* 22 (11): 2131-34. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi208>.
- Füzik, Tibor, Petra Formanová, Daniel Růžek, Kentaro Yoshii, Matthias Niedrig, et Pavel Plevka. 2018. « Structure of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Neutralization by a Monoclonal Antibody ». *Nature Communications* 9 (1): 436. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02882-0>.
- Gallian, Pierre, Boris Pastorino, Pascal Morel, Jacques Chiaroni, Laetitia Ninove, et Xavier de Lamballerie. 2020. « Lower Prevalence of Antibodies Neutralizing SARS-CoV-2 in Group O French Blood Donors ». *Antiviral Research* 181 (septembre): 104880. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104880>.
- Gandhi, Shiv, Jonathan Klein, Alexander J. Robertson, Mario A. Peña-Hernández, Michelle J. Lin, Pavitra Roychoudhury, Peiwen Lu, et al. 2022. « De Novo Emergence of a Remdesivir Resistance Mutation during Treatment of Persistent SARS-CoV-2 Infection in an Immunocompromised Patient: A Case Report ». *Nature Communications* 13 (1): 1547. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29104-y>.
- Gerber, J. D. 1995. « Overview of the Development of a Modified Live Temperature-Sensitive FIP Virus Vaccine ». *Feline Practice (Santa Barbara, Calif.: 1990) (USA)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Overview+of+the+development+of+a+modified+live+temperature-sensitive+FIP+virus+vaccine&author=Gerber%2C+J.D.+%28Pfizer+Central+Research%2C+Lincoln%2C+NE.%29&publication\\_year=1995](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Overview+of+the+development+of+a+modified+live+temperature-sensitive+FIP+virus+vaccine&author=Gerber%2C+J.D.+%28Pfizer+Central+Research%2C+Lincoln%2C+NE.%29&publication_year=1995).
- Gerber, J. D., J. D. Ingersoll, A. M. Gast, K. K. Christianson, N. L. Selzer, R. M. Landon, N. E. Pfeiffer, R. L. Sharpee, et W. H. Beckenhauer. 1990. « Protection against Feline Infectious Peritonitis by Intranasal Inoculation of a Temperature-Sensitive FIPV Vaccine ». *Vaccine* 8 (6): 536-42. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(90\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0264-410x(90)90004-6).
- Girgsdies, O. E., et G. Rosenkranz. 1996. « Tick-Borne Encephalitis: Development of a Paediatric Vaccine. A Controlled, Randomized, Double-Blind and Multicentre Study ». *Vaccine* 14 (15): 1421-28. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(96\)00081-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00081-3).

- Gonzalez, Gaëlle, Laure Bournez, Rayane Amaral Moraes, Dumarest Marine, Clémence Galon, Fabien Vorimore, Maxime Cochin, et al. 2022. « A One-Health Approach to Investigating an Outbreak of Alimentary Tick-Borne Encephalitis in a Non-Endemic Area in France (Ain, Eastern France): A Longitudinal Serological Study in Livestock, Detection in Ticks, and the First Tick-Borne Encephalitis Virus Isolation and Molecular Characterisation ». *Frontiers in Microbiology* 13: 863725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863725>.
- Gritsun, T. S., et E. A. Gould. 1995a. « Infectious Transcripts of Tick-Borne Encephalitis Virus, Generated in Days by RT-PCR ». *Virology* 214 (2): 611-18. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0072>.
- . 1995b. « Infectious Transcripts of Tick-Borne Encephalitis Virus, Generated in Days by RT-PCR ». *Virology* 214 (2): 611-18. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0072>.
- Gritsun, T. S., V. A. Lashkevich, et E. A. Gould. 2003. « Tick-Borne Encephalitis ». *Antiviral Research* 57 (1-2): 129-46. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00206-1).
- Gritsun, T. S., P. A. Nuttall, et Ernest A. Gould. 2003. « Tick-Borne Flaviviruses ». *Advances in Virus Research* 61: 317-71. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)61008-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)61008-0).
- Guo, Zhenhua, Xin-xin Chen, Rui Li, Songlin Qiao, et Gaiping Zhang. 2018. « The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective ». *Virology Journal* 15 (janvier): 2. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0910-6>.
- Gupta, Anil, Yaneicy Gonzalez-Rojas, Erick Juarez, Manuel Crespo Casal, Jaynier Moya, Diego R. Falci, Elias Sarkis, et al. 2021. « Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab ». *The New England Journal of Medicine* 385 (21): 1941-50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107934>.
- Harrison, Andrew G., Tao Lin, et Penghua Wang. 2020. « Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis ». *Trends in Immunology* 41 (12): 1100-1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.
- Haute autorité de sante (HAS). s. d. « Covid-19 : la HAS intègre les vaccins bivalents dans la stratégie de vaccination pour l'automne ». Haute Autorité de Santé. Consulté le 29 septembre 2022. [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3368002/fr/covid-19-la-has-integre-les-vaccins-bivalents-dans-la-strategie-de-vaccination-pour-l-automne](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3368002/fr/covid-19-la-has-integre-les-vaccins-bivalents-dans-la-strategie-de-vaccination-pour-l-automne).
- Haviernik, Jan, Ludek Eyer, Kentaro Yoshii, Shintaro Kobayashi, Jiri Cerny, Antoine Nougairède, Jean-Sélim Driouich, et al. 2021. « Development and Characterization of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus Expressing MCherry Reporter Protein: A New Tool for High-Throughput Screening of Antiviral Compounds, and Neutralizing Antibody Assays ». *Antiviral Research* 185 (janvier): 104968. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104968>.
- Haviernik, Jan, Michal Štefánek, Martina Fojtíková, Sabrina Kali, Noël Tordo, Ivo Rudolf, Zdeněk Hubálek, Luděk Eyer, et Daniel Ruzek. 2018. « Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses ». *Viruses* 10 (4): E184. <https://doi.org/10.3390/v10040184>.
- Hayasaka, D., A. Goto, K. Yoshii, T. Mizutani, H. Kariwa, et I. Takashima. 2001. « Evaluation of European Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccine against Recent Siberian and Far-Eastern Subtype Strains ». *Vaccine* 19 (32): 4774-79. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00218-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00218-3).
- Heinz, Franz X., et Steven L. Allison. 2003. « Flavivirus Structure and Membrane Fusion ». *Advances in Virus Research* 59: 63-97. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59003-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59003-0).
- Herrewegh, A. A., M. Mähler, H. J. Hedrich, B. L. Haagmans, H. F. Egberink, M. C. Horzinek, P. J. Rottier, et R. J. de Groot. 1997. « Persistence and Evolution of Feline Coronavirus in a Closed Cat-Breeding Colony ». *Virology* 234 (2): 349-63. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8663>.
- Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S. Schiergens, et al. 2020. « SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor ». *Cell* 181 (2): 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
- Hoffmann-La Roche. 2022. « A Multicenter, Phase III Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Outpatient Study to Evaluate the Efficacy, Safety, Antiviral Activity of RO7496998 (AT-527) in Patients With Mild or Moderate COVID-19 ». Clinical trial registration NCT04889040. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04889040). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04889040>.
- Hohn, B., et J. Collins. 1980. « A Small Cosmid for Efficient Cloning of Large DNA Fragments ». *Gene* 11 (3-4): 291-98. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(80\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(80)90069-4).
- Holmes, Edward C., et Andrés Moya. 2002. « Is the Quasispecies Concept Relevant to RNA Viruses? ». *Journal of Virology* 76 (1): 460-65. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.1.460-462.2002>.
- Holtkamp, Derald J. 2013. « Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers ». *Journal of Swine Health and Production* 21 (2): 72-84.
- Holzmann, Heidemarie, Stephan W. Aberle, Karin Stiasny, Philipp Werner, Andreas Mischak, Bernhard Zainer, Markus Netzer, Stefan Koppi, Elmar Bechter, et Franz X. Heinz. 2009. « Tick-Borne Encephalitis from Eating Goat Cheese in a Mountain Region of Austria ». *Emerging Infectious Diseases* 15 (10): 1671-73. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090743>.
- Holzworth, J. 1963. « Some Important Disorders of Cats ». *The Cornell Veterinarian* 53 (janvier): 157-60.
- Hong, Shaofeng, Ying Wei, Siyuan Lin, Jiabing Huang, Wei He, Jing Yao, Ying Chen, Ouyang Kang, Weijian Huang, et Zuzhang Wei. 2019. « Genetic Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus between 2013 and 2014 in Southern Parts of China: Identification of Several Novel Strains with Amino Acid Deletions or Insertions in Nsp2 ». *BMC Veterinary Research* 15 (1): 171. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1906-9>.
- Hoskins, J. D., H. W. Taylor, et T. L. Lomax. 1995. « Independent Evaluation of a Modified Live Feline Infectious Peritonitis Virus Vaccine under Experimental Conditions (Louisiana Experience) ». *Feline Practice (Santa Barbara, Calif.: 1990) (USA)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Independent+evaluation+of+a+modified+live+feline+infectious+peritonitis+virus+vaccine+under+experimental+conditions+%28Louisiana+experience%29&author=Hoskins%2C+J.D.+%28Louisiana+State+University%2C+Baton+Rouge%2C+LA.%29&publication\\_year=1995](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Independent+evaluation+of+a+modified+live+feline+infectious+peritonitis+virus+vaccine+under+experimental+conditions+%28Louisiana+experience%29&author=Hoskins%2C+J.D.+%28Louisiana+State+University%2C+Baton+Rouge%2C+LA.%29&publication_year=1995).
- Hou, Yixuan J., Kenichi Okuda, Caitlin E. Edwards, David R. Martinez, Takanori Asakura, Kenneth H. Dinno, Takafumi Kato, et al. 2020. « SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract ». *Cell* 182 (2): 429-446.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.042>.
- Hsu, Shu-Ning, et Klemens J. Hertel. 2009. « Spliceosomes Walk the Line: Splicing Errors and Their Impact on Cellular Function ». *RNA Biology* 6 (5): 526-30. <https://doi.org/10.4161/rna.6.5.9860>.
- Jadaan, Sameer A., et Abdul Waheed Khan. 2022. « Recent Update of COVID-19 Vaccines ». *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 12 (2): 219. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.045>.
- Jaenson, Thomas G. T., Marika Hjertqvist, Tomas Bergström, et Ake Lundkvist. 2012. « Why Is Tick-Borne Encephalitis Increasing? A Review of the Key Factors Causing the Increasing Incidence of Human TBE in Sweden ». *Parasites & Vectors* 5 (août): 184. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-184>.

- Jaiswal, Nitesh Kumar, et Shailendra K. Saxena. 2020. « Classical Coronaviruses ». In *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*, édité par Shailendra K. Saxena, 141-50. Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control. Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_12).
- Khromykh, A. A., A. N. Varnavski, P. L. Sedlak, et E. G. Westaway. 2001. « Coupling between Replication and Packaging of Flavivirus RNA: Evidence Derived from the Use of DNA-Based Full-Length cDNA Clones of Kunjin Virus ». *Journal of Virology* 75 (10): 4633-40. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4633-4640.2001>.
- Kim, Dongwan, Joo-Yeon Lee, Jeong-Sun Yang, Jun Won Kim, V. Narry Kim, et Hyeshik Chang. 2020. « The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome ». *Cell* 181 (4): 914-921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>.
- Kmetz, J., J. Vesenjak-Zmijanac, M. Bedjanic, et S. Rus. 1955. « Virus Meningo-Encephalitis in Slovenia ». *Bulletin of the World Health Organization* 12 (4): 491-501.
- Ko, Jung Ho, Phat-Loc Nguyen, Ji-Young Ahn, Hobaek Yoon, Jiho Min, Lyon Lee, Sung-Jin Cho, Simranjeet Singh Sekhon, et Yang-Hoon Kim. 2015. « The Global Research Trend of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): A Mini Review ». *Toxicology and Environmental Health Sciences* 7 (5): 241-50. <https://doi.org/10.1007/s13530-015-0254-9>.
- Korber, Bette, Will M. Fischer, Sandrasegaram Gnanakaran, Hyejin Yoon, James Theiler, Werner Abfalterer, Nick Hengartner, et al. 2020. « Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence That D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus ». *Cell* 182 (4): 812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>.
- Kreutz, L. C., et M. R. Ackermann. 1996. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Enters Cells through a Low pH-Dependent Endocytic Pathway ». *Virus Research* 42 (1-2): 137-47. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(96\)01313-5](https://doi.org/10.1016/0168-1702(96)01313-5).
- Kristensen, Charlotte S., L. K. Kvisgaard, M. Pawlowski, S. Holmgaard Carlsen, C. K. Hjulsgaard, P. M. H. Heegaard, A. Bøtner, T. Stådejek, S. Haugegaard, et L. E. Larsen. 2018. « Efficacy and Safety of Simultaneous Vaccination with Two Modified Live Virus Vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Types 1 and 2 in Pigs ». *Vaccine* 36 (2): 227-36. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.059>.
- Kunz, Christian. 2003. « TBE Vaccination and the Austrian Experience ». *Vaccine* 21 Suppl 1 (avril): S50-55. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00813-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00813-7).
- Laboratorios Hipra. 2018. *The Book for PRRS Knowledge*. Second Edition. [https://prrscontrol.com/wp-content/uploads/2020/11/prrs\\_en\\_interactive.pdf](https://prrscontrol.com/wp-content/uploads/2020/11/prrs_en_interactive.pdf).
- Labuda, M., P. A. Nuttall, O. Kozuch, E. Elecková, T. Williams, E. Zuffová, et A. Sabó. 1993. « Non-Viraemic Transmission of Tick-Borne Encephalitis Virus: A Mechanism for Arbovirus Survival in Nature ». *Experientia* 49 (9): 802-5. <https://doi.org/10.1007/BF01923553>.
- Lamballerie, Xavier de. 2016. « Diagnostic et traitement des viroses émergentes : comment aller de l'avant ? » *Bulletin De L'Academie Nationale De Medecine* 200 (8): 1605-15. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30571-0](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30571-0).
- Lambert, Marie-Ève, Benjamin Delisle, Julie Arseneault, Zvonimir Poljak, et Sylvie D'Allaire. 2019. « Positioning Quebec ORF5 Sequences of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) within Canada and Worldwide Diversity ». *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 74 (octobre): 103999. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103999>.
- Lamers, Mart M., et Bart L. Haagmans. 2022. « SARS-CoV-2 Pathogenesis ». *Nature Reviews Microbiology* 20 (5): 270-84. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>.
- Larochelle, Renée, Sylvie D'Allaire, et Ronald Magar. 2003. « Molecular Epidemiology of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Québec ». *Virus Research* 96 (1-2): 3-14. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(03\)00168-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(03)00168-0).
- Le Poder, S. 2005. « Péritonite infectieuse féline ». *EMC - Vétérinaire* 2 (4): 169-78. <https://doi.org/10.1016/j.emcvet.2005.10.001>.
- Lefkowitz, Elliot J., Donald M. Dempsey, Robert Curtis Hendrickson, Richard J. Orton, Stuart G. Siddell, et Donald B. Smith. 2018. « Virus Taxonomy: The Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ». *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D708-17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>.
- Leng, Xue, Zhenguang Li, Mingqi Xia, Yanliang He, et Hua Wu. 2012. « Evaluation of the Efficacy of an Attenuated Live Vaccine against Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Young Pigs ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 19 (8): 1199-1206. <https://doi.org/10.1128/CVI.05646-11>.
- Leyssen, Pieter, Erik De Clercq, et Johan Neyts. 2006. « The Anti-Yellow Fever Virus Activity of Ribavirin Is Independent of Error-Prone Replication ». *Molecular Pharmacology* 69 (4): 1461-67. <https://doi.org/10.1124/mol.105.020057>.
- Li, Yan, Lei Zhou, Jialong Zhang, Xinna Ge, Rong Zhou, Huaguo Zheng, Gang Geng, Xin Guo, et Hanchun Yang. 2014. « Nsp9 and Nsp10 Contribute to the Fatal Virulence of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Emerging in China ». *PLoS Pathogens* 10 (7): e1004216. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004216>.
- Ličková, Martina, Sabina Fumačová Havlíková, Monika Sláviková, et Boris Klempa. 2022. « Alimentary Infections by Tick-Borne Encephalitis Virus ». *Viruses* 14 (1): 56. <https://doi.org/10.3390/v14010056>.
- Lindenbach, B. D., C. L. Murray, H. J. Thiel, et C. M. Rice. 2013. « Flaviviridae. Fields Virology ». *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA* 1: 712-46.
- Lindenbach, B. D., et C. M. Rice. 1997. « Trans-Complementation of Yellow Fever Virus NS1 Reveals a Role in Early RNA Replication ». *Journal of Virology* 71 (12): 9608-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9608-9617.1997>.
- Lindquist, Lars. 2014. « Tick-Borne Encephalitis ». *Handbook of Clinical Neurology* 123: 531-59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00025-0>.
- Liu, Zhe, Huanying Zheng, Huifang Lin, Mingyue Li, Runyu Yuan, Jinju Peng, Qianling Xiong, et al. 2020. « Identification of Common Deletions in the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 ». *Journal of Virology* 94 (17): e00790-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00790-20>.
- Loula, T. 1991. « Mystery Pig Disease ». *Agri-Practice* 12 (1): 23-34.
- Lunney, Joan K., David A. Benfield, et Raymond R.R. Rowland. 2010. « Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine ». *Virus Research* 154 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.009>.
- Ma, Jun, Lulu Ma, Meiting Yang, Wei Wu, Wenhai Feng, et Zhongzhou Chen. 2021. « The Function of the PRRSV-Host Interactions and Their Effects on Viral Replication and Propagation in Antiviral Strategies ». *Vaccines* 9 (4): 364. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040364>.
- Madapong, Adthakorn, Kepalee Saeng-Chuto, Alongkot Boonsoongnern, Angkana Tantituvanont, et Dachrit Nilubol. 2020. « Cell-Mediated Immune Response and Protective Efficacy of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Modified-Live Vaccines against Co-Challenge with PRRSV-1 and PRRSV-2 ». *Scientific Reports* 10 (1): 1649. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58626-y>.
- Madapong, Adthakorn, Kepalee Saeng-Chuto, Puwich Chaikhumwang, Angkana Tantituvanont, Kriangsak Saardrak, Rafael Pedrazaela Sanz, Joel Miranda Alvarez, et Dachrit Nilubol. 2020. « Immune Response and Protective Efficacy of Intramuscular and Intradermal Vaccination with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) Modified Live Vaccine against Highly

- Pathogenic PRRSV-2 (HP-PRRSV-2) Challenge, Either Alone or in Combination with of PRRSV-1 ». *Veterinary Microbiology* 244 (mai): 108655. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108655>.
- Madapong, Adthakorn, Kepalee Saeng-Chuto, Angkana Tantivanont, et Dachrit Nilubol. 2021. « Safety of PRRSV-2 MLV Vaccines Administrated via the Intramuscular or Intradermal Route and Evaluation of PRRSV Transmission upon Needle-Free and Needle Delivery ». *Scientific Reports* 11 (1): 23107. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02444-3>.
- Mammen, Mammen P., Pablo Tebas, Joseph Agnes, Mary Giffear, Kimberly A. Kraynyak, Elliott Blackwood, Dinah Amante, et al. 2021. « Safety and Immunogenicity of INO-4800 DNA Vaccine against SARS-CoV-2: A Preliminary Report of a Randomized, Blinded, Placebo-Controlled, Phase 2 Clinical Trial in Adults at High Risk of Viral Exposure ». medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.05.07.21256652>.
- Mandl, Christian W., Steven L. Allison, Heidemarie Holzmann, Tamara Meixner, et Franz X. Heinz. 2000. « Attenuation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Structure-Based Site-Specific Mutagenesis of a Putative Flavivirus Receptor Binding Site ». *Journal of Virology* 74 (20): 9601-9.
- Mardassi, H., P. Gonin, C. A. Gagnon, B. Massie, et S. Dea. 1998. « A Subset of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP3 Glycoprotein Is Released into the Culture Medium of Cells as a Non-Virion-Associated and Membrane-Free (Soluble) Form ». *Journal of Virology* 72 (8): 6298-6306. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6298-6306.1998>.
- Mardassi, H., B. Massie, et S. Dea. 1996. « Intracellular Synthesis, Processing, and Transport of Proteins Encoded by ORFs 5 to 7 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Virology* 221 (1): 98-112. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0356>.
- Matile, H., E. Ferrari, A. Aeschlimann, et R. Wyler. 1981. « [The transmission of tick-borne encephalitis in Switzerland. An attempt at establishing a register of natural reservoirs for a seroepidemiologic examination of forest personnel in the middle of the country] ». *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 111 (35): 1262-69.
- Matsuyama, Shutoku, Naganori Nao, Kazuya Shirato, Miyuki Kawase, Shinji Saito, Ikuyo Takayama, Noriyo Nagata, et al. 2020. « Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (13): 7001-3. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002589117>.
- Mázló, M., et J. Szántó. 1978. « Morphological Demonstration of the Virus of Tick-Borne Encephalitis in the Human Brain ». *Acta Neuropathologica* 43 (3): 251-53. <https://doi.org/10.1007/BF00691586>.
- McReynolds, Chris, et Dennis Macy. 1997. « Feline infectious peritonitis. 2. Treatment and prevention ». *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 19 (10): 1111-.
- Mélade, Julien, Géraldine Piorkowski, Hawa Sophia Bouzidi, Alain Medawar, Claudine Raffy, Xavier de Lamballerie, et Antoine Nougairède. 2021. « Rapid Reconstruction of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Using Synthetic DNA Fragments ». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19: 5108-16. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.040>.
- Mélade, Julien, Géraldine Piorkowski, Franck Touret, Toscane Fourié, Jean-Sélim Driouich, Maxime Cochin, Hawa Sophia Bouzidi, Bruno Coutard, Antoine Nougairède, et Xavier de Lamballerie. 2021. « A simple reverse genetics method to generate recombinant coronaviruses »; <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-59766/v3>.
- Meng, X. J. 2000. « Heterogeneity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Implications for Current Vaccine Efficacy and Future Vaccine Development ». *Veterinary Microbiology* 74 (4): 309-29. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00196-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00196-6).
- Mengeling, W. L., A. C. Vorwald, K. M. Lager, D. F. Clouser, et R. D. Wesley. 1999. « Identification and Clinical Assessment of Suspected Vaccine-Related Field Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *American Journal of Veterinary Research* 60 (3): 334-40.
- Mengeling, William L., Kelly M. Lager, Ann C. Vorwald, et Deborah F. Clouser. 2003. « Comparative Safety and Efficacy of Attenuated Single-Strain and Multi-Strain Vaccines for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome ». *Veterinary Microbiology* 93 (1): 25-38. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00426-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00426-1).
- Meulenberg, J. J., M. M. Hulst, E. J. de Meijer, P. L. Moonen, A. den Besten, E. P. de Kluyver, G. Wensvoort, et R. J. Moormann. 1993. « Lelystad Virus, the Causative Agent of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS), Is Related to LDV and EAV ». *Virology* 192 (1): 62-72. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1008>.
- Meulenberg, J. J., et A. Petersen-den Besten. 1996. « Identification and Characterization of a Sixth Structural Protein of Lelystad Virus: The Glycoprotein GP2 Encoded by ORF2 Is Incorporated in Virus Particles ». *Virology* 225 (1): 44-51. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0573>.
- Mohan, Jagan, et Thomas Wollert. 2021. « Membrane Remodeling by SARS-CoV-2 - Double-Enveloped Viral Replication ». *Faculty Reviews* 10: 17. <https://doi.org/10.12703/r/10-17>.
- Monaco, A. P., et Z. Larin. 1994. « YACs, BACs, PACs and MACs: Artificial Chromosomes as Research Tools ». *Trends in Biotechnology* 12 (7): 280-86. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90140-6).
- Monath, T. P., K. Soike, I. Levenbook, Z. X. Zhang, J. Arroyo, S. Delagrave, G. Myers, et al. 1999. « Recombinant, Chimeric Live, Attenuated Vaccine (ChimeriVax) Incorporating the Envelope Genes of Japanese Encephalitis (SA14-14-2) Virus and the Capsid and Nonstructural Genes of Yellow Fever (17D) Virus Is Safe, Immunogenic and Protective in Non-Human Primates ». *Vaccine* 17 (15-16): 1869-82. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00487-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00487-3).
- Monath, Thomas P., Juan Arroyo, Inessa Levenbook, Zhen-Xi Zhang, John Catalan, Ken Draper, et Farshad Guirakhoo. 2002. « Single Mutation in the Flavivirus Envelope Protein Hinge Region Increases Neurovirulence for Mice and Monkeys but Decreases Viscerotropism for Monkeys: Relevance to Development and Safety Testing of Live, Attenuated Vaccines ». *Journal of Virology* 76 (4): 1932-43. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1932-1943.2002>.
- Montali, R. J., et J. D. Strandberg. 1972. « Extraperitoneal Lesions in Feline Infectious Peritonitis ». *Veterinary Pathology* 9 (2): 109-21. <https://doi.org/10.1177/030098587200900204>.
- Montes, Matías, Brianne L. Sanford, Daniel F. Comiskey, et Dawn S. Chandler. 2019. « RNA Splicing and Disease: Animal Models to Therapies ». *Trends in Genetics: TIG* 35 (1): 68-87. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.10.002>.
- Moritsch, H., et J. Krausler. 1957. « [Endemic Early Summer Meningoencephalomyelitis in the Vienna Area (Schneider's Disease)] ». *Wiener Klinische Wochenschrift* 69 (50): 952-956 contd.
- Mueller, Steffen, Dimitris Papamichail, J. Robert Coleman, Steven Skiena, et Eckard Wimmer. 2006. « Reduction of the Rate of Poliovirus Protein Synthesis through Large-Scale Codon Deoptimization Causes Attenuation of Viral Virulence by Lowering Specific Infectivity ». *Journal of Virology* 80 (19): 9687-96. <https://doi.org/10.1128/JVI.00738-06>.
- Neuman, B. W., et M. J. Buchmeier. 2016. « Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle ». *Advances in Virus Research* 96: 1-27. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.005>.
- Neumann, Eric J., James B. Kliebenstein, Colin D. Johnson, John W. Mabry, Eric J. Bush, Ann H. Seitzinger, Alice L. Green, et Jeffrey J. Zimmerman. 2005. « Assessment of the Economic Impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome on Swine Production in the United States ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227 (3): 385-92. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>.

- Nielsen, Thomas L., Jens Nielsen, Per Have, Poul Bækbo, Rikke Hoff-Jørgensen, et Anette Bøtner. 1997. « Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus ». *Veterinary microbiology* 54 (2): 101-12.
- Nieuwstadt, A. P. van, J. J. Meulenber, A. van Essen-Zanbergen, A. Petersen-den Besten, R. J. Bende, R. J. Moormann, et G. Wensvoort. 1996. « Proteins Encoded by Open Reading Frames 3 and 4 of the Genome of Lelystad Virus (Arteriviridae) Are Structural Proteins of the Virion ». *Journal of Virology* 70 (7): 4767-72. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.7.4767-4772.1996>.
- Oliveira, Edson R. A., Ronaldo Mohana-Borges, Ricardo B. de Alencastro, et Bruno A. C. Horta. 2017. « The Flavivirus Capsid Protein: Structure, Function and Perspectives towards Drug Design ». *Virus Research* 227 (janvier): 115-23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.005>.
- OMS. 2022. « Principaux repères sur le VIH/sida ». 2022. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
- Otake, Satoshi, Scott Dee, Kurt Rossow, Roger Moon, et Carlos Pijoan. 2002. « Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen) ». *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 66 (août): 191-95.
- Oude Munnink, Bas B., Reina S. Sikkema, David F. Nieuwenhuijse, Robert Jan Molenaar, Emmanuelle Munger, Richard Molenkamp, Arco van der Spek, et al. 2021. « Transmission of SARS-CoV-2 on Mink Farms between Humans and Mink and Back to Humans ». *Science (New York, N.Y.)* 371 (6525): 172-77. <https://doi.org/10.1126/science.abe5901>.
- Ouyang, Kang, Jagadish Hiremath, Basavaraj Binjawadagi, Duan-Liang Shyu, Santosh Dhakal, Jesus Arcos, Rose Schleappi, et al. 2016. « Comparative Analysis of Routes of Immunization of a Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccine in a Heterologous Virus Challenge Study ». *Veterinary Research* 47 (mars): 45. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0331-3>.
- Pathak, Rajesh Kumar, Do-Young Kim, Byeonghwi Lim, et Jun-Mo Kim. 2022. « Investigating Multi-Target Antiviral Compounds by Screening of Phytochemicals From Neem (*Azadirachta indica*) Against PRRSV: A Vetinformatics Approach ». *Frontiers in Veterinary Science* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2022.854528>.
- Pattyn, S. R., et R. Wyler. 1955. « [Viral meningoencephalitis in Austria. IV. Virus in blood in experimental infection; attempted transmission by mosquitoes] ». *Bulletin of the World Health Organization* 12 (4): 581-89.
- Pedersen, N. C., J. F. Boyle, K. Floyd, A. Fudge, et J. Barker. 1981. « An Enteric Coronavirus Infection of Cats and Its Relationship to Feline Infectious Peritonitis ». *American Journal of Veterinary Research* 42 (3): 368-77.
- Pedersen, Niels C. 2009. « A Review of Feline Infectious Peritonitis Virus Infection: 1963-2008 ». *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11 (4): 225-58. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.09.008>.
- Pedersen, Niels C., Claire E. Allen, et Leslie A. Lyons. 2008. « Pathogenesis of Feline Enteric Coronavirus Infection ». *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10 (6): 529-41. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.02.006>.
- Pedersen, Niels C., Yunjeong Kim, Hongwei Liu, Anushka C Galasiti Kankanamalage, Chrissy Eckstrand, William C Groutas, Michael Bannasch, Juliana M Meadows, et Kyeong-Ok Chang. 2018. « Efficacy of a 3C-like Protease Inhibitor in Treating Various Forms of Acquired Feline Infectious Peritonitis ». *Journal of Feline Medicine and Surgery* 20 (4): 378-92. <https://doi.org/10.1177/1098612X17729626>.
- Pedersen, Niels C., Hongwei Liu, Monica Durden, et Leslie A. Lyons. 2016. « Natural Resistance to Experimental Feline Infectious Peritonitis Virus Infection Is Decreased Rather than Increased by Positive Genetic Selection ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 171 (mars): 17-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.01.002>.
- Perera-Lecoin, Manuel, Laurent Meertens, Xavier Carnec, et Ali Amara. 2014. « Flavivirus Entry Receptors: An Update ». *Viruses* 6 (1): 69-88. <https://doi.org/10.3390/v6010069>.
- Pesteanu-Somogyi, Loretta D., Christina Radzai, et Barrak M. Pressler. 2006. « Prevalence of Feline Infectious Peritonitis in Specific Cat Breeds ». *Journal of Feline Medicine and Surgery* 8 (1): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2005.04.003>.
- Pierson, Theodore C., et Michael S. Diamond. 2020. « The Continued Threat of Emerging Flaviviruses ». *Nature Microbiology* 5 (6): 796-812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>.
- Pileri, Emanuela, et Enric Mateu. 2016. « Review on the Transmission Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus between Pigs and Farms and Impact on Vaccination ». *Veterinary Research* 47 (1): 108. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4>.
- Plante, Jessica A., Yang Liu, Jianying Liu, Hongjie Xia, Bryan A. Johnson, Kumari G. Lokugamage, Xianwen Zhang, et al. 2021. « Author Correction: Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness ». *Nature* 595 (7865): E1. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03657-2>.
- Pogodina, V. V., N. G. Bochkova, L. S. Karan', M. P. Frolova, A. G. Trukhina, G. V. Malenko, L. S. Levina, et A. E. Platonov. 2004. « [Comparative analysis of virulence of the Siberian and Far-East subtypes of the tick-borne encephalitis virus] ». *Voprosy Virusologii* 49 (6): 24-30.
- Polack, Fernando P., Stephen J. Thomas, Nicholas Kitchin, Judith Absalon, Alejandra Gurtman, Stephen Lockhart, John L. Perez, et al. 2020. « Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine ». *The New England Journal of Medicine* 383 (27): 2603-15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>.
- Poland, A. M., H. Vennema, J. E. Foley, et N. C. Pedersen. 1996. « Two Related Strains of Feline Infectious Peritonitis Virus Isolated from Immunocompromised Cats Infected with a Feline Enteric Coronavirus ». *Journal of Clinical Microbiology* 34 (12): 3180-84. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.12.3180-3184.1996>.
- Polo, S., G. Ketner, R. Levis, et B. Falgout. 1997. « Infectious RNA Transcripts from Full-Length Dengue Virus Type 2 CDNA Clones Made in Yeast ». *Journal of Virology* 71 (7): 5366-74. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.7.5366-5374.1997>. « prrs\_en\_interactive.pdf ». s. d. Consulté le 29 août 2022. [https://prsrcontrol.com/wp-content/uploads/2020/11/prrs\\_en\\_interactive.pdf](https://prsrcontrol.com/wp-content/uploads/2020/11/prrs_en_interactive.pdf).
- Pulkkinen, Lauri I. A., Sarah J. Butcher, et Maria Anastasina. 2018. « Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View ». *Viruses* 10 (7): 350. <https://doi.org/10.3390/v10070350>.
- Qian, Xuyu, Ha Nam Nguyen, Mingxi M. Song, Christopher Hadiono, Sarah C. Ogden, Christy Hammack, Bing Yao, et al. 2016. « Brain Region-specific Organoids using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure ». *Cell* 165 (5): 1238-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.032>.
- Qiao, Jie. 2020. « What Are the Risks of COVID-19 Infection in Pregnant Women? ». *Lancet (London, England)* 395 (10226): 760-62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30365-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30365-2).
- Qing, Min, Gang Zou, Qing-Yin Wang, Hao Ying Xu, Hongping Dong, Zhiming Yuan, et Pei-Yong Shi. 2010. « Characterization of Dengue Virus Resistance to Brequinar in Cell Culture ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (9): 3686-95. <https://doi.org/10.1128/AAC.00561-10>.
- Randolph, Sarah E. 2004. « Evidence That Climate Change Has Caused "emergence" of Tick-Borne Diseases in Europe? ». *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 293 Suppl 37 (avril): 5-15. [https://doi.org/10.1016/s1433-1128\(04\)80004-4](https://doi.org/10.1016/s1433-1128(04)80004-4).
- Rastogi, Meghana, Nikhil Sharma, et Sunit Kumar Singh. 2016. « Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein ». *Virology Journal* 13 (1): 131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>.

- Reed, W. M., et H. Muench. 1938. « A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS12 ». *American Journal of Epidemiology* 27 (3): 493-97. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.
- Ridgeback Biotherapeutics, LP. 2022. « A Phase IIa Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Safety, Tolerability and Efficacy of EIDD-2801 to Eliminate SARS-CoV-2RNA Detection in Persons With COVID-19 ». Clinical trial registration NCT04405570. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04405570](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04405570).
- Riemer, Friederike, Kirsten A. Kuehner, Susanne Ritz, Carola Sauter-Louis, et Katrin Hartmann. 2016. « Clinical and Laboratory Features of Cats with Feline Infectious Peritonitis--a Retrospective Study of 231 Confirmed Cases (2000-2010) ». *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18 (4): 348-56. <https://doi.org/10.1177/1098612X15586209>.
- Rihn, Suzannah J., Andres Merits, Siddharth Bakshi, Matthew L. Turnbull, Arthur Wickenhagen, Akira J. T. Alexander, Carla Baillie, et al. 2021. « A Plasmid DNA-Launched SARS-CoV-2 Reverse Genetics System and Coronavirus Toolkit for COVID-19 Research ». *PLoS Biology* 19 (2): e3001091. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001091>.
- Rockx, Barry, Timothy Sheahan, Eric Donaldson, Jack Harkema, Amy Sims, Mark Heise, Raymond Pickles, Mark Cameron, David Kelvin, et Ralph Baric. 2007. « Synthetic Reconstruction of Zoonotic and Early Human Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Isolates That Produce Fatal Disease in Aged Mice ». *Journal of Virology* 81 (14): 7410-23. <https://doi.org/10.1128/JVI.00505-07>.
- Rohrbach, B. W., A. M. Legendre, C. A. Baldwin, D. H. Lein, W. M. Reed, et R. B. Wilson. 2001. « Epidemiology of Feline Infectious Peritonitis among Cats Examined at Veterinary Medical Teaching Hospitals ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218 (7): 1111-15. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1111>.
- Ruggli, N., et C. M. Rice. 1999. « Functional cDNA Clones of the Flaviviridae: Strategies and Applications ». *Advances in Virus Research* 53: 183-207. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60348-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60348-6).
- Ruzek, Daniel, Tatjana Avšič Županc, Johannes Borde, Ales Chrdle, Ludek Eyer, Galina Karganova, Ivan Kholodilov, et al. 2019. « Tick-Borne Encephalitis in Europe and Russia: Review of Pathogenesis, Clinical Features, Therapy, and Vaccines ». *Antiviral Research* 164 (avril): 23-51. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014>.
- Saluzzo, Jean-François, Pierre Vidal, et Jean-Paul Gonzalez, éd. 2013a. « Chapitre II. Facteurs d'émergence des maladies virales ». In *Les virus émergents*, 35-89. Objectifs Suds. Marseille: IRD Éditions. <http://books.openedition.org/irdeditions/3360>.
- Saluzzo, Jean-François, Pierre Vidal, et Jean-Paul Gonzalez, éd. 2013b. « Chapitre IV. Le défi et le futur des maladies virales émergentes ». In *Les virus émergents*, 129-64. Objectifs Suds. Marseille: IRD Éditions. <http://books.openedition.org/irdeditions/3362>.
- Schoeman, Dewald, et Burtram C. Fielding. 2019. « Coronavirus Envelope Protein: Current Knowledge ». *Virology Journal* 16 (1): 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>.
- Schrauf, Sabrina, Christian W. Mandl, Lesley Bell-Sakyi, et Tim Skern. 2009. « Extension of flavivirus protein C differentially affects early RNA synthesis and growth in mammalian and arthropod host cells ». *Journal of virology* 83 (21): 11201-10.
- Scobey, Trevor, Boyd L. Yount, Amy C. Sims, Eric F. Donaldson, Sudhakar S. Agnihothram, Vineet D. Menachery, Rachel L. Graham, et al. 2013. « Reverse Genetics with a Full-Length Infectious cDNA of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (40): 16157-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311542110>.
- Scott, Cameron C., Fabrizio Vacca, et Jean Gruenberg. 2014. « Endosome Maturation, Transport and Functions ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Endosome dynamics & Tubulogenesis, 31 (juillet): 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>.
- Scott, F. W., W. V. Corapi, et C. W. Olsen. 1995. « Independent Evaluation of a Modified Live FIPV Vaccine under Experimental Conditions (Cornell Experience) ». *Feline Practice (Santa Barbara, Calif.: 1990) (USA)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Independent+evaluation+of+a+modified+live+FIPV+vaccine+under+experimental+conditions+%28Cornell+experience%29&author=Scott%2C+F.W.+%28Cornell+University%2C+Ithaca%2C+NY.%29&publication\\_year=1995](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Independent+evaluation+of+a+modified+live+FIPV+vaccine+under+experimental+conditions+%28Cornell+experience%29&author=Scott%2C+F.W.+%28Cornell+University%2C+Ithaca%2C+NY.%29&publication_year=1995).
- Scott, F. W., C. W. Olsen, et W. V. Corapi. 1995. « Antibody-Dependent Enhancement of Feline Infectious Peritonitis Virus Infection ». *Feline Practice (Santa Barbara, Calif.: 1990) (USA)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Antibody-dependent+enhancement+of+feline+infectious+peritonitis+virus+infection&author=Scott%2C+F.W.+%28Cornell+University%2C+Ithaca%2C+NY.%29&publication\\_year=1995](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Antibody-dependent+enhancement+of+feline+infectious+peritonitis+virus+infection&author=Scott%2C+F.W.+%28Cornell+University%2C+Ithaca%2C+NY.%29&publication_year=1995).
- Shannon, Ashleigh, Barbara Selisko, Nhung-Thi-Tuyet Le, Johanna Huchting, Franck Touret, Géraldine Piorkowski, Véronique Fattorini, et al. 2020. « Rapid Incorporation of Favipiravir by the Fast and Permissive Viral RNA Polymerase Complex Results in SARS-CoV-2 Lethal Mutagenesis ». *Nature Communications* 11 (1): 4682. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18463-z>.
- Sharp, Paul M., et Beatrice H. Hahn. 2010. « The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1552): 2487-94. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0031>.
- Sharp, Paul M., et Beatrice H. Hahn. 2011. « Origins of HIV and the AIDS Pandemic ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: 1 (1): a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>.
- Shu, Ting, Muhan Huang, Di Wu, Yujie Ren, Xueyi Zhang, Yang Han, Jingfang Mu, et al. 2020. « SARS-Coronavirus-2 Nsp13 Possesses NTPase and RNA Helicase Activities That Can Be Inhibited by Bismuth Salts ». *Virologica Sinica* 35 (3): 321-29. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00242-1>.
- Simon-Lorière, Etienne, et Olivier Schwartz. 2022. « Towards SARS-CoV-2 Serotypes? » *Nature Reviews. Microbiology* 20 (4): 187-88. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00708-x>.
- Sirohi, Devika, et Richard J Kuhn. 2017. « Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors ». *The Journal of Infectious Diseases* 216 (suppl 10): S935-44. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>.
- Smith, T. J., W. E. Brandt, J. L. Swanson, J. M. McCown, et E. L. Buescher. 1970. « Physical and Biological Properties of Dengue-2 Virus and Associated Antigens ». *Journal of Virology* 5 (4): 524-32. <https://doi.org/10.1128/JVI.5.4.524-532.1970>.
- Soman Pillai, Vinod, Gayathri Krishna, et Mohanan Valiya Veetil. 2020. « Nipah Virus: Past Outbreaks and Future Containment ». *Viruses* 12 (4): 465. <https://doi.org/10.3390/v12040465>.
- Somnuk, Pawit, Richard E. Hauhart, John P. Atkinson, Michael S. Diamond, et Panisadee Avirutnan. 2011. « N-linked glycosylation of Dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement ». *Virology* 413 (2): 253-64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.02.022>.
- Souza, Pedro F. N., Felipe P. Mesquita, Jackson L. Amaral, Patricia G. C. Landim, Karollyny R. P. Lima, Marília B. Costa, Izabelle R. Farias, Luana B. Lima, et Raquel C. Montenegro. 2021. « The Human Pandemic Coronaviruses on the Show: The Spike Glycoprotein as the Main Actor in the Coronaviruses Play ». *International Journal of Biological Macromolecules* 179 (mai): 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.203>.
- SPF. 2022a. « Chikungunya, dengue et zika - Données de la surveillance renforcée en France métropolitaine en 2022 ». 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/chikungunya/articles/donnees-en-france-metropolitaine/chikungunya-dengue-et-zika-donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-france-metropolitaine-en-2022>.
- SPF. 2022b. « Coronavirus : chiffres clés et évolution de la COVID-19 en France et dans le Monde ». 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-cles-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde>.

- Spilman, Michael S., Craig Welbon, Eric Nelson, et Terje Dokland. 2009. « Cryo-Electron Tomography of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Organization of the Nucleocapsid ». *The Journal of General Virology* 90 (Pt 3): 527-35. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007674-0>.
- Stadler, Konrad, Vega Masignani, Markus Eickmann, Stephan Becker, Sergio Abrignani, Hans-Dieter Klenk, et Rino Rappuoli. 2003. « SARS — Beginning to Understand a New Virus ». *Nature Reviews Microbiology* 1 (3): 209-18. <https://doi.org/10.1038/nrmicro775>.
- Stauffer, Fausto, Tatiana El-Bacha, et Andrea T. Da Poian. 2006. « Advances in the Development of Inactivated Virus Vaccines ». *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 1 (3): 291-96. <https://doi.org/10.2174/157489106778777673>.
- Stringfixer Flavivirus. s. d. « Flavivirus ». Consulté le 23 juin 2022. <http://stringfixer.com/fr/Flavivirus>.
- Sumilo, Dana, Antra Bormane, Loreta Asokliene, Veera Vasilenko, Irina Golovljova, Tatjana Avsic-Zupanc, Zdenek Hubalek, et Sarah E. Randolph. 2008. « Socio-Economic Factors in the Differential Upsurge of Tick-Borne Encephalitis in Central and Eastern Europe ». *Reviews in Medical Virology* 18 (2): 81-95. <https://doi.org/10.1002/rmv.566>.
- Süss, Jochen. 2011. « Tick-Borne Encephalitis 2010: Epidemiology, Risk Areas, and Virus Strains in Europe and Asia-an Overview ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2 (1): 2-15. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.10.007>.
- Süss, Jochen, Christine Klaus, Friedrich-Wilhelm Gerstengarbe, et Peter C. Werner. 2008. « What Makes Ticks Tick? Climate Change, Ticks, and Tick-Borne Diseases ». *Journal of Travel Medicine* 15 (1): 39-45. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2007.00176.x>.
- Szemiela, Agnieszka M., Andres Merits, Richard J. Orton, Oscar A. MacLean, Rute Maria Pinto, Arthur Wickenhagen, Gauthier Lieber, et al. 2021. « In Vitro Selection of Remdesivir Resistance Suggests Evolutionary Predictability of SARS-CoV-2 ». *PLOS Pathogens* 17 (9): e1009929. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009929>.
- Tan, Ter Yong, Guntur Fibriansah, et Shee-Mei Lok. 2020. « Capsid Protein Is Central to the Birth of Flavivirus Particles ». *PLOS Pathogens* 16 (5): e1008542. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008542>.
- Tao, Kaiming, Philip L. Tzou, Janin Nouhin, Ravindra K. Gupta, Tulio de Oliveira, Sergei L. Kosakovsky Pond, Daniela Fera, et Robert W. Shafer. 2021. « The Biological and Clinical Significance of Emerging SARS-CoV-2 Variants ». *Nature Reviews Genetics* 22 (12): 757-73. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>.
- Tebas, Pablo, ShuPing Yang, Jean D. Boyer, Emma L. Reuschel, Ami Patel, Aaron Christensen-Quick, Viviane M. Andrade, et al. 2021. « Safety and Immunogenicity of INO-4800 DNA Vaccine against SARS-CoV-2: A Preliminary Report of an Open-Label, Phase 1 Clinical Trial ». *EClinicalMedicine* 31 (janvier): 100689. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100689>.
- Tegally, Hourriyah, Eduan Wilkinson, Marta Giovanetti, Arash Iranzadeh, Vagner Fonseca, Jennifer Giandhari, Deelan Doolabh, et al. 2021. « Detection of a SARS-CoV-2 Variant of Concern in South Africa ». *Nature* 592 (7854): 438-43. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>.
- Terpstra, C., G. Wensvoort, et J. M. Pol. 1991. « Experimental Reproduction of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (Mystery Swine Disease) by Infection with Lelystad Virus: Koch's Postulates Fulfilled ». *The Veterinary Quarterly* 13 (3): 131-36. <https://doi.org/10.1080/01652176.1991.9694297>.
- Thi Nhu Thao, Tran, Fabien Labrousseau, Nadine Ebert, Philip V'kovski, Hanspeter Stalder, Jasmine Portmann, Jenna Kelly, et al. 2020. « Rapid Reconstruction of SARS-CoV-2 Using a Synthetic Genomics Platform ». *Nature* 582 (7813): 561-65. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>.
- Tian, Kegong, Xiuling Yu, Tiezhu Zhao, Youjun Feng, Zhen Cao, Chuanbin Wang, Yan Hu, et al. 2007. « Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark ». *PLoS ONE* 2 (6): e526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000526>.
- Torii, Shiho, Chikako Ono, Rigel Suzuki, Yuhei Morioka, Itsuki Anzai, Yuzy Fauzyah, Yusuke Maeda, Wataru Kamitani, Takasuke Fukuhara, et Yoshiharu Matsuura. 2021. « Establishment of a Reverse Genetics System for SARS-CoV-2 Using Circular Polymerase Extension Reaction ». *Cell Reports* 35 (3): 109014. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109014>.
- Touret, Franck, Cécile Baronti, Olivia Goethals, Marnix Van Loock, Xavier de Lamballerie, et Gilles Querat. 2019. « Phylogenetically Based Establishment of a Dengue Virus Panel, Representing All Available Genotypes, as a Tool in Dengue Drug Discovery ». *Antiviral Research* 168 (août): 109-13. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.005>.
- Touret, Franck, Magali Gilles, Karine Barral, Antoine Nougairède, Jacques van Helden, Etienne Decroly, Xavier de Lamballerie, et Bruno Coutard. 2020. « In Vitro Screening of a FDA Approved Chemical Library Reveals Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Replication ». *Scientific Reports* 10 (1): 13093. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70143-6>.
- Touret, Franck, Magali Gilles, Raphaëlle Klitting, Fabien Aubry, Xavier de Lamballerie, et Antoine Nougairède. 2018. « Live Zika virus chimeric vaccine candidate based on a yellow fever 17-D attenuated backbone ». *Emerging Microbes & Infections* 7 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0161-7>.
- Tummino, Tia A., Veronica V. Rezelj, Benoit Fischer, Audrey Fischer, Matthew J. O'Meara, Blandine Monel, Thomas Vallet, et al. 2021. « Drug-Induced Phospholipidosis Confounds Drug Repurposing for SARS-CoV-2 ». *Science (New York, N.Y.)* 373 (6554): 541-47. <https://doi.org/10.1126/science.abi4708>.
- Tumpey, Terrence M., Christopher F. Basler, Patricia V. Aguilar, Hui Zeng, Alicia Solórzano, David E. Swayne, Nancy J. Cox, et al. 2005. « Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus ». *Science* 310 (5745): 77-80. <https://doi.org/10.1126/science.1119392>.
- Van Tongeren, H. A. 1955. « Encephalitis in Austria. IV. Excretion of Virus by Milk of the Experimentally Infected Goat ». *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung* 6 (2-3): 158-62.
- Vaptsarov, I., A. Turpomanov, Z. Spasov, D. Nikov, et M. Dragiev. 1954. « [Recurrent viral meningoencephalitis in southern Bulgaria] ». *Suvremenna Meditsina* 5 (2): 86-103.
- Vennema, H., A. Poland, J. Foley, et N. C. Pedersen. 1998. « Feline Infectious Peritonitis Viruses Arise by Mutation from Endemic Feline Enteric Coronaviruses ». *Virology* 243 (1): 150-57. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9045>.
- V'kovski, Philip, Annika Kratzel, Silvio Steiner, Hanspeter Stalder, et Volker Thiel. 2021. « Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2 ». *Nature Reviews Microbiology* 19 (3): 155-70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- Vogel, Liesbeth, Mariken Van der Lubben, Eddie G. te Lintelo, Cornelis P. J. Bekker, Tamara Geerts, Leontine S. Schuijff, Guy C. M. Grinwis, Herman F. Egberink, et Peter J. M. Rottier. 2010. « Pathogenic Characteristics of Persistent Feline Enteric Coronavirus Infection in Cats ». *Veterinary Research* 41 (5): 71. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010043>.
- Voloch, Carolina M., Ronaldo da Silva Francisco, Luiz G. P. de Almeida, Cynthia C. Cardoso, Otavio J. Brustolini, Alexandra L. Gerber, Ana Paula de C. Guimarães, et al. 2021. « Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Lineage from Rio de Janeiro, Brazil ». *Journal of Virology*, mars, JVI.00119-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00119-21>.
- Walsh, Edward E., Robert W. Frenck, Ann R. Falsey, Nicholas Kitchin, Judith Absalon, Alejandra Gurtman, Stephen Lockhart, et al. 2020. « Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates ». *The New England Journal of Medicine* 383 (25): 2439-50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027906>.
- Wang, Jian-Min, Lin-Fa Wang, et Zheng-Li Shi. 2008. « Construction of a Non-Infectious SARS Coronavirus Replicon for Application in Drug Screening and Analysis of Viral Protein Function ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374 (1): 138-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.129>.

- Wang, Manli, Ruiyuan Cao, Leike Zhang, Xinglou Yang, Jia Liu, Mingyue Xu, Zhengli Shi, Zhihong Hu, Wu Zhong, et Gengfu Xiao. 2020. « Remdesivir and Chloroquine Effectively Inhibit the Recently Emerged Novel Coronavirus (2019-NCoV) in Vitro ». *Cell Research* 30 (3): 269-71. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
- Wege, H., S. Siddell, et V. ter Meulen. 1982. « The Biology and Pathogenesis of Coronaviruses ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 99: 165-200. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-68528-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-68528-6_5).
- « Wehrmedizin ». s. d. Consulté le 22 juin 2022. [https://wmm.pic-mediaserver.de/index.php?f=artikel&a=202108\\_wmm202108\\_S294\\_Lange](https://wmm.pic-mediaserver.de/index.php?f=artikel&a=202108_wmm202108_S294_Lange).
- Wen, Wen, Chen Chen, Jiak Tang, Chunyi Wang, Mengyun Zhou, Yongran Cheng, Xiang Zhou, et al. s. d. « Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis ». *Annals of Medicine* 54 (1): 516-23. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2034936>.
- Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, et F. Wagenaar. 1991. « Mystery Swine Disease in The Netherlands: The Isolation of Lelystad Virus ». *The Veterinary Quarterly* 13 (3): 121-30. <https://doi.org/10.1080/01652176.1991.9694296>.
- Wesley, Ronald D., Roger D. Woods, Howard T. Hill, et Jerome D. Biwer. 1990. « Evidence for a Porcine Respiratory Coronavirus, Antigenically Similar to Transmissible Gastroenteritis Virus, in the United States ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2 (4): 312-17. <https://doi.org/10.1177/104063879000200411>.
- Westgate, James. 2020. « Vet science 'being ignored' in quest for COVID-19 drug ». *Vet Times* (blog). 7 mai 2020. <https://www.vettimes.co.uk/news/vet-science-being-ignored-in-quest-for-covid-19-drug/>.
- Wieczorek-Krohmer, M., F. Weiland, K. Conzelmann, D. Kohl, N. Visser, P. van Woensel, H. J. Thiel, et E. Weiland. 1996. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Monoclonal Antibodies Detect Common Epitopes on Two Viral Proteins of European and U.S. Isolates ». *Veterinary Microbiology* 51 (3-4): 257-66. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(96\)00047-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(96)00047-8).
- Wise, Jacqui. 2020. « Covid-19: New Coronavirus Variant Is Identified in UK ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 371 (décembre): m4857. <https://doi.org/10.1136/bmj.m4857>.
- Wissink, E. H. J., M. V. Kroese, H. a. R. van Wijk, F. a. M. Rijsewijk, J. J. M. Meulenber, et P. J. M. Rottier. 2005. « Envelope Protein Requirements for the Assembly of Infectious Virions of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Journal of Virology* 79 (19): 12495-506. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12495-12506.2005>.
- Wolfe, L. G., et R. A. Griesemer. 1971. « Feline Infectious Peritonitis: Review of Gross and Histopathologic Lesions ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 158 (6): Suppl 2:987+.
- Wu, Qianhui, Matthew Z. Dudley, Xinghui Chen, Xufang Bai, Kaige Dong, Tingyu Zhuang, Daniel Salmon, et Hongjie Yu. 2021. « Evaluation of the Safety Profile of COVID-19 Vaccines: A Rapid Review ». *BMC Medicine* 19 (1): 173. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02059-5>.
- Wu, W. H., Y. Fang, R. Farwell, M. Steffen-Bien, R. R. Rowland, J. Christopher-Hennings, et E. A. Nelson. 2001. « A 10-KDa Structural Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Encoded by ORF2b ». *Virology* 287 (1): 183-91. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1034>.
- Wu, Zhiwei, Yaling Hu, Miao Xu, Zhen Chen, Wanqi Yang, Zhiwei Jiang, Minjie Li, et al. 2021. « Safety, Tolerability, and Immunogenicity of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine (CoronaVac) in Healthy Adults Aged 60 Years and Older: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1/2 Clinical Trial ». *The Lancet. Infectious Diseases* 21 (6): 803-12. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30987-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30987-7).
- Xie, Jiexiong, Ivan Trus, Dayoung Oh, Lise K. Kvisgaard, Julie C. F. Rappe, Nicolas Ruggli, Nathalie Vanderheijden, Lars E. Larsen, François Lefèvre, et Hans J. Nauwynck. 2019. « A Triple Amino Acid Substitution at Position 88/94/95 in Glycoprotein GP2a of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV1) Is Responsible for Adaptation to MARC-145 Cells ». *Viruses* 11 (1): E36. <https://doi.org/10.3390/v11010036>.
- Xie, Xuping, Antonio E. Muruato, Xianwen Zhang, Kumari G. Lokugamage, Camila R. Fontes-Garfias, Jing Zou, Jianying Liu, et al. 2020. « A Nanoluciferase SARS-CoV-2 for Rapid Neutralization Testing and Screening of Anti-Infective Drugs for COVID-19 ». *Nature Communications* 11 (1): 5214. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19055-7>.
- Xie, Xuping, Antonio Muruato, Kumari G. Lokugamage, Krishna Narayanan, Xianwen Zhang, Jing Zou, Jianying Liu, et al. 2020. « An Infectious CDNA Clone of SARS-CoV-2 ». *Cell Host & Microbe* 27 (5): 841-848.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.004>.
- Yin, Zheng, Yen-Liang Chen, Wouter Schul, Qing-Yin Wang, Feng Gu, Jeyaraj Duraiswamy, Ravinder Reddy Kondreddi, et al. 2009. « An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (48): 20435-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907010106>.
- Yount, Boyd, Kristopher M. Curtis, Elizabeth A. Fritz, Lisa E. Hensley, Peter B. Jahrling, Erik Prentice, Mark R. Denison, Thomas W. Geisbert, et Ralph S. Baric. 2003. « Reverse Genetics with a Full-Length Infectious CDNA of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (22): 12995-0. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735582100>.
- Yount, Boyd, Rhonda S. Roberts, Amy C. Sims, Damon Deming, Matthew B. Frieman, Jennifer Sparks, Mark R. Denison, Nancy Davis, et Ralph S. Baric. 2005. « Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Group-Specific Open Reading Frames Encode Nonessential Functions for Replication in Cell Cultures and Mice ». *Journal of Virology* 79 (23): 14909-22. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14909-14922.2005>.
- Yu, I-Mei, Michael L. Oldham, Jingqiang Zhang, et Jue Chen. 2006. « Crystal Structure of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein Dimerization Domain Reveals Evolutionary Linkage between Corona- and Arteriviridae ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (25): 17134-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602107200>.
- Zhang, Sarah. 2020. « A Much-Hyped COVID-19 Drug Is Almost Identical to a Black-Market Cat Cure ». *The Atlantic*. 8 mai 2020. <https://www.theatlantic.com/science/archive/2020/05/remdesivir-cats/611341/>.
- Zhang, Xiaowei, Zhenhua Zheng, Xijuan Liu, Bo Shu, Panyong Mao, Bingke Bai, Qinxue Hu, et al. 2016. « Tick-borne encephalitis virus induces chemokine RANTES expression via activation of IRF-3 pathway ». *Journal of Neuroinflammation* 13 (1): 209. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0665-9>.
- Zhang, Xingcui, Renyong Jia, Haoyue Shen, Mingshu Wang, Zhongqiong Yin, et Anchun Cheng. 2017. « Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections ». *Viruses* 9 (11): 338. <https://doi.org/10.3390/v9110338>.
- Zhao, Rong, Meiyue Wang, Jing Cao, Jing Shen, Xin Zhou, Deping Wang, et Jimin Cao. 2021. « Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development ». *Life* 11 (7): 615. <https://doi.org/10.3390/life11070615>.
- Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, et al. 2020. « A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 ». *The New England Journal of Medicine* 382 (8): 727-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
- Zimmerman, Jeffrey J., Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Gregory W. Stevenson, et Kent J. Schwartz. 2012. *Diseases of swine*. John Wiley & Sons.

## Annexe :

### Annexe 1 :

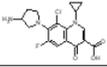
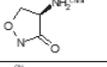
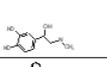
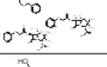
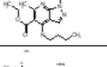
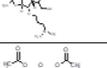
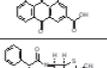
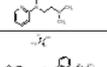
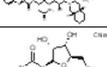
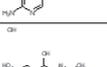
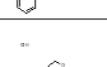
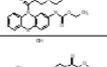
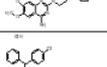
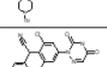
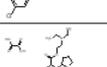
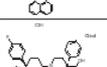
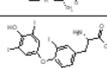
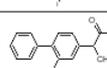
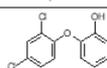
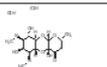
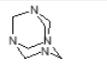
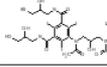
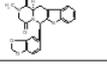
Titres d'anticorps neutralisants (nAb) utilisant les souches ISA D614 et D614 SARS-CoV-2 mCherry. 24 sérums humains ont été dilués deux fois et incubés avec les souches ISA D614 et D614 mCherry. Les titres de nAb ont été enregistrés 5 jours après l'infection. Les titres ont été définis comme la dilution la plus élevée qui a inhibé la production d'ECP distinct avec l'ISA D614 SARS-CoV-2 ou la fluorescence avec le D614 SARS-CoV-2 mCherry fluorescent.

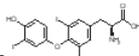
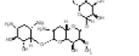
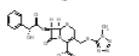
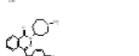
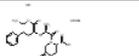
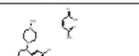
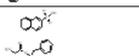
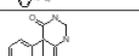
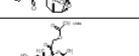
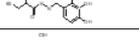
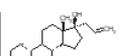
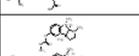
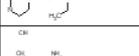
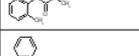
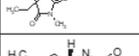
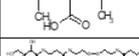
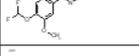
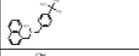
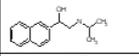
Sera n°	nAb titers	
	ISA D614 strain	mCherry D614 strain
1	40	20
2	40	40
3	40	40
4	40	40
5	40	80
6	40	80
7	40	80
8	40	80
9	80	80
10	80	80
11	80	80
12	80	80
13	80	80
14	80	80
15	80	80
16	160	160
17	160	160
18	160	160
19	≤10	≤10
20	≤10	≤10
21	≤10	≤10
22	≤10	≤10
23	≤10	≤10
24	≤10	≤10

## Annexe 2 :

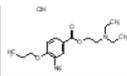
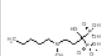
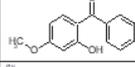
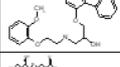
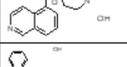
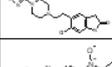
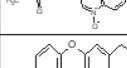
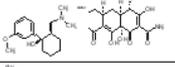
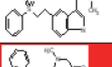
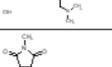
Tableau des molécules « hits » obtenues lors du criblage de la librairie la Prestwick Chemical Library

Plate Number / Position Number	Prestw number	Chemical name	Structure	Broad Therapeutic class	Reported therapeutic effect	Inhibition Index
14E02	Prestw-1081	(S)-(-)-Propranolol hydrochloride		Cardiovascular	'Antianginal 'Antiarrhythmic 'Antihypertensive 'Antineoplastic	1,25038394
14G04	Prestw-1202	4-aminosalicylic acid		Infectiology 'Metabolism	Antibacterial 'Antifungal	1,22147841
14E06	Prestw-1493	Topiramate		Central Nervous System	Anticonvulsant 'Antimigraine	1,2120147
14E04	Prestw-1294	Isosorbide mononitrate		Cardiovascular	Antianginal	1,16688685
15E09	Prestw-1378	Clarithromycin		Infectiology	Antibacterial	1,14988115
13D06	Prestw-995	Fluvoxamine maleate		Central Nervous System	Antidepressant 'CNS Stimulant	1,13979643
14D06	Prestw-1075	(R) Propranolol hydrochloride		Cardiovascular	'Antianginal 'Antiarrhythmic 'Antihypertensive 'Antimigraine	1,13487013
15H03	Prestw-1446	Moxifloxacin		Infectiology	Antibacterial	1,12897743
13B04	Prestw-973	Pirlindole mesylate		Central Nervous System	Antidepressant	1,12713096
11D07	Prestw-836	Indoprofen		Central Nervous System 'Metabolism	Analgesic 'Anti-inflammatory	1,12496194
13D02	Prestw-991	Gliquidone		Endocrinology	Antidiabetic	1,12425552
15A05	Prestw-1345	Subbactam		Infectiology	Antibacterial	1,12082388
15C10	Prestw-1356	Vardenafil		Cardiovascular	Erectile dysfunction treatment	1,12051532
13A10	Prestw-1514	Darifenacin hydrobromide		Neuromuscular	Anti-incontinence	1,11956598
11D11	Prestw-840	Ethopropazine hydrochloride		Central Nervous System	Antiparkinsonian 'Antifungal	1,11621743
15H08	Prestw-1334	Rivastigmine		Central Nervous System		1,11356803
11E05	Prestw-844	Procyclidine hydrochloride		Central Nervous System	Antiparkinsonian 'Muscle relaxant	1,11051319
09G10	Prestw-709	Trioxsalen		Dermatology		1,1080282
11D06	Prestw-1800	Zolmitriptan		Central Nervous System		1,10689948
13H07	Prestw-1036	Alcuronium chloride		Neuromuscular	Muscle relaxant	1,10321325
14G05	Prestw-1104	Clonixin lysinate		Central Nervous System 'Infectiology	Analgesic 'Antifungal	1,10302193
14D05	Prestw-1074	Cyproterone acetate		Endocrinology	Antineoplastic 'Contraceptive	1,09641256
11B09	Prestw-818	Nadolol		Cardiovascular	'Antianginal 'Antihypertensive	1,09558411
13G10	Prestw-1029	Risperidone		Central Nervous System	Antipsychotic	1,09438481

11E10	Prestw-1379	Clinafloxacin		Infectiology	Antibacterial	1,08989824
14E07	Prestw-1086	D-cycloserine		Infectiology	Antibacterial	1,08741952
15G06	Prestw-1480	Racipinephrine hydrochloride		Cardiovascular 'Respiratory	Bronchodilator Vasoconstrictor	1,08707026
13G09	Prestw-1028	Benzathine benzylpenicillin		Metabolism	Antibacterial	1,085062
11B06	Prestw-815	Fosfosal		Central Nervous System	Analgesic	1,08272404
13B07	Prestw-976	Tracazolate hydrochloride		Central Nervous System	Anticonvulsant 'Sedative	1,08228374
11E06	Prestw-845	Amiprilose hydrochloride		Immunology	Immunomodulator	1,08155593
12A10	Prestw-1167	Diacerein		Immunology	Antiarthritic	1,08096949
13E10	Prestw-1009	Pivampicillin		Metabolism	Antibacterial	1,07926657
11A08	Prestw-807	Chloropyramine hydrochloride		Allergology	Antihistaminic	1,07648317
14H05	Prestw-1114	Saquinavir mesylate		Immunology	Antiviral	1,07513719
11G07	Prestw-866	Azacytidine-5		Oncology	Antineoplastic	1,07336652
13F08	Prestw-1017	Etilefrine hydrochloride		Cardiovascular	Vasoconstrictor	1,07202317
14B02	Prestw-1051	Moricizine hydrochloride		Cardiovascular	Antiarrhythmic	1,07023589
12G08	Prestw-947	Prazosin hydrochloride		Cardiovascular	Antihypertensive	1,06990121
09G07	Prestw-706	Chlorcyclizine hydrochloride		Allergology 'Central Nervous System	Antiemetic 'Antihistaminic 'Sedative	1,0688994
15B11	Prestw-1394	Diclazuril		Infectiology	Antiparasitic	1,06437498
05F08	Prestw-377	Nafroyl oxalate		Cardiovascular 'Neuromuscular	Anti-ischemic 'Antispastic 'Vasodilator	1,06343129
13H10	Prestw-1039	Levocabastine hydrochloride		Allergology	Antihistaminic	1,06265718
06A04	Prestw-403	(L) Thyroxine		Endocrinology 'Metabolism	Antihypothyroid 'Antilipemic 'Hypocholesterolemic 'Lipid-lowering	1,06074244
12D08	Prestw-917	Flurbiprofen		Central Nervous System 'Metabolism	Analgesic 'Anti-inflammatory	1,05967624
15D06	Prestw-1479	Triclosan		Infectiology	Antibacterial 'Antiseptic 'Antifungal	1,05879913
11A05	Prestw-804	Spectinomycin dihydrochloride		Metabolism	Antibacterial	1,05604809
15B09	Prestw-1282	Methenamine		Infectiology	Antibacterial	1,05562774
11E09	Prestw-848	Iodixanol		Diagnostic	Contrastant	1,05552967
09E04	Prestw-1833	Tadalafil		Cardiovascular	Erectile dysfunction treatment	1,05541933

11F04	Prestw-853	Liothyronine		Endocrinology		1,05504502
13E06	Prestw-1005	Apramycin		Metabolism	Antibacterial	1,05496455
17B04	Prestw-747	Cefamandole sodium salt		Infectiology	Antibacterial	1,05493549
08C10	Prestw-1130	Azelastine hydrochloride		Immunology	Antihistaminic	1,05427541
12E08	Prestw-927	Quinapril hydrochloride		Cardiovascular	Antihypertensive	1,05068949
11F11	Prestw-1836	Octodolhepin maleate salt		Central Nervous System	Antipsychotic	1,04983582
14B05	Prestw-1054	Levopropoxyphene napsylate		Central Nervous System 'Respiratory	Analgesic 'Antitussive	1,04866949
12F04	Prestw-933	Primidone		Central Nervous System	Anticonvulsant	1,04834594
11H08	Prestw-877	Scopolamine hydrochloride		Central Nervous System	Antiemetic	1,04804567
11B08	Prestw-1509	Deflazacort		Immunology 'Metabolism	Anti-inflammatory 'Immunosuppressant	1,04772762
12G11	Prestw-1279	Stavudine		Infectiology	Antiviral	1,04737139
12F09	Prestw-938	Benserazide hydrochloride		Central Nervous System	Antiparkinsonian	1,04707675
08B02	Prestw-571	Tetracaine hydrochloride		Neuromuscular		1,04649414
17H07	Prestw-1921	Allylestrenol		Endocrinology	Progestogen	1,04649341
17D04	Prestw-1857	Oxiglutatione		Ophthalmology	Antidote	1,04639884
08A07	Prestw-566	Eserine hemisulfate salt		Central Nervous System	Antiglaucoma	1,0454409
13D04	Prestw-993	Ribavirin		Metabolism	Antiviral	1,04520816
15D07	Prestw-1401	Enoxacin		Infectiology	Antibacterial	1,04455907
13G08	Prestw-1027	Tocainide hydrochloride		Cardiovascular 'Central Nervous System	Anesthetic 'Antiarrhythmic	1,04395422
14G09	Prestw-1108	Mephentoin		Central Nervous System	Anticonvulsant	1,04368905
12B07	Prestw-896	N-Acetyl-L-leucine		Central Nervous System	Antivertigo	1,04343146
17E10	Prestw-1887	Pantethine		Cardiovascular	Antilipemic	1,04303351
13B08	Prestw-977	Zardaverine		Respiratory	Bronchodilator	1,04296395
08E05	Prestw-1252	Butenafine hydrochloride		Infectiology 'Metabolism	Antifungal	1,04213236
13B05	Prestw-974	Pronethalol hydrochloride		Cardiovascular	Antianginal 'Antiarrhythmic 'Antihypertensive	1,04084178
13A03	Prestw-1259	Canrenone		Endocrinology	Diuretic	1,04037993

18B03	Prestw-1941	Dalfampridine		Neuromuscular	Neuroprotectant	1,03939316
12D09	Prestw-918	Nimodipine		Cardiovascular	Vasodilator 'Antibacterial	1,03821084
15A08	Prestw-1482	Valproic acid		Central Nervous System	Anticonvulsant	1,03723443
08E08	Prestw-1818	Tirofiban hydrochloride		Hematology	Antiplatelet	1,03577068
16F05	Prestw-1700	Histamine dihydrochloride		Oncology 'Neuromuscular	Antineoplastic 'Analgesic	1,03524239
12H02	Prestw-951	Crotamiton		Dermatology	Antipruritic	1,0352089
09F05	Prestw-694	Sulfamerazine		Infectiology	Antibacterial	1,03492324
08B08	Prestw-1271	Escitalopram oxalate		Central Nervous System	Antidepressant	1,03288052
16F06	Prestw-1734	Rasagiline		Central Nervous System	Antiparkinsonian	1,03277003
14E05	Prestw-1516	Levalbuterol hydrochloride		Respiratory	Antiasthmatic 'Bronchodilator	1,03240341
15F07	Prestw-1236	Benzotropine mesylate		Central Nervous System	Antiparkinsonian	1,03214262
13E08	Prestw-1007	Fursultiamine hydrochloride		Metabolism	Anti-Alzheimer	1,03161299
17E06	Prestw-1877	Tolperisone hydrochloride		Central Nervous System	Muscle relaxant	1,03097115
08B06	Prestw-1351	Tenatoprazole		Metabolism	Antiulcer	1,02843018
08D11	Prestw-1367	Zopiclone		Central Nervous System	Hypnotic 'Sedative	1,02720124
08F05	Prestw-1177	Carbidopa		Central Nervous System	Antiparkinsonian	1,02419705
17C07	Prestw-1843	Quinine ethyl carbonate		Infectiology 'Neuromuscular	Antimalarial 'Muscle relaxant	1,02395324
12A03	Prestw-882	Bemegride		Central Nervous System	CNS stimulant	1,02309444
17D02	Prestw-1853	Efaroxan hydrochloride		Metabolism 'Central Nervous System	Antidiabetic 'Antidepressant	1,0220578
14D08	Prestw-1420	Formestane		Endocrinology	Antineoplastic	1,02153682
10F04	Prestw-773	(D-) Norgestrel		Endocrinology	Contraceptive	1,02122898
09B04	Prestw-653	Mepenzolate bromide		Neuromuscular	Antispastic 'Antiulcer	1,02040208
09E03	Prestw-1340	Secnidazole		Infectiology	Antiamoebic	1,01911839
16D11	Prestw-1776	Phenprobamate		Central Nervous System 'Neuromuscular	Muscle relaxant 'Sedative 'Anticonvulsant 'Anxiolytic	1,01854882
17C06	Prestw-1481	Cyclophosphamide		Immunology 'Oncology	Antineoplastic 'Immunosuppressant	1,01854581
13F03	Prestw-1012	Trapidil		Cardiovascular	Vasodilator	1,01841401

12H10	Prestw-959	Proparacaine hydrochloride		Central Nervous System	Anesthetic	1,01784928
15B06	Prestw-1476	Amcinonide		Metabolism	Anti-inflammatory	1,01776849
09D10	Prestw-1285	Ibandronate sodium		Metabolism	Antiosteoporetic	1,0174337
08H09	Prestw-1392	Dexfenfluramine hydrochloride		Central Nervous System	Anorectic	1,01638663
09F04	Prestw-693	Promazine hydrochloride		Central Nervous System	Antipsychotic	1,01624754
12A08	Prestw-887	Oxybenzone		Dermatology	UV protectant	1,01604937
11C09	Prestw-1361	Viloxazine hydrochloride		Central Nervous System	Antidepressant	1,01486539
15B08	Prestw-1262	Carvedilol		Cardiovascular	Antihypertensive	1,01434277
19G05	Prestw-1980	Hopantenate calcium		Central Nervous System	Anticonvulsant 'CNS Stimulant	1,01415413
18C06	Prestw-1963	Fasudil Hydrochloride		Cardiovascular	Vasodilator	1,01225935
08A02	Prestw-1188	Ziprasidone hydrochloride		Central Nervous System	Antipsychotic	1,01175222
08E06	Prestw-1121	Carbadox		Infectiology	Antibacterial	1,01127909
19E06	Prestw-2057	Crisaborole		Dermatology	Anti-inflammatory 'Antipruritic	1,01060319
09E08	Prestw-1465	Tramadol hydrochloride		Central Nervous System	Analgesic	1,00870703
18B11	Prestw-1956	Tiamide Hydrochloride		Central Nervous System 'Metabolism 'Respiratory	Anti-inflammatory 'Analgesic 'Bronchodilator	1,00625381
14C04	Prestw-1063	Naftifine hydrochloride		Infectiology 'Metabolism	Antifungal	1,00585471
13A09	Prestw-968	Decamethonium bromide		Neuromuscular	Muscle relaxant	1,00549141
19A03	Prestw-2045	Eletriptan		Central Nervous System	Antimigraine	1,00485182
16F08	Prestw-1756	Lofepamine		Central Nervous System	Antidepressant 'Anxiolytic 'Sedative	1,00269842
16A05	Prestw-1739	Nevirapine		Infectiology	Antiviral	1,00245385
15D08	Prestw-1307	Olopatadine hydrochloride		Allergology	Antihistaminic	1,00217311
14C02	Prestw-1061	Phensuximide		Central Nervous System	Anticonvulsant	1,00187565
16D09	Prestw-1705	Diatrizoic acid dihydrate		Diagnostic	Contrastant	1,001572
12A09	Prestw-888	Promethazine hydrochloride		Allergology 'Central Nervous System	Antihistaminic 'Sedative	1,00052665

## Annexe 3 :

DOI: [10.1016/j.csbj.2021.08.040](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.040)

Computational and Structural Biotechnology Journal 19 (2021) 5108–5116



journal homepage: [www.elsevier.com/locate/csbj](http://www.elsevier.com/locate/csbj)



# Rapid reconstruction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using synthetic DNA fragments



Julien Mélade<sup>a,\*</sup>, Géraldine Piorkowski<sup>a</sup>, Hawa Sophia Bouzidi<sup>a,b</sup>, Alain Medawar<sup>b</sup>, Claudine Raffy<sup>b</sup>, Xavier de Lamballerie<sup>a</sup>, Antoine Nougairède<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ-IRD 190-Inserm 1207), Marseille, France

<sup>b</sup> VIRBAC, 1e Avenue, 13ème rue, LID, BP27 - 06511 Carros, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 24 May 2021

Received in revised form 25 August 2021

Accepted 26 August 2021

Available online 01 September 2021

### Keywords:

PRRSV

Reverse genetics

synthetic DNA fragments

ISA

## ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is one of the most challenging infectious disease of pig populations causing devastating economic loss to swine industry. Reverse genetics allow to engineer modified viruses such attenuated strains for vaccine development. Some reverse genetic systems were described for PRRSVs but, due to genome complexity of PRRSVs, construction and modification of such systems remain laborious and time-consuming.

In this study, we described a reverse genetics approach based on the “Infectious-Subgenomic Amplicons” (ISA) method to rescue infectious PRRSV particles. Permissive cells were transfected with 4 overlapping synthetic DNA fragments covering the entire genome of PRRSV which allowed the rapid reconstruction of the complete virus genome and the subsequent generation of infectious wild-type particles within days.

The ISA method represent a rapid alternative of conventional reverse genetic systems. This method will help to generate genetically modified and attenuated strains for the development of sanitary countermeasures in the future.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Research Network of Computational and Structural Biotechnology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is an enveloped, positive-stranded RNA virus (Order: *Nidovirales*; Family: *Arteriviridae*) which belongs to *Betaarterivirus suid 1* and *Betaarterivirus suid 2*, formerly European and North-American genotypes respectively [14,31,41,53]. PRRSV genome length is around 15 kb and consists of at least 10 open reading frames (ORFs): ORF1a/ORF1ab, occupy approximately the three-quarters of the genome and encodes for several non-structural proteins (nsp) followed by ORF2a/ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5/ORF5a, ORF6 and ORF7 [27]. ORF1a and ORF1ab polypeptides are involved in RNA replication, ORF2a/2b encodes for glycoprotein 2 (GP2) and envelope protein (E), ORF3 for GP3 ORF4 for GP4 which all together are involved in virus's entry [9]. ORF5/ORF5a encodes for GP5 and GP5a [37], ORF6 codes for the membrane (M), and ORF7 for the nucleocapsid protein (N) [20].

PRRSV is the causative agent of porcine reproductive and respiratory syndrome in swine populations. Infection leads to reproductive failure in sows and severe respiratory disease in newborn and growing pigs. PRRSV continuously struggle the global swine industry by causing devastating economic losses, of approximately \$664 million per year in the United States [32] and the emergence of genetically divergent strains in Asia has led to highly pathogenic PRRSVs (HP-PRRSVs) [45,2]. Vaccines against PRRSV exist and confer protection from the disease [36], however, vaccination remains a challenge, considering the high antigenic heterogeneity of current circulating viral strains [23]. Indeed, the efficacy of licensed vaccines to protect against both genotypes of PRRSV is still unclear [17,38,39,41].

Reverse genetics allow the engineering of wild-type and genetically modified viruses and has greatly help to elucidate the viral biological properties and engineer attenuated strains of RNA viruses for vaccination strategies [43]. In the case of PRRSV, rescue of infectious viruses may be obtained through DNA-based or RNA-based strategies: in the first approach, viruses can be rescued by the direct transfection of a full-length cDNA clone under the control of the human cytomegalovirus promoter (pCMV) [24,18,33,44]; in the

\* Corresponding author at: Faculté de Médecine de Marseille 27, Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France.

E-mail address: [julien.melade@univ-amu.fr](mailto:julien.melade@univ-amu.fr) (J. Mélade).

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.040>

2001-0370/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Research Network of Computational and Structural Biotechnology.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Report

EMBO  
reports

# A simple reverse genetics method to generate recombinant coronaviruses

Julien Mélade<sup>\*</sup> , Géraldine Piorkowski, Franck Touret , Toscane Fourié , Jean-Sélim Driouich, Maxime Cochin , Hawa Sophia Bouzidi, Bruno Coutard, Antoine Nougaière & Xavier de Lamballerie

## Abstract

Engineering recombinant viruses is a pre-eminent tool for deciphering the biology of emerging viral pathogens such as the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). However, the large size of coronavirus genomes renders the current reverse genetics methods challenging. Here, we describe a simple method based on "infectious subgenomic amplicons" (ISA) technology to generate recombinant infectious coronaviruses with no need for reconstruction of the complete genomic cDNA and apply this method to SARS-CoV-2 and also to the feline enteric coronavirus. In both cases we rescue wild-type viruses with biological characteristics similar to original strains. Specific mutations and fluorescent red reporter genes can be readily incorporated into the SARS-CoV-2 genome enabling the generation of a genomic variants and fluorescent reporter strains for *in vivo* experiments, serological diagnosis, and antiviral assays. The swiftness and simplicity of the ISA method has the potential to facilitate the advance of coronavirus reverse genetics studies, to explore the molecular biological properties of the SARS-CoV-2 variants, and to accelerate the development of effective therapeutic reagents.

**Keywords** antivirals; *in vivo* experiment; reverse genetics; SARS-CoV-2; serology

**Subject Categories** Methods & Resources; Microbiology, Virology & Host Pathogen Interaction

DOI 10.15252/embr.202153820 | Received 17 August 2021 | Revised 2 February 2022 | Accepted 8 February 2022 | Published online 3 March 2022

EMBO Reports (2022) 23: e53820

## Introduction

The order *Nidovirales* represents a large group of single-stranded positive-sense RNA viruses ((+) ssRNA) characterized by the size of their genomes, which are the largest (~30 kilobases) among the RNA viruses (Gorbalenya *et al.*, 2006). This order is subdivided into nine suborders including *Comidovirineae* in which is found the *Coronaviridae* family. Coronaviruses (CoVs) can infect a wide range of hosts including humans, domestic, and wild animals (Masters, 2006).

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2; genus: *Betacoronavirus*) which emerged in 2019 in Wuhan (Zhu *et al.*, 2020), is responsible for COVID-19, a human disease that, in a proportion of patients, has been associated with severe pneumonia leading to respiratory distress and in many cases to death (Zhou *et al.*, 2020). SARS-CoV-2 has spread worldwide with more than 67 million people being infected by the end of 2020. During the course of the pandemic, a European variant carrying an amino acid change in the spike protein (D614G) rapidly dispersed worldwide and became the most prevalent and dominant pandemic strain (Korber *et al.*, 2020). Later in 2020, other variants were detected in Denmark (Kmec, 2020), South East England (Wise, 2020), Brazil (Voloch *et al.*, 2020), and South Africa (Tegally *et al.*, 2020). The emergence of these variants raised questions concerning the possibility of viral escape from the immune response induced following either primary infection, vaccination, or therapeutics applied as convalescent plasma (Weisblum *et al.*, 2020). The ongoing emergence of variants, their circulation, and the genetic diversity observed in CoV populations highlight the need for convenient molecular tools to study viral evolution, replication, and pathogenesis and to enable the development of appropriate health control countermeasures.

Reverse genetic methods enable the engineering of wild-type or genetically modified CoVs and thus can contribute to deciphering biological properties of human or animal viruses (Almazán *et al.*, 2014; Stobart & Moore, 2014). In addition, they can be used to expedite antiviral screening for the selection and characterization of small antiviral molecules or therapeutic antibodies (Yang *et al.*, 2014). In the case of CoVs, rescue of infectious viruses can be achieved by the transfection of infectious cDNA using vaccinia virus vectors or bacterial artificial chromosomes (Almazán *et al.*, 2000; Yount *et al.*, 2000; Almazán *et al.*, 2014; Thiel *et al.*, 2017; Rihn *et al.*, 2021). Alternatively, *in vitro* or "in-yeast" viral genome assembly followed by *in vitro* RNA production can lead to rescued viruses by transfection of full-length cDNA in cells (Thi Nhu Thao *et al.*, 2020; Xie *et al.*, 2020a). Due to the complexity and large size of CoV genomes, the assembly and modification of full-length genomic RNA remains laborious, technically difficult to reproduce and time-consuming (e.g., toxicity of clones, difficulty in constructing precise full-length 30-kb RNA transcripts *in vitro*).

The Infectious Subgenomic Amplicons (ISA) method is a simple and rapid bacteria-free method that has been developed in recent

Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ-IRD 190-Inserm 1207), Marseille, France  
\*Corresponding author. Tel: +33 04 13 79 21 51; E-mail: julien.melade@univ-amu.fr



OPEN

# In vitro evaluation of therapeutic antibodies against a SARS-CoV-2 Omicron B.1.1.529 isolate

Franck Touret<sup>✉</sup>, Cécile Baronti, Hawa Sophia Bouzidi & Xavier de Lamballerie

The emergence and rapid spread of the Omicron variant of SARS-CoV-2, which has more than 30 substitutions in the spike glycoprotein, compromises the efficacy of currently available vaccines and therapeutic antibodies. Using a clinical strain of the Omicron variant, we analyzed the neutralizing power of eight currently used monoclonal antibodies compared to the ancestral B.1 BavPat1 D614G strain. We observed that six of these antibodies have lost their ability to neutralize the Omicron variant. Of the antibodies still having neutralizing activity, Sotrovimab/Vir-7831 shows the smallest reduction in activity, with a factor change of 3.1. Cilgavimab/AZD1061 alone shows a reduction in efficacy of 15.8, resulting in a significant loss of activity for the Evusheld cocktail (42.6-fold reduction) in which the other antibody, Tixagevimab, does not retain significant activity against Omicron. Our results suggest that the clinical efficacy of the initially proposed doses should be rapidly evaluated and the possible need to modify doses or propose combination therapies should be considered.

Since the emergence of the SARS-CoV-2 coronavirus in China in late 2019, the virus has spread worldwide, causing a major pandemic. The epidemic spread has been supported by the appearance of variants that combine increased transmissibility<sup>1,2</sup> and antigenic escape to varying degrees<sup>3,4</sup>. At the time of writing, we are witnessing the rapid replacement of the delta variant by a new variant, Omicron, which has a higher transmission capacity than all the previous variants, but also has substantial antigenic changes. Omicron has been first characterised in South Africa<sup>5</sup> and exhibits the highest number of genomic mutations reported so far, especially in the spike glycoprotein where over 30 substitutions are present<sup>6</sup>. Such changes in the most important antigen of the virus, against which the neutralising humoral response is built, have the potential to significantly reduce the efficacy of both vaccines and therapeutic antibodies currently in clinical use<sup>7,8</sup>, as most of them were designed from the spike protein of the original SARS-CoV-2 strain<sup>9–12</sup>.

## Results and discussion

In the current study, we tested the neutralising activity of a panel of COVID-19 therapeutic antibodies against a clinical strain of the Omicron variant. The panel consists of therapeutic antibodies that are in clinical trials or currently in use. All of them target the spike RBD<sup>13–15</sup>. More precisely, inside the RBD, Sotrovimab is targeting the core region<sup>13</sup> and Bamlanivimab as well as Imdevimab are targeting the RBM<sup>13</sup>. Within this panel, all antibodies retained neutralizing activity against the previous emerging variants (Alpha, Beta, Gamma and Delta)<sup>4,16</sup> except Bamlanivimab<sup>4,16</sup> that lost its activity against Beta, Gamma and Delta, and Etesevimab<sup>16</sup> against Beta and Gamma. The ancestral D614G BavPat1 European strain (B.1 lineage) was used as a reference to calculate the fold change between the EC<sub>50</sub>s determined for each virus. To do this, we applied a standardised methodology for evaluating antiviral compounds against RNA viruses, based on RNA yield reduction<sup>17–19</sup>, which has been recently applied to SARS-CoV-2<sup>20–22</sup>. The assay was performed in VeroE6 TMPRSS2 cells and calibrated in such a way that the cell culture supernatants were harvested (at 48 h post infection) during the logarithmic growth phase of viral replication. The antibodies were tested in triplicate using twofold step-dilutions from 1000 to 0.97 ng/mL and from 5000 to 2.4 ng/mL for Cilgavimab and Tixagevimab alone and in combination. The amount of viral RNA in the supernatant medium was quantified by qRT-PCR to determine the 50% maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>). Results were then compared with recent preliminary reports exploring the ability of the Omicron variant to escape neutralization by monoclonal antibodies.

We first observed a complete loss of detectable neutralizing activity for Castrovimab and Imdevimab (Roche-Regeneron), Bamlanivimab and Etesevimab (Eli-Lilly) and Regdanvimab (Celtrion) under our test conditions (Fig. 1), which made it impossible to calculate EC<sub>50</sub> (Table 1). This result is in line with previous EC<sub>50</sub>

Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille University-IRD 190-Inserm 1207), Marseille, France. ✉email: [franck.touret@univ-amu.fr](mailto:franck.touret@univ-amu.fr)



**LA GENETIQUE INVERSE APPLIQUEE AU DEVELOPPEMENT D'OUTILS  
THERAPEUTIQUES CONTRE LES VIRUS EMERGENTS**

BOUZIDI Hawa Sophia  
13 Décembre 2022

**RESUME**

Dans le contexte actuel, où l'émergence et la réémergence de pathogènes viraux ne cessent de croître et constituent un problème majeur de santé publique, le développement de nouveaux outils thérapeutiques est indispensable. L'ingénierie des virus recombinants est un outil prééminent pour déchiffrer la biologie des agents pathogènes viraux émergents tels que les Coronavirus, les Artérovirus ou encore les Flavivirus. Cependant, la grande taille et la complexité des génomes de certains de ces virus rendent les méthodes actuelles de génétique inverse difficiles. Ici, nous décrivons une méthode simple basée sur la technologie des « amplicons sous-génomiques infectieux » (ISA) pour générer des virus infectieux recombinants, ceci sans avoir besoin de reconstruction de l'ADNc génomique complet ni de clonage. Cette technique a été appliquée avec succès aux virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (PRRSV), du coronavirus entérique félin (FeCoV), du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2) et de l'encéphalite à tiques (TBEV).

Nous avons réussi à obtenir des virus recombinants « sauvages » avec des caractéristiques biologiques similaires aux souches d'origine pour l'ensemble de ces virus. Également, des mutations spécifiques et des gènes rapporteurs rouges fluorescents (mCherry) ont été incorporés dans le génome du SARS-CoV-2 et du TBEV permettant leur utilisation dans différents domaines de la virologie. En effet, les souches virales générées *de novo* ont pu être utilisées avec des essais de séroneutralisation ainsi que pour des tests de molécules antivirales.

La rapidité et la simplicité de la méthode ISA a le potentiel d'accroître la génération de virus par génétique inverse, afin d'explorer les propriétés biologiques des virus et d'accélérer le développement de composés thérapeutiques efficaces. Cette méthode polyvalente, permettrait aussi de générer des souches génétiquement modifiées et atténuées pour le développement éventuel de candidats vaccins.

**MOTS-CLÉS** : Génétique inverse, fragments d'ADN synthétiques, ISA, antiviraux, Coronavirus, Flavivirus, Arterivirus.