

RESULTATS

I. Bilan des constructions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II. Détermination de la virulence *in vitro*

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

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

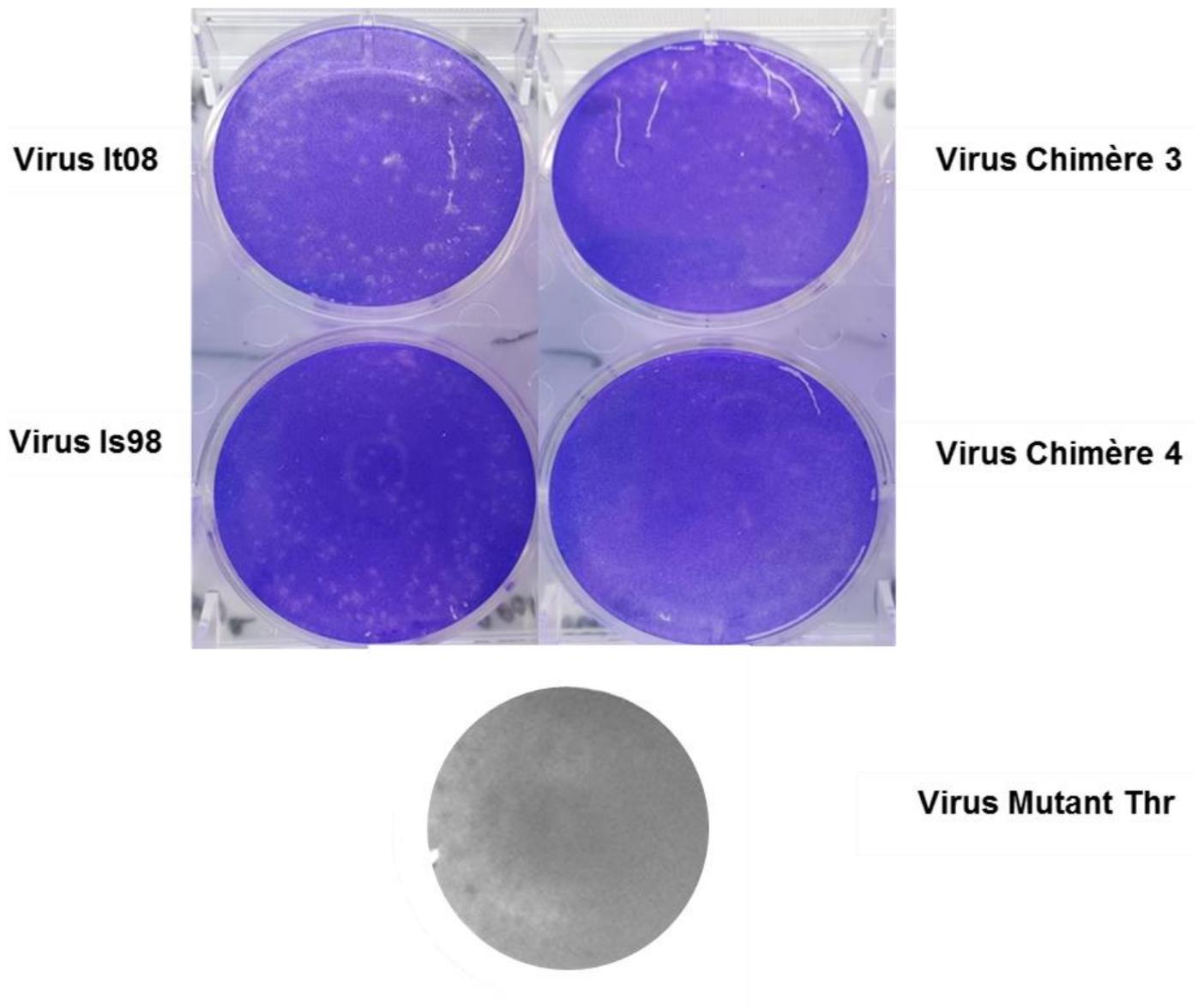


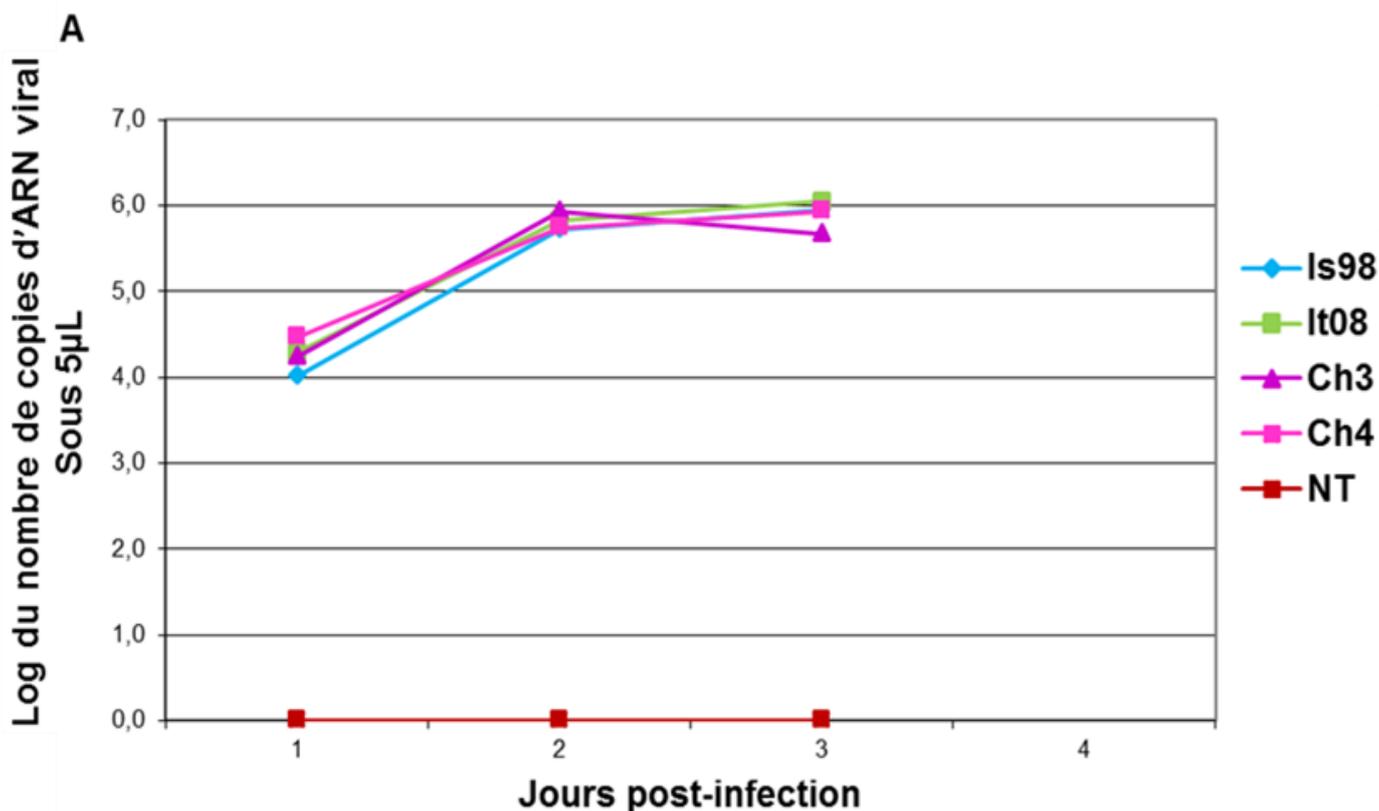
Figure 24 : Observation des plages de lyse obtenues 3 jours post infection de cellules VERO avec les différentes productions virales à 100 PFU par puits (ces résultats sont représentatifs de 2 essais indépendants).

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

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

b. Cinétiques d'infection

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



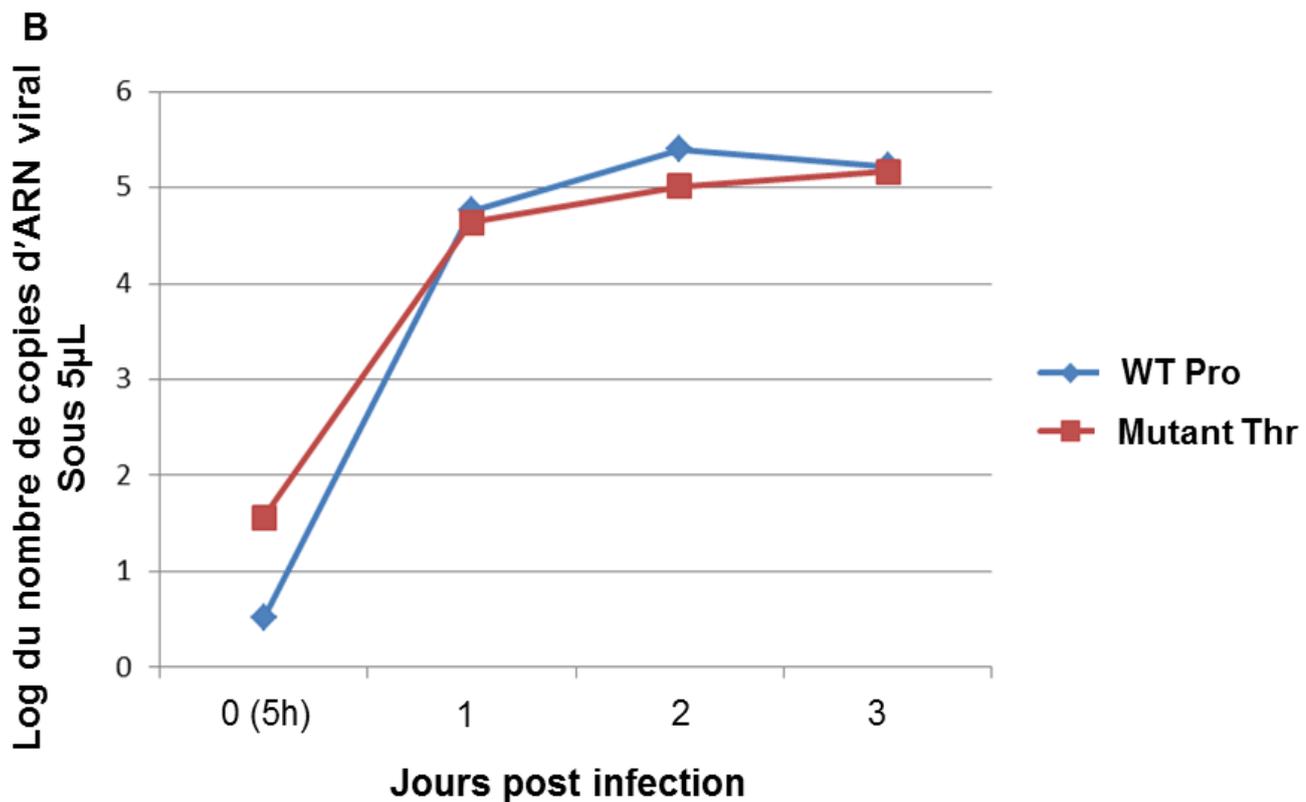
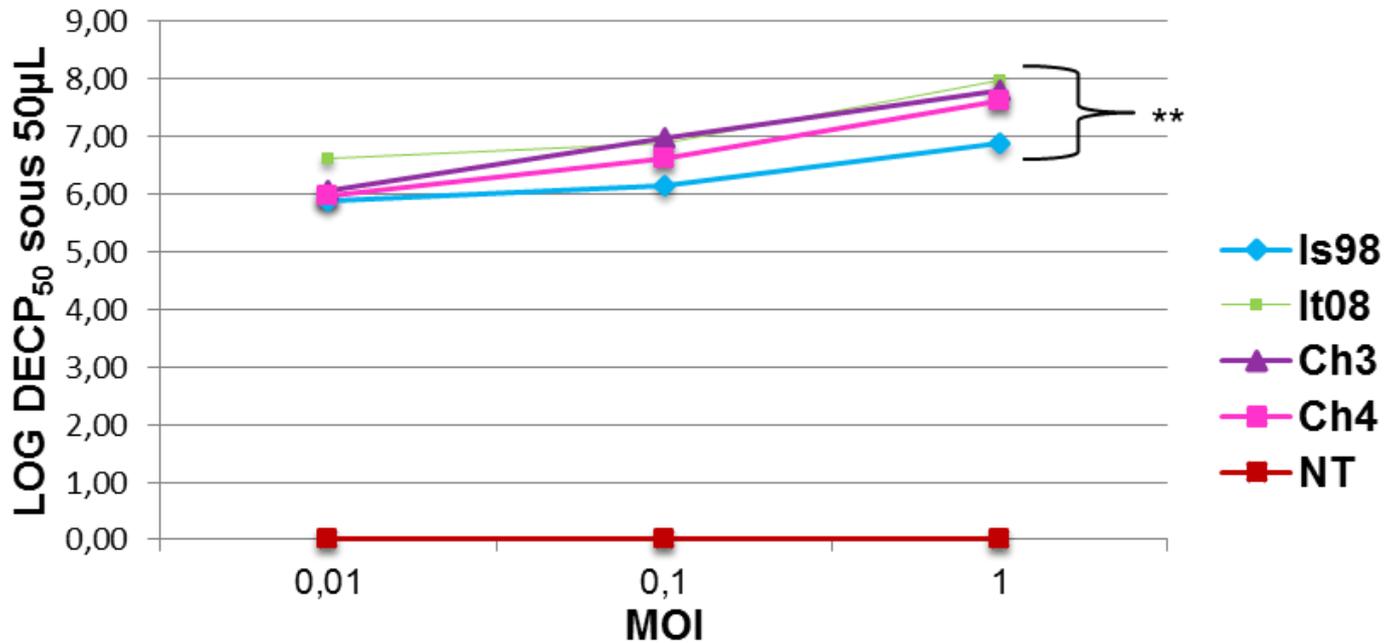


Figure 25 : Cinétique d'infection de cellules VERO avec 0.1 MOI des différents virus produits (Is98, It08, Chimères 3 et 4 (Ch3 et 4 dans la légende) (A) et le mutant Thr (B), obtenue après amplification des ARN viraux dans les surnageants des cellules infectées (prise d'essai de 140µL) par RT-qPCR (analyses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

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

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

A. Production de particules infectieuses à J1 pi



B. Production de particules infectieuses à J2 pi

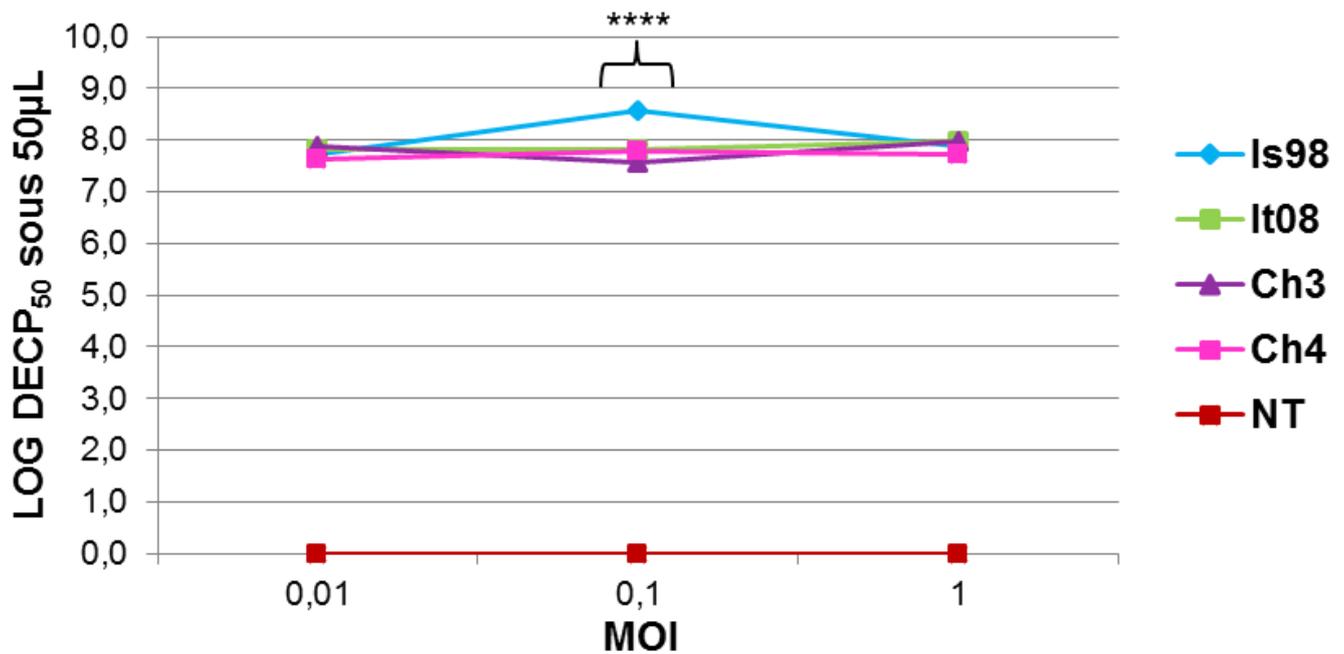


Figure 26: Production de particules infectieuses après infection de cellules VERO par les virus Is98, It08, Chimères 3 et 4 (Ch3 et 4) à J1 (A) et J2 (B) post-infection. ** pour p<0.01 (1 seul essai, avec analyses des conditions expérimentales en triplicat)**

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

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

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

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

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

i. Suivi de mortalité des souris

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

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

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

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

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

A .IP

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

B .IC

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

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

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

ii. Virémie des souris

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

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

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

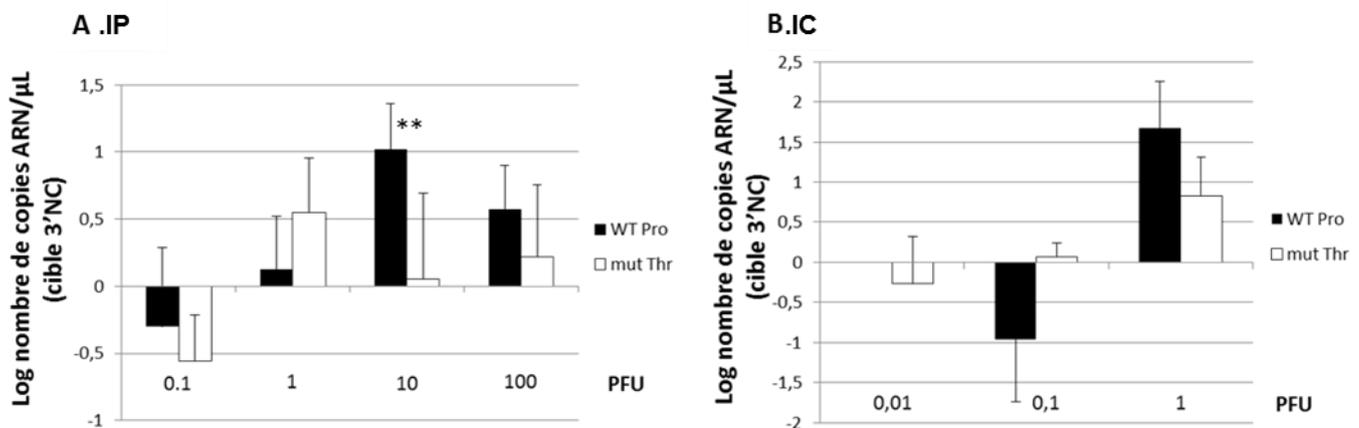


Figure 27 : Charge virale moyenne par µL d'ARN extrait dans des sérums à 4 jpi chez des souris Balb/cByJ infectées par 0.1, 1, 10 ou 100 PFU via la voie IP (A) et 0.01, 0.1 ou 1 PFU via la voie IC (B), soit avec le virus WT Pro (barres noires) soit avec le mutant Thr (mut Thr) (barres blanches) estimé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

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

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

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

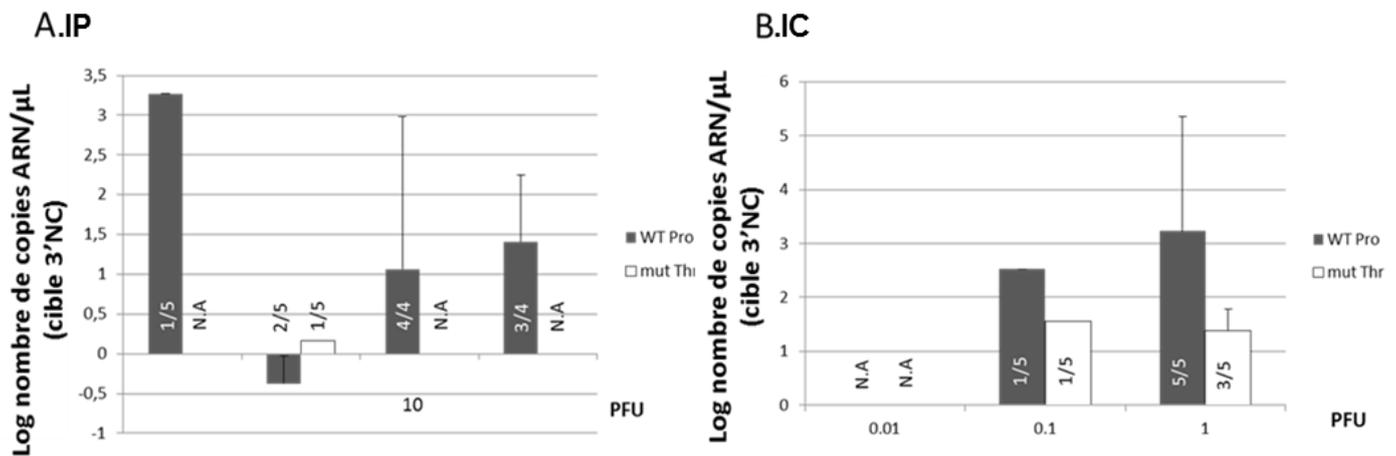


Figure 28 : Charge virale moyenne par µl d'ARN extrait de cerveaux de souris Balb/cByJ femelles infectées par 0.1, 1, 10 ou 100 PFU via la voie IP (A) et par 0.01, 0.1 ou 1 PFU via la voie IC (B) de WT Pro (barres noires) ou mut Thr (barres blanches) telle qu'estimée par qRT-PCR spécifique de la région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

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

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

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

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

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

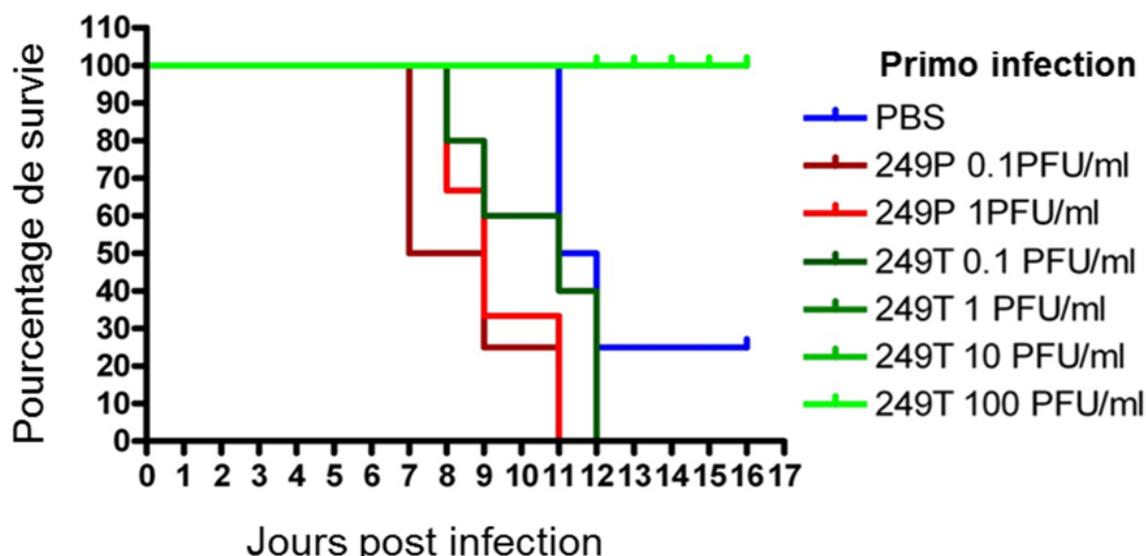


Figure 29 : Courbes de survie sur 16 jours de la population de souris survivantes après primo infection avec les virus WT Pro et Mut Thr et éprouvée 21 jours p.i avec 10^4 PFU du virus sauvage IS-98-ST1.

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

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

i. Suivi de mortalité des souris

La mortalité des souris dans les différents groupes éprouvés par voie intra péritonéale par les virus Is98, It08, Chimères 3 et 4 a été comparée (tableau 18). Toutes les souris inoculées aux doses de 10 et 100 PFU sont mortes entre 8 et 10.6 jours post-infection, à l'exception d'une souris dans le groupe Is98 100 PFU, de la chimère 3 10 PFU et de la chimère 4 10 PFU. Par contre, alors que 100% des souris inoculées avec 1 PFU d'Is98 mouraient, seulement une fraction de souris inoculées avec les trois autres virus mouraient avec la même dose d'inoculation. L'absence d'un groupe sans mortalité de souris (inoculé avec une dose inférieure de virus) ne nous permet pas de calculer précisément la dose létale 50 des différents virus étudiés ; cependant cette DL₅₀ semble légèrement inférieure pour Is98. Les tests statistiques appliqués à la courbe de survie des souris (Test de Wilcoxon, GraphPad Prism) n'ont pas permis de montrer de différence significative entre les souches de virus testés (données non montrées). Les temps de survie moyens peuvent également être comparés (tableau 18). Leur analyse ne permet pas de mettre en évidence de différences de virulence en fonction des souches (différence non significative statistiquement).

Virus	Doses	Mortalité	Temps moyen de survie	DL ₅₀
Is98	1	100%	9,0 ± 0,6	≤1
	10	100%	10,6 ± 1,7	≤1
	100	80%	8,5 ± 0,8	≤1
It08	1	60%	8,3 ± 0,9	≈1
	10	100%	8,4 ± 1	≈1
	100	100%	8,0 ± 1	≈1
Chimère 3	1	40%	8,0 ± 0	≈1
	10	80%	8,3 ± 0,4	≈1
	100	100%	8,2 ± 0,7	≈1
Chimère 4	1	60%	9,0 ± 0,8	≈1
	10	80%	8,8 ± 0,7	≈1
	100	100%	8,6 ± 0,7	≈1

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

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

DL₅₀ : Dose létale 50, correspond à la dose provoquant la mort de 50% de l'effectif

ii. Evaluation des capacités répliquatives périphériques et centrale

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

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

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

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

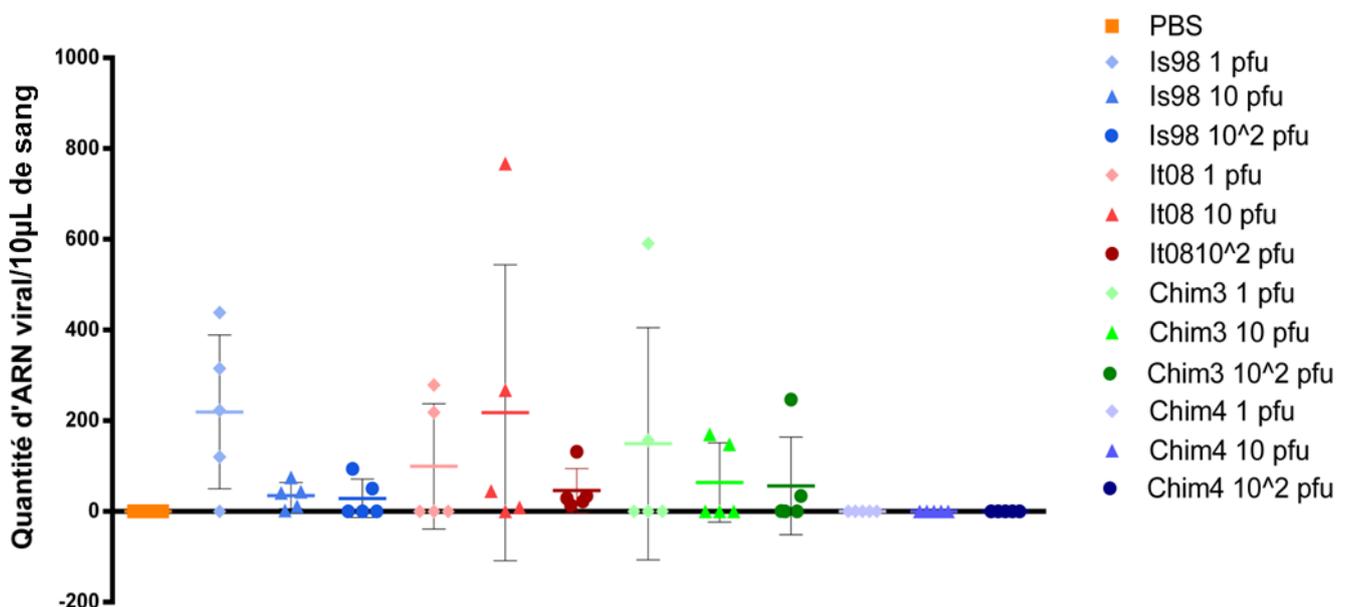


Figure 30 : Virémie dans le sang des souris infectées avec les virus Is98, It08, chimères 3 et 4 à des doses de 1, 10 ou 100 PFU et des groupes témoins (PBS et Témoin négatif), mesurée par RT-qPCR.

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

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

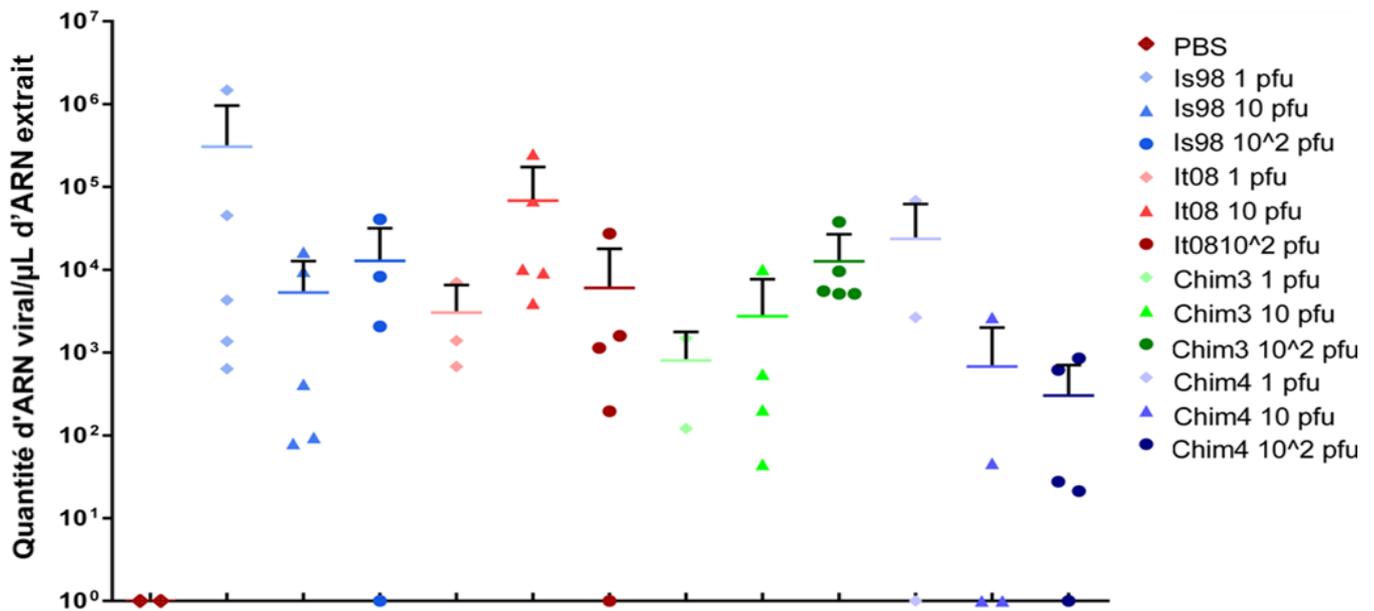


Figure 31 : Quantification par RT-qPCR des charges virales dans les cerveaux des souris décédées suites à l'infection par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4 à des doses de 1, 10 ou 100 PFU.

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

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

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

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

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

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

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

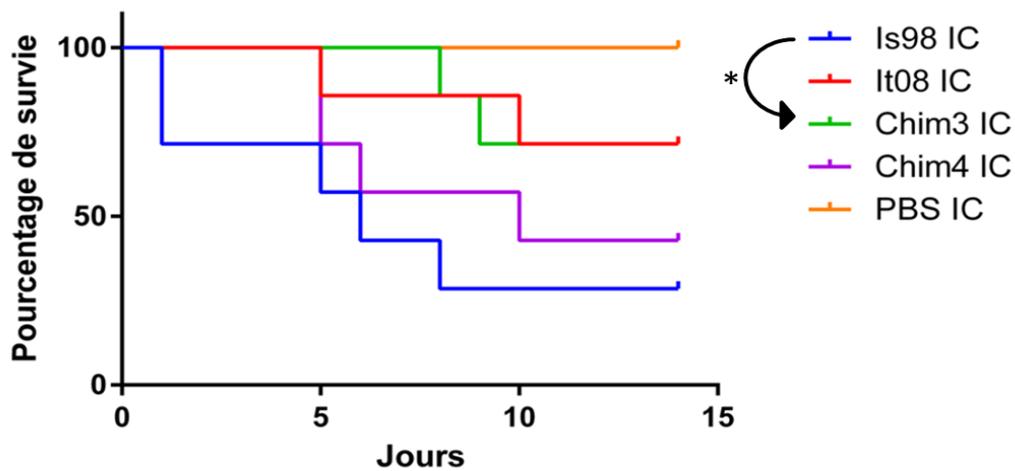
c. Résultats des expérimentations menées sur modèle aviaire pour l'étude des chimères Is98/It08

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

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

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

A. Courbes de survies des poussins infecté par IC



B. Courbes de survies des poussins infecté par SC

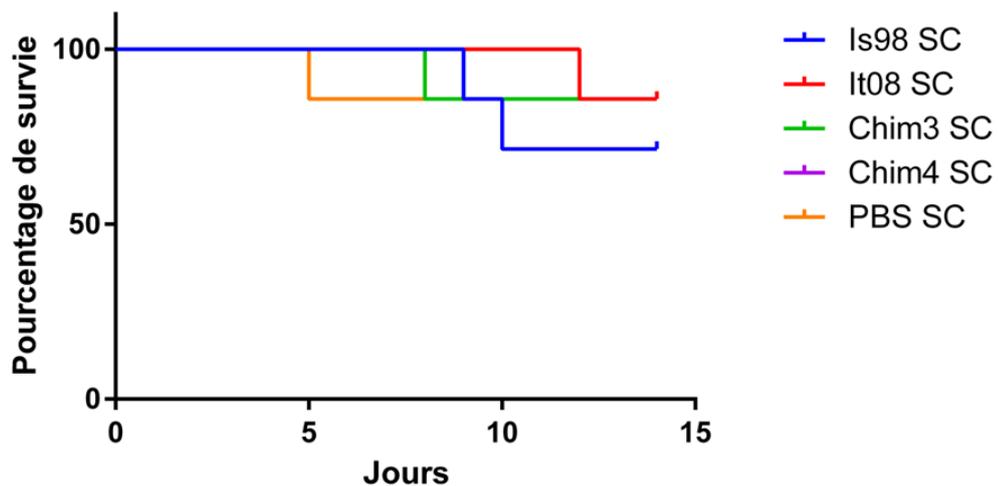


Figure 32 : Courbes de survie sur 14 jours de la population de poulets SPF de 1J infectés par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4

(A) Infectés par voie intra crânienne (IC)
 (B) Infectés par voie sous-cutanée (SC)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tableau 20 : Séroconversion des survivants à J14 p.i

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

ii. Evaluation des capacités répliquatives périphériques et centrale

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

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

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

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

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

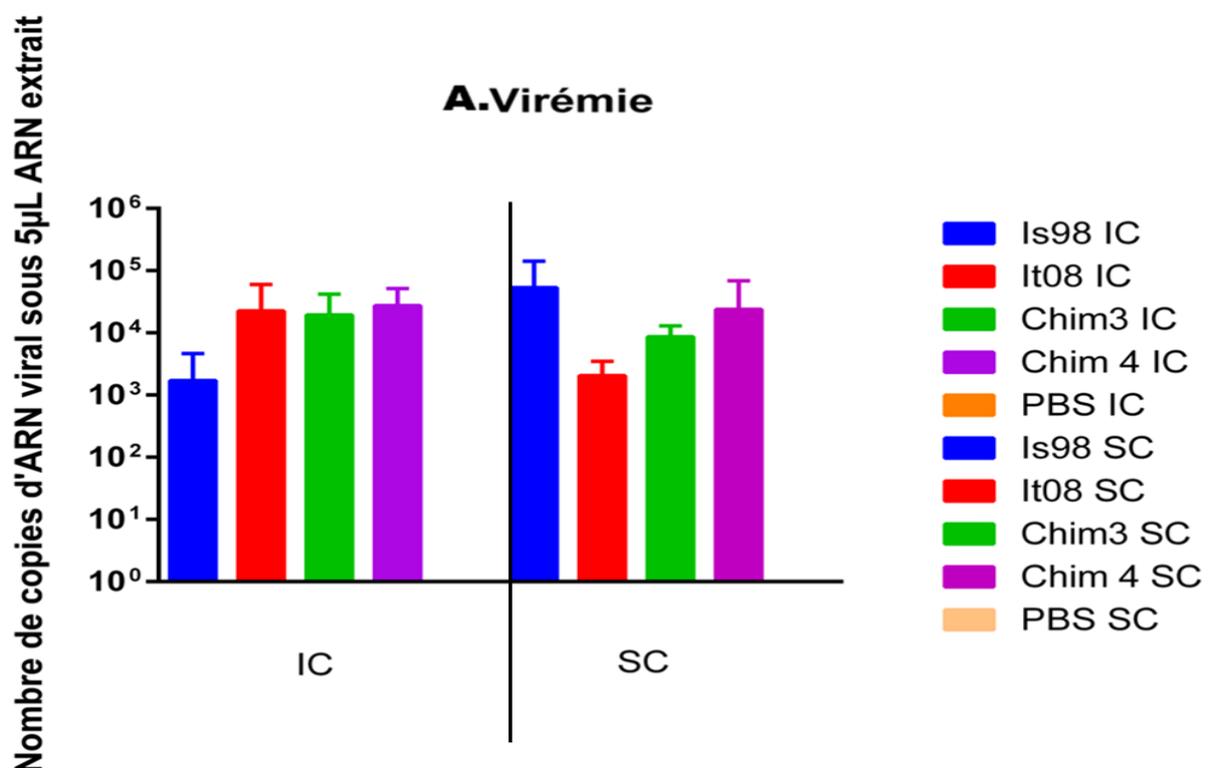
Le nombre (N) de copies d'ARN viral retrouvées dans les broyats peut être décrit comme suit : N It08 IC < N Chim3 IC < N Chim4 IC = N Is98 IC. Ces différences ne sont pas statistiquement significatives. On ne peut donc pas conclure à une différence dans la distribution périphérique des souches de VWN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

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

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

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

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



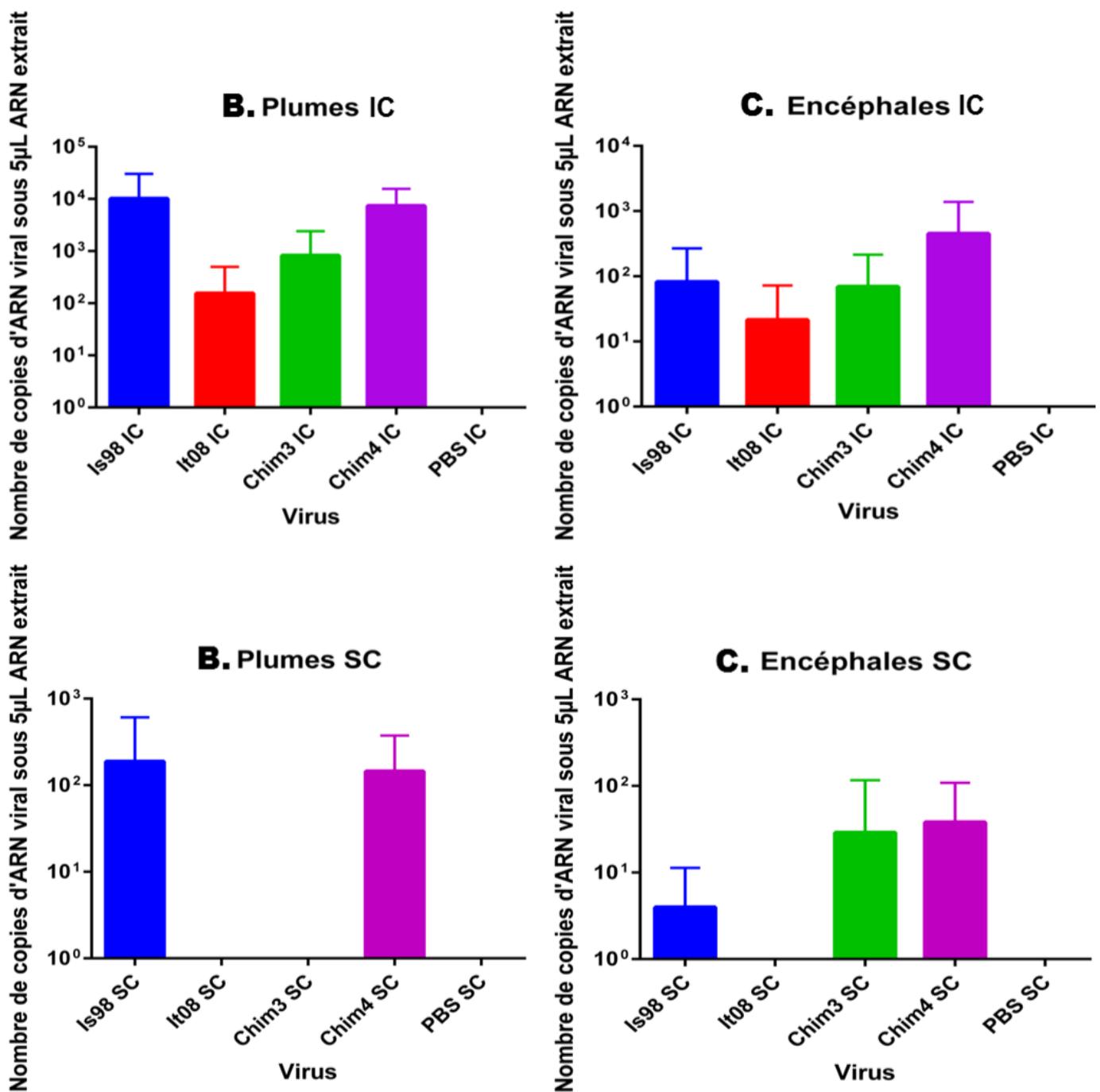


Figure 33 : Résultats de la quantification de l'ARN viral par RT-qPCR post-infection par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4 chez les poussins SPF de 1J selon la voie d'inoculation (Intra crânienne (IC) ou sous-cutanée (SC)).

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

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

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

iii. Suivi du virus dans les écouvillons oraux

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

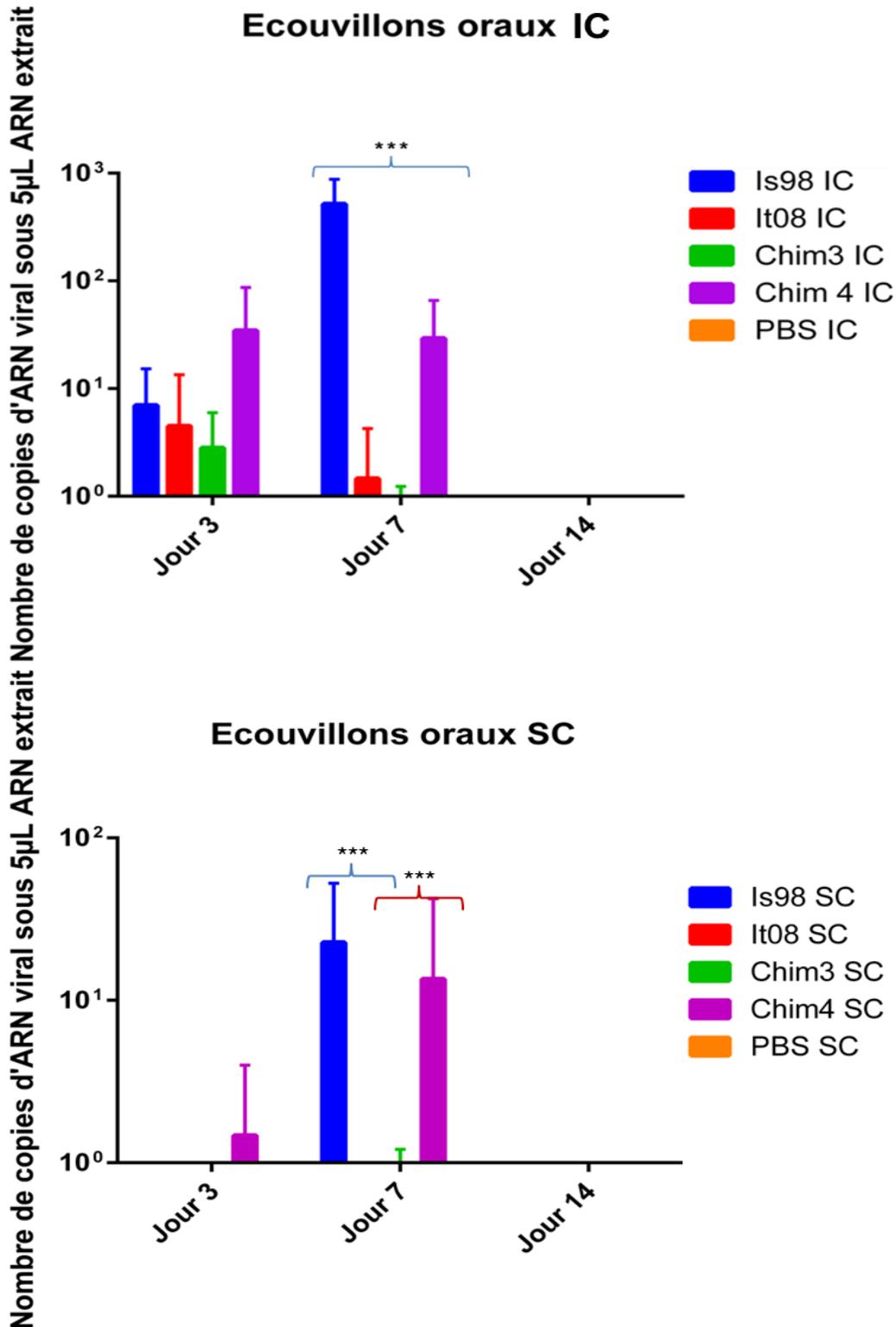


Figure 34 : Quantification virale par RT-qPCR dans les écouvillons oraux réalisés à 3, 7 et 14 jours post infection par les virus Is98, It08, chimère 3, ou chimère 4 sur les poulets SPF de 1J infectés par voie intracranienne (IC) ou sous-cutanée (SC).

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

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

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

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