

III. Circular Polymerase Extension Cloning : CPEC

a. Principe

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

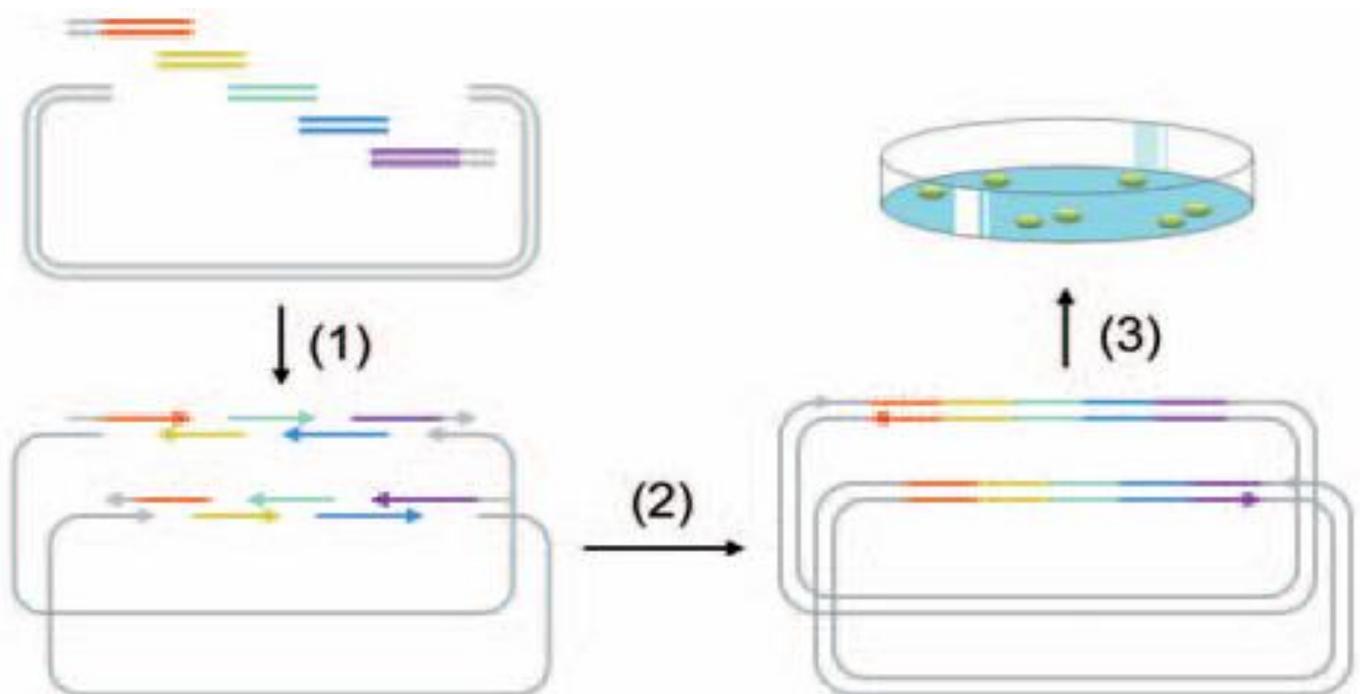


Figure 20 : Schéma du principe du CPEC (d'après Quan et Tian, 2009 (180))

b. Constructions

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

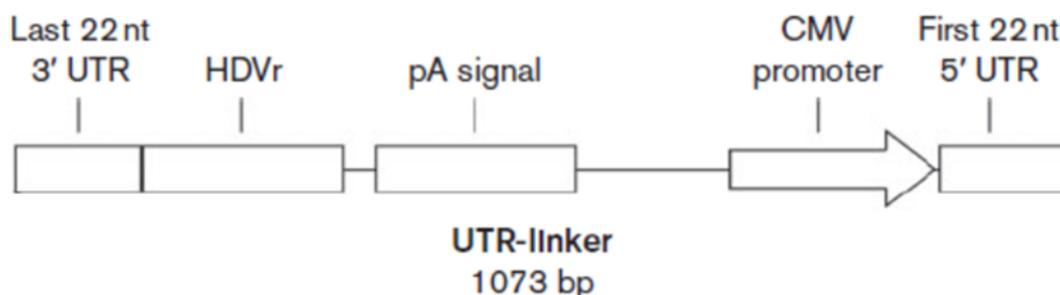


Figure 21: Schéma du polylinker (UTR-linker) utilisé pour la construction du clone infectieux par la technique CPEC (d'après Setoh *et al.*, 2015 (181)).

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

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

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

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

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

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

Tableau 6 : Récapitulatif des matrices utilisées pour la génération des différents fragments.
CI = Clone infectieux Is98 (176). Plasmide A Chimère 1 ou 2 = voir partie II, matériel et méthode.

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

Les réactifs utilisés sont listés dans le tableau 7:

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

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

Nous avons ensuite réalisé les cycles suivants :

Cycles:

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

Les tailles attendues sont résumées dans le tableau 8:

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

Tableau 8 : Récapitulatif des tailles attendues pour les différents fragments

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

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

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

Les cycles suivants ont ensuite été réalisés :

Cycles:

98°C pendant 2 minutes

98°C pendant 30 secondes

60°C pendant 30 secondes

72°C pendant 2 minutes et 30 secondes

} 35 cycles

98°C pendant 30 secondes

60°C pendant 30 secondes

72°C pendant 5 minutes

} 35 cycles

98°C pendant 30 secondes

60°C pendant 30 secondes

72°C pendant 8 minutes

+ 8°C indéfiniment

} 35 cycles

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

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

IV. Productions des virions recombinants

a. Production des virus issus des plasmides

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

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

Les cellules sont gardées sur la glace.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

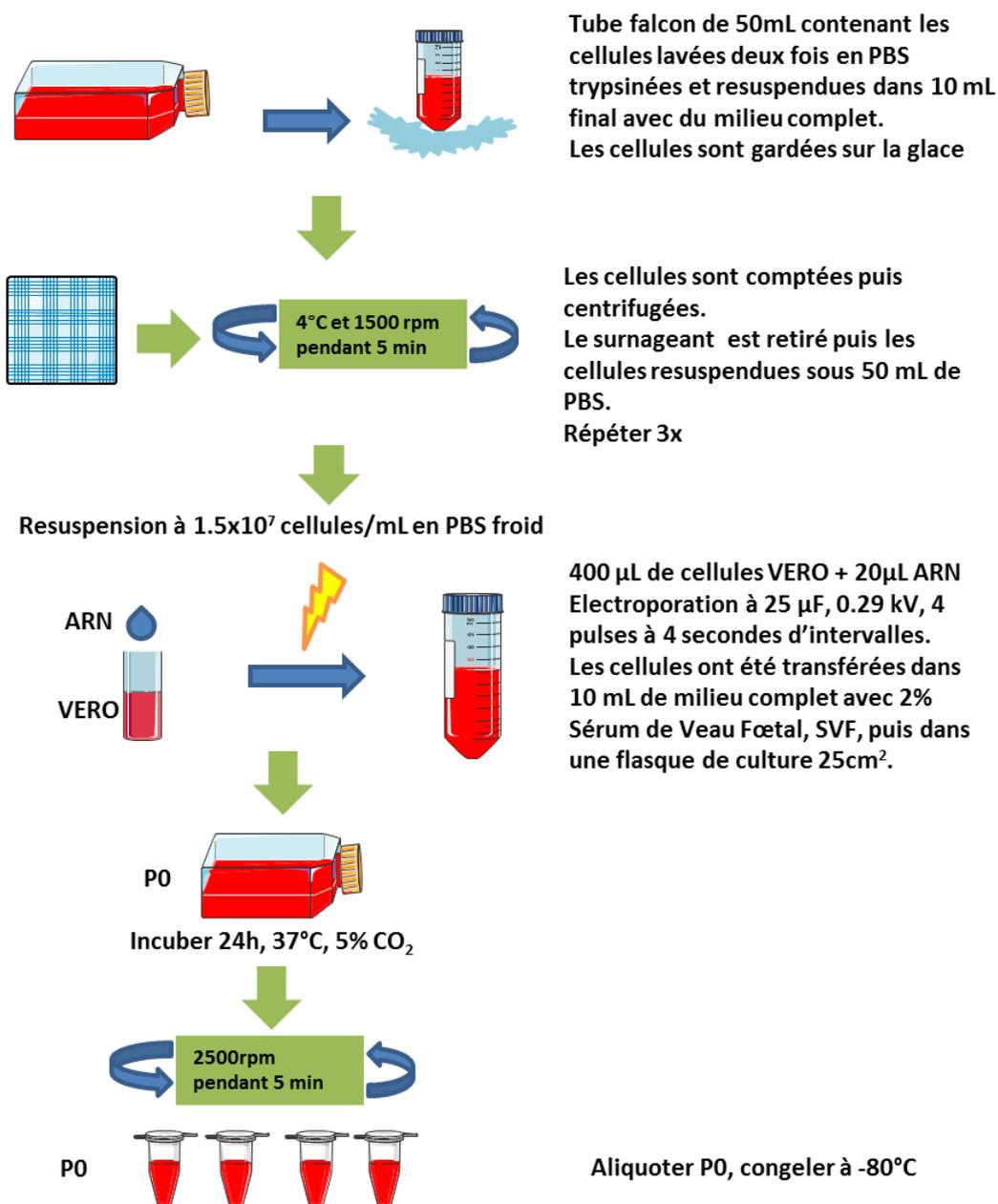


Figure 22 : Exemple de transfection d'ARN dans des cellules VERO par électroporation

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

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

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

Pour un puits : -140µL d'opti-MEM
-10 µL de LTX

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

Pour un puits : -2500ng ADN
-2.5µL Plus Reagent
-Opti-MEM qsp 150µL

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

Pour un puits : -150µL solution ADN
-150µL solution A

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

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

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

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

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

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

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

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

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

b. Cinétiques de réplication virale en cellules VERO

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

c. Titration DECP₅₀

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

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

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

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

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

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

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

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

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

d. Plages de lyse

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

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

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

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

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

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

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

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

a. Infections et prélèvements : modèle murin

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

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

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

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différents groupes de souris.

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

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

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

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

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

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

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

b. Infections et prélèvements : modèle aviaire

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VII. Extraction et amplification des acides nucléiques

a. Extraction des acides nucléiques

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

Le kit comprend :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VWN (cible):

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

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

β -Actin (contrôle endogène):

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

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

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

Les réactifs utilisés sont les suivants :

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

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

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

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

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

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

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

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

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