

## Pathogenèse et virulence

Jeu 23 mars 2018, 15 h 45-17 h 00

Modérateurs : Caroline Denesvre & Ali Amara

Communications orales O22 à O27

Affiches P46 à P58, P60, P88, P89

### O22

#### Mise en évidence de mécanismes d'épistasie et de complémentation en *trans* lors de l'adaptation du virus rabique à des contraintes fonctionnelles sévères impliquant le complexe de réplication

Florence Larrous<sup>1</sup>, Olivier Delmas<sup>1</sup>, Alexander Ghanem<sup>2</sup>, Brice Jegado<sup>1</sup>, Mehdi Arjoolo<sup>1</sup>, Olga Kalinina<sup>3</sup>, Cécile Troupin<sup>1</sup>, Juliette Gambaretti<sup>1</sup>, Christiane Bouchier<sup>4</sup>, Denis Gerlier<sup>5</sup>, Karl Klaus Conzelmann<sup>2</sup>, Hervé Bourhy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité dynamique des Lyssavirus et adaptation à l'hôte (DyLaH), Institut Pasteur de Paris, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France

<sup>2</sup> Max von Pettenkofer Institute and Gene Center, Ludwig-Maximilians-University Munich, D-81377 Munich, Allemagne

<sup>3</sup> Department for Computational Biology and Applied Algorithmics, Max Planck Institute for Informatics, Saarland Informatics Campus, Saarbrücken, Allemagne

<sup>4</sup> Département de génomes et génétique, CiTech, pôle Biomics, Institut Pasteur de Paris, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France

<sup>5</sup> Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), École normale supérieure (ENS), Lyon, Université Claude Bernard-Lyon I (UCBL), CNRS UMR5308, Inserm U1111, 21 avenue Tony Garnier 69365 Lyon cedex 07, France

<herve.bourhy@pasteur.fr>

Les complexes de réplication des virus à ARN négatif sont dépourvus de toute activité de vérification de leur fidélité. Ainsi, à chaque cycle de réplication, un certain nombre d'erreurs se produit et génère des populations génétiquement diverses. Cette propriété confère aux virus une forte capacité d'adaptation face à des contraintes environnementales fortes. Dans cette étude, nous avons utilisé les techniques de génétique inverse et de séquençage à haut débit pour mettre en évidence le rôle délétère de mutations introduites dans la phosphoprotéine (P) du virus de la rage ainsi que l'apparition d'une forte diversité intrinsèque au sein des gènes viraux codant le complexe de réplication vi. Les mutations ont été introduites dans une région très conservée de la phosphoprotéine virale et touchent les fonctions essentielles de transcription et réplication. Ces mutations, délétères pour la survie du virus et peu susceptibles de se produire dans un processus normal de sélection, nous ont permis d'identifier l'apparition de mutations secondaires spécifiques, capables de restaurer ces différentes fonctions. Nous avons suivi les changements de phénotype des différentes protéines mutées grâce à des systèmes de miniréplicons, de complémentation protéique par reconstitution de la *Gaussia* Luciférase et d'analyse de la croissance des virus recombinants mutés. Ces analyses ont été complétées par une modélisation structurale des interactions entre la nucléoprotéine (N) et la protéine P du virus de la rage afin d'évaluer l'impact fonctionnel des mutations identifiées dans la population virale recombinante. Ainsi, nous avons identifié les résidus 373 à 397, localisés dans la boucle non cristallisée de la protéine N, qui complètent les mutations dans la protéine P et restaurent le phénotype d'origine. Plus spécifiquement, nous avons démontré ici que la formation et la fonctionnalité du complexe protéique N-ARN-P nécessitent de multiples interactions d'une part entre des résidus cruciaux tels que 373, 380, 381, 387 et 394 de la protéine N avec les résidus 210, 212 et 224, de la protéine P qui forment un groupe à l'interface d'interaction P-P et d'autre part entre les résidus 213 et 294 de la protéine P qui interagissent l'un avec l'autre et sont enfermés dans une structure proche de cette interface. De plus, en utilisant différentes méthodes de production de virus recombinants,

apportant des contraintes biologiques plus ou moins fortes, nous avons montré que l'adaptation peut se faire soit par sélection d'une mutation dominante ou à l'inverse par sélection d'un groupe de populations minoritaires, conduisant ainsi soit à la réversion, soit à la génération d'épistasie et/ou de complémentation en *trans* dans la même protéine ou dans d'autres partenaires du complexe de réplication, restaurant alors le phénotype d'origine.

### O23

#### La persistance de populations d'entérovirus du groupe b présentant des génomes tronqués en région 5'nc contribue au développement des cardiomyopathies dilatées inexplicables

Paul-Antoine Gretteau<sup>1</sup>, Alexis Bouin<sup>2</sup>, Michel Wehbe, Fanny Renois<sup>3</sup>, Yohan N'guyen<sup>1</sup>, Nicolas Leveque<sup>2</sup>, Steven Tracy<sup>4</sup>, Nora M. Chapman<sup>4</sup>, Patrick Bruneval, Paul Fornes<sup>5</sup>, Bert L. Semler, Laurent Andreoletti

<sup>1</sup> EA4684 -CardioVir, Université Reims Champagne-Ardenne, 51, rue Cognacq Jay, France

<sup>2</sup> UCI Center for Virus Research (CVR), University of California, Irvine 2652 Biological Sciences III Irvine, CA 92697-3906, États-Unis

<sup>3</sup> Laboratory of Food Contaminants and Residue Analysis (LABERCA), École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation, Atlanpole La Chantrerie, route de Gachet, CS 40706 44307 Nantes cedex 3, France

<sup>4</sup> University of Nebraska-Medical Center (UNMC), Omaha, NE 68198 402-559-4000, États-Unis

<sup>5</sup> Department of Pathology, University Hospital of Reims, CHU of Reims, France

<paul-antoine.gretteau@univ-reims.fr>

Les Entérovirus du groupe B (EV-B) sont des pathogènes ubiquitaires impliqués dans la myocardite aiguë qui peut être un précurseur de la myocardite chronique et de la cardiomyopathie dilatée (CMD), principales causes de transplantation cardiaque (deuxième cause de transplantation cardiaque dans le monde). À ce jour, les mécanismes de persistance des EV-B dans le cardiomyocyte restent encore inconnus mais pourraient être liés à des délétions de la région 5' non codante (5'NC) du génome viral. Ces délétions ont été identifiées dans une myocardite fulminante (Chapman *et al.* 2008) et dans une CMD (Bouin *et al.* 2015). Par une approche de séquençage haut-débit (NGS) des ARNs de tissus endomyocardiques de patients atteints de CMD présentant une infection à EV-B, des populations majeures d'EV-B caractérisées par des délétions génomiques en région 5'NC comprises entre 17 et 50 nucléotides ont été identifiées seules ou associées à de faibles proportions de virus présentant une extrémité 5'NC intacte. Des techniques d'hybridation *in situ* et immuno-histologiques ont permis de détecter ces génomes persistants dans des foyers de cardiomyocytes, caractérisés par un clivage ou une absence de synthèse de la dystrophine. La transfection d'ARN viraux synthétiques dans les cardiomyocytes humains primaires a montré que les formes tronquées des ARN génomiques présentaient des activités de réplication précoces en l'absence de formation de plaques virales détectables, tandis que les formes associées d'ARN viraux tronqués et intactes en région 5'NC généraient des particules virales capables d'induire des effets cytopathiques à des niveaux distincts de ceux observés pour la forme 5'NC complète seule. De plus, les formes des ARN viraux tronquées ou associées (formes complètes et tronquées) étaient capables d'activités de transcription et de traduction conduisant à la production de la protéase 2A (2Apro), protéolytiquement active et capable de cliver l'eIF4G1 dans les cardiomyocytes humains primaires. Au cours de notre travail, nous avons démontré l'existence de nouveaux mécanismes moléculaires inattendus par lesquels des entérovirus présentant une réplication persistante de faible niveau et hébergeant des ARN génomiques tronqués en région 5'NC (seuls ou associés à des populations d'ARN viraux d'extrémité 5'NC complet qui sont ici considérées comme des formes virales de type "helper") contribuent au développement de la CMD idiopathique.

**O24****Contrôle de la réponse IFN-I par IRAP au cours de l'infection par le virus respiratoire syncytial durant la période néonatale**

Carole Drjac, Daphné Laubret, Sabine Riffault, Delphine Descamps AgroParisTech, INRA -Université Paris-Saclay, INRA-AgroParisTech Unité VIM (Virologie et immunologie moléculaires), Équipe V2I (Vaccins, Virus, Immunopathologie), Centre de recherche INRA, Domaine de Vilvert, bâtiment 440, bureau 833, 78352 Jouy-en-Josas, France <sabine.riffault@inra.fr>

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est la principale cause d'infection néonatale des voies respiratoires basses. Les infections sévères favorisent la survenue de troubles respiratoires chroniques. L'empreinte immunopathologique de l'infection néonatale a pu être reproduite expérimentalement chez le souriceau. Chez la souris adulte, les interférons de type I (IFN-I) sont principalement produits par les macrophages alvéolaires (MA) et jouent un rôle majeur dans la mise en place de l'immunité anti-VRS (Goritzka *et al.*, 2015). Les souriceaux présentent au niveau pulmonaire un défaut majeur de production d'IFN-I au cours de l'infection qui peut être partiellement corrigé afin de limiter la pathologie (Remot *et al.*, 2016 ; Cormier *et al.*, 2014). Les cellules productrices d'IFN-I détectent le VRS par l'intermédiaire de récepteurs de l'immunité innée comme les *Toll-like Receptors* (TLR) -3, -4, -7 ou encore RIG-I. La protéine endosomale nommée *Insulin-Responsive Aminopeptidase* (IRAP) participe à la signalisation IFN-I dans les cellules dendritiques. Grâce à son interaction avec le cytosquelette d'actine, IRAP régule le trafic d'endosomes cargo de TLRs en ralentissant leur transit vers les lysosomes et modère ainsi l'activation des récepteurs innés transportés (Babdor *et al.*, 2017). Nous faisons l'hypothèse que les voies de signalisation impliquées dans la synthèse d'IFN-I au cours de l'infection pulmonaire par le VRS sont différentes entre adultes et nouveau-nés. Nous envisageons IRAP comme un régulateur de la réponse IFN-I initiée lors de la détection du VRS. Des souris et des souriceaux (âge 5-6 jours) C57Bl/6 ont été infectés avec un VRS recombinant exprimant la luciférase pour évaluer la réplication virale et la réponse IFN-I dans les poumons. En parallèle, des MA de souris adultes ou de souriceaux ont été isolés et exposés *ex vivo* au VRS ou à des ligands de TLRs ou de RIG-I pour étudier leur permissivité à l'infection virale et la mobilisation des voies IFN-I. Les mêmes paramètres ont été étudiés à partir de souris déficientes pour l'expression de IRAP. L'infection virale dure plusieurs jours dans les poumons des souriceaux alors que le VRS est rapidement éliminé chez les adultes. Cela s'accompagne d'une très faible réponse IFN-I chez les souriceaux par rapport aux adultes. L'infection virale de MA isolés de souriceaux se traduit également par une faible production d'IFN- $\beta$  et une faible expression des gènes induits par les interférons et des facteurs de transcription impliqués dans les voies IFN-I (IFITM3, ISG15, IRF7...), alors que ces réponses sont fortes dans les MA adultes. En l'absence de IRAP, la réponse IFN-I au VRS mais aussi à un ligand de RIG-I, est significativement augmentée chez le souriceau que ce soit *in vivo* ou *ex vivo* (MA). L'absence de IRAP ne change pas les capacités de réponses des MA adultes. En conclusion, IRAP contrôle la signalisation IFN-I dans les poumons exclusivement au cours de la période néonatale.

**O25****Impact de co-infections par les virus de la bronchite infectieuse et de l'influenza aviaire faiblement pathogène en modèle poulet**

Sakhia F Z Belkasm<sup>1,2</sup>, Siham Fellah<sup>2</sup>, Saadia Nassik<sup>2</sup>, Maxence Delverdier<sup>1</sup>, Jean-Luc Guérin<sup>1</sup>, Ouafaa Fassi Fihri<sup>2</sup>, Mariette Ducatez<sup>1</sup>, Mohammed El Houadfi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Interactions hôtes-agents pathogènes (Unité mixte de recherche INRA/ENVT 1225), École nationale vétérinaire de Toulouse, Université fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, 23, chemin des Capelles 31076 Toulouse cedex, France

<sup>2</sup> Institut agronomique et vétérinaire Hassan II-IAV (Morocco), Maroc <sakhia.belkasm@gmail.com>

Le virus influenza aviaire H9N2 est classé comme un virus faiblement pathogène. Cependant, des taux élevés de mortalité ont été signalés dans des élevages de poulets de chair au Maroc et dans d'autres pays d'Afrique et d'Asie. Des études préalables ont montré qu'une co-infection virus influenza aviaire (AIV) H9N2 et virus de la bronchite infectieuse (IBV) sauvage ou vaccinal pouvaient aggraver la clinique (Seifi *et al.* 2012 ; Kareem *et al.* 2017). Le but de cette étude était donc de comprendre le rôle de souches d'IBV dans le développement de signes cliniques après infection avec le virus H9N2 chez le poulet. Les expériences ont été réalisées d'une part sur des poussins exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) pour les co-infections H9N2 (A/chicken/Morocco/SF1/2016[H9N2]) et IBV ( $\gamma$ CoV/chicken/Morocco/I38/2014), et d'autre part sur des poussins commerciaux pour les co-infections H9N2 et IBV après vaccination (vaccins anti-IBV : H120 et 4/91, vaccin anti-H9N2 : Gallimune 208 FluH9). Chez les poussins EOPS, nous avons confirmé dans nos conditions expérimentales l'augmentation de la pathogénicité associée à la co-infection H9N2 et IBV sauvage (signes cliniques et lésions macroscopiques à l'autopsie 5 et 10 jours post-infection). Les titres d'anticorps anti-influenza dans le groupe co-infecté étaient significativement plus élevés que ceux des groupes infectés par AIV ou IBV seuls. Chez les poussins commerciaux, une vaccination anti-IBV avec deux valences (H120 et 4/91) a permis de réduire significativement la pathogénicité associée à la co-infection IBV et H9N2 (comparaison avec vaccin H120 seul, à raison d'une ou deux doses administrées). La double vaccination IBV a également permis une moindre excrétion virale d'IBV et une clearance du H9N2 plus rapide. En conclusion, IBV est sans doute un des nombreux facteurs jouant un rôle dans l'exacerbation des infections influenza H9N2 sur le terrain. Un programme de vaccination efficace contre la bronchite infectieuse (H120 + 4/91) associé à une vaccination anti-H9N2 pourrait permettre de réduire la sévérité de la maladie.

**O26****Rôle de la région NCCR du polyomavirus JC dans la spécificité d'expression tissulaire**

Anne-Sophie L'honneur<sup>1,2,3</sup>, Hervé Leh<sup>4</sup>, Fanny Laurent<sup>4</sup>, Uriel Hazan<sup>4</sup>, Flore Rozenberg<sup>1,2,3</sup>, Stéphanie Bury-Moné<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Descartes-Paris 5 (UPD5), UFR médecine et pharmacie, 12, rue de l'École de Médecine 75270 Paris cedex 06, France

<sup>2</sup> Institut Cochin Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

<sup>3</sup> CHU Cochin [AP-HP], AP-HP, Hôpital Cochin, Service de virologie, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques 75014 Paris, France

<sup>4</sup> Laboratoire de biologie et de pharmacologie appliquée (LBPA), École normale supérieure, Cachan, CNRS UMR8113, 61 avenue du Président Wilson 94235 Cachan cedex, France

<sup>5</sup> Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), Université Paris-Sud-Paris 11, CEA : DRF/I2BC, Université Paris-Saclay, CNRS UMR9198, bâtiment 21, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France <flore.rozenberg@aphp.fr>

JC Polyomavirus (JCV) is an ubiquitous human virus which mostly causes asymptomatic and persistent infections. Latency is occasionally interrupted by reactivation and urine shedding. In several immune depression conditions, JCV may gain access to the central nervous system (CNS) and infect oligodendroglial cells, leading to a fatal demyelinating disease, progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). The JCV double-stranded circular 5 kb genome is composed of two opposite coding regions, early and late-transcribed from opposite strands of DNA, and separated by the regulator non-coding control region (NCCR). The hallmark of NCCR sequences obtained from CNS of PML patients is the presence of rearrangements of unknown function in the prototype rearranged (*rr*) NCCR, compared with urine archetype (*at*) NCCR. We sequenced JCV *rr* and *at* NCCRs in 10 and 3 PML patients respectively and observed various deletions and/or insertions/duplications. To analyse the effects of such mutations on early and late expression in tissue-specific cultured cells, we

developed an original approach to produce bidirectional reporter vectors expressing two distinct fluorescent reporters under control of either *rr* or at JCV NCCR. To this end, we adapted the emerging technology involving DNA circles devoid of bacterial plasmid backbone and generated four expression vector maxicircles, to investigate the effects of a single 66 bp deletion differentiating *rr* and at NCCR. After transfection of U-87MG (human glioblastoma cell line) and HEK293 (human kidney cell line), fluorescent reporter expressions from at and *rr* NCCR were analysed by cytometry analysis. In HEK293 cells, early and late expressions from at NCCR were similar, whereas in U-87 MG cells, early expression was 2-fold higher than late expression (p 0.0021, two-tailed Student t test). This suggests that late expression from at NCCR is impaired in this glioblastoma cell line. Interestingly, late expression from mutated *rr* NCCR was similar to early expression in both HEK293 and U-87 MG cells, indicating that the 66 bp deletion restored late expression in the glioblastoma cell line. By using this *in vitro* model, we evidenced a relevant link between JCV NCCR sequence and cell-type dependent expression. This study opens new insights for the use of maxicircles to easily monitor the impact of NCCR mutations on JCV early and late region transcription. Our results suggest that impaired late expression from archetype NCCR in glial cells may act as a motor of evolution selecting mutations that lead to a prototype sequence.

#### O27

##### L'herpèsvirus de la maladie de Marek induit une atrophie des organes lymphoïdes primaires durant l'infection précoce, associée à un accroissement d'apoptose, à une inhibition de la prolifération cellulaire et à une forte lymphopénie B

Camille Berthault<sup>1</sup>, Thibaut Larcher<sup>2</sup>, Sonja Härtle<sup>3</sup>, Jean-François Vautherot<sup>1</sup>, Laetitia Fragnet-Trapp<sup>1</sup>, Caroline Denesvre<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> UMR 1282-Infectiologie et santé publique (ISP), INRA, Centre Val-de-Loire UMR1282-Bat 213 Équipe biologie des virus aviaires, France  
<sup>2</sup> INRA UMR 703 (APEX), INRA : UR1326, École nationale vétérinaire de Nantes B.P. 40706 44307 Nantes, France  
<sup>3</sup> University of Munich (LMU), Department of Veterinary Science/Institute for Animal Physiology Raumb B009 Veterinärstr. 13 80539 München, Allemagne  
 <caroline.denesvre@inra.fr>

La maladie de Marek est une maladie hautement contagieuse de la poule à multiples facettes induite par l'alpha-herpèsvirus de la maladie de Marek (MDV). L'infection précoce par le MDV induit une immunodépression transitoire, associée à une atrophie du thymus et de la bourse de Fabricius, les deux organes de différenciation et de maturation des lymphocytes T et B des oiseaux. Par un essai TUNEL *in situ*, nous avons démontré que le MDV conduit à de forts niveaux d'apoptose dans le thymus et la bourse, concomitamment à sa réplication lytique transitoire dans ces deux organes. De façon intéressante, nous avons observé que dans le thymus la plupart des cellules infectées à 6 jours post-infection (jpi) sont apoptotiques, alors que dans la bourse la plupart des cellules apoptotiques sont non infectées. De plus, une forte inhibition de prolifération cellulaire a été mise en évidence dans les follicules de la bourse de 6 à 14 jpi, mais pas dans les lobules thymiques. Enfin, par un nouveau test de numération sanguine, nous avons observé une forte lymphopénie B, de 6 à 14 jpi, détectable avant l'atrophie de la bourse et une forte lymphocytose T, notamment CD8+. Nos résultats démontrent donc que l'atrophie du thymus et de la bourse induite par le MDV est reliée à des mécanismes cellulaires différents, avec des temporalités différentes, qui affectent les cellules infectées mais aussi non infectées. De façon intéressante, ces perturbations cellulaires renseignent sur l'origine possible de l'atrophie transitoire de la bourse et du thymus et l'immunodépression précoce.

#### P46

##### The epidemiology landscape of Human T-Lymphotropic Virus type 1 infection in specific rural populations from Gabon

Delia Doreen Djuicy<sup>1,2,3,4</sup>, Olivier Cassar<sup>1,2</sup>, Rodrigue Bikangui<sup>3</sup>, Bertrand Mve Ondo<sup>3</sup>, Dieudonné Nkoghe<sup>5</sup>, Benjamin Ollomo<sup>5</sup>, Augustin Mouinga-Ondémé<sup>3</sup>, Antoine Gessain<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unité d'épidémiologie et physiopathologie des virus oncogènes (EPVO), Institut Pasteur de Paris, Département de virologie, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR 3569, Institut Pasteur de Paris, 28 Rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France

<sup>3</sup> Groupe des infections rétrovirales et pathologies associées (IRPA), Département de rétrovirologie, Centre international de recherches médicales de Franceville, BP: 769 Franceville, Gabon

<sup>4</sup> École doctorale régionale d'Afrique centrale, Infectiologie tropicale (EDR), BP 186 Franceville, Gabon

<sup>5</sup> Unité de biologie, écologie et évolution des parasites (BEEP), Centre international de recherches médicales de Franceville, BP 769 Franceville, Gabon

<delia-doreen.djuicy@pasteur.fr>

**Background.** Human T-Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) is a human onco-retrovirus that infects a least 5-10 million people worldwide. Africa, especially sub-Saharan region, appears as the largest endemic area for HTLV-1 infection. The main HTLV-1 transmission modes are: mother-to-child, sexual and through contaminated blood products. Additionally, zoonotic transmission from non-human primates (NHP) still occurs, at least in specific African rural populations. Despite previous studies showed that the HTLV-1 prevalence is high in Gabon, the risks factors for HTLV-1 acquisition, especially through interspecies transmission from NHP to humans, must be further investigated.

**Methods.** Gabonese individuals, living in forest areas and who reported contacts with NHP, were systematically enrolled during 2013-2016. After oral informed consent and epidemiological questionnaire were obtained, a whole-blood sample was collected. All plasma samples were screened for HTLV-1 antibodies by ELISA and the reactive ones were further tested by confirmatory Western blot (WB) assay. Genomic DNA was extracted from buffy coat and submitted to semi-nested PCR to amplify a 522-bp fragment of the gp21 *env* gene and a 458-bp fragment of the LTR-3' region. Amplicons from PCR positive samples were directly sequenced and then subjected to phylogenetic analyses. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7R<sup>®</sup> software.

**Results.** We recruited 1,400 individuals including 817 men and 583 women (median age: 48) originating from 5 Gabonese provinces. Among them, 194 were found HTLV-1/2 seropositive. Using strict WB criteria 97 were HTLV-1 seropositive (6,9%), 7 HTLV-1/2 seropositive (0,5%), 7 HTLV seroreactive (0,5%) and 49 sero-indeterminate (3,5%). Moreover, 26 subjects were seronegative. PCR results showed that 98 individuals are HTLV-1-infected, 73 for the *env* gene, 85 for the LTR region and 62 for both. Based on WB results, the HTLV-1 seroprevalence reached 7.4% while considering both serological and molecular results, 98 individuals are HTLV-1 infected leading to 7.3% overall HTLV-1 prevalence. Phylogenetic analyses showed that most of the new HTLV-1 strains belong to the Central African HTLV-1b subtype (85/98, 87%) with few Cosmopolitan HTLV-1a (2/98, 2%) and some rare Central African HTLV-1d (6/98, 9%) and HTLV-1f (2/98, 2%) subtypes. Statistical analyses revealed that the main risk factors for HTLV-1 infection are the following: female, bite by a NHP, scarification and blood transfusion (p< 0.005).

**Conclusion.** We confirm that HTLV-1b is highly endemic in rural Gabonese adult populations. Field studies and further analyses comprising serologic, molecular and phylogenetic aspects are in progress to search for the different risks factors for HTLV-1 infection. Furthermore, complete sequencing of the different HTLV-1 genotypes present in such population is ongoing.

#### P47

##### Rabies virus envelope G protein upregulates the expression of PD-L1 in infected neurons in a PI3K/Akt/mTOR dependent manner

Camila M. Appolinario, Il-Rae Cho, Marie-Christine Cummont, Christophe Prehaud, Monique Lafon  
 Institut Pasteur Paris, 25-28, rue du docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France  
 <monique.lafon@pasteur.fr>

Rabies virus is a strictly neurotropic virus that slowly propagates in the nervous system of the infected host from the site of entry (usually due to a bite) up to the site of exit (salivary glands). Successful achievement of the virus cycle relies on the preservation of the neuronal network. Once the rabies virus has entered the nervous system, its progression is not interrupted either by destruction of the infected neurons or by the immune response, which are the two major host mechanisms for combating viral infection. Rabies virus has developed two main mechanisms to escape the host defences: 1) its ability to kill protective migrating T cells through the upregulation on the surface of infected neurons of immunosubversive molecules such as PDL1 and 2) its ability to sneak into the NS without triggering apoptosis of the infected neurons and by preserving the integrity of neurites. We have previously shown in human neuroblastoma cells that rabies virus infection triggers survival mechanisms (as measured by the rabies virus capacity to trigger neurite outgrowth) and activates canonical survival cell signalling pathway (as measured by phosphorylation of AKT). Here, we showed that rabies virus-infected human neuroblastoma concomitantly upregulate PD-L1 expression. By using a series of inhibitors of different enzymes of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway (Wortmanin, LY294002, AKT1/2, Rapamycin, KU-0063794) and by measuring the phosphorylation of the S6 ribosomal protein as a read out of the activation of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway, we demonstrated that rabies virus dependent PD-L1 upregulation results of the activation of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. Interestingly enough, this pathway also controls the rabies virus G protein dependent neurogenesis, suggesting that a single hit involving the G protein can modulate both evasive and survival mechanisms evolved by rabies virus.

**P48**  
**Évaluation des effets de l'accumulation de mutations ponctuelles sur le fitness répliatif d'un norovirus murin recombinant**

Louisa Ludwig-Begall<sup>1</sup>, Edmilson De Oliveira-Filho<sup>2</sup>, Jia Lu<sup>3</sup>, Myra Hosmillo<sup>3</sup>, Elisabeth Mathijs<sup>4</sup>, Barbara Toffoli<sup>1</sup>, Elisabetta Di Felice<sup>5</sup>, Ian Goodfellow<sup>3</sup>, Axel Mauroy<sup>6</sup>, Etienne Thiry<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Virologie vétérinaire et maladies virales animales, Département des maladies infectieuses et parasitaires, Centre structurel interdisciplinaire de recherche FARAH, Faculté de médecine vétérinaire, Liège, Belgique  
<sup>2</sup> Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, FIOCRUZ, Recife, PE, Brésil  
<sup>3</sup> Division of Virology, Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, Royaume-Uni  
<sup>4</sup> Department of Virology, Molecular Platform, Veterinary Agrochemical Research Centre, Brussels, Belgique  
<sup>5</sup> Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Italie  
<sup>6</sup> Staff direction for risk assessment, Control Policy, Federal Agency for the Safety of the Food Chain, Brussels, Belgique  
 <etienne.thiry@uliege.be>

Les norovirus sont une cause majeure d'épidémies de gastro-entérites chez l'homme. La recombinaison et les mutations ponctuelles représentent des mécanismes moléculaires clés pour l'évolution des norovirus. La recombinaison peut engendrer des changements génomiques importants pouvant résulter en une diminution du fitness/capacité répliatif du virus (goulot d'étranglement et croisements intra-génomiques défectueux), laquelle doit être compensée par le pouvoir adaptatif d'un virus recombinant. Dans cette étude, nous avons évalué le maintien du fitness ainsi que les caractéristiques génétiques d'un norovirus murin recombinant précédemment décrit, celui-ci obtenu par co-infection de cellules permissives avec deux souches virales homologues WU20 et CW1, soumis à des passages successifs *in vitro*. Le gain du fitness a été déterminé par des cinétiques

d'expansion différentes et par une augmentation moyenne significative du diamètre des plages de lyse après dix passages. Nos données montrent qu'un virus recombinant, dans un environnement connu, est capable de compenser une perte de fitness répliatif après recombinaison. Les mutations ponctuelles au niveau consensus et sous-consensus de la population (NS1 /2, NS4, VP2) ont été caractérisées *via* NGS (Illumina MiSeq) et potentiellement associées au changement répliatif. Afin de comparer ces résultats au niveau du virus parental, des mutations non-synonymes ont été introduites par mutagenèse dirigée dans un plasmide contenant l'ADNc de CW1 sous contrôle d'un promoteur de la polymérase T7 tronquée. Un système de génétique inverse a permis la récupération du virus infectieux à des titres similaires pour toutes les constructions, indiquant qu'aucune mutation n'est délétère au point de nuire à la survie du virus. La caractérisation phénotypique nous permettra d'identifier les effets des différentes mutations, qu'elles soient isolées ou combinées. La construction d'un virus recombinant dépourvu de mutation est planifiée et déterminera si les effets délétères de la réplication sont dus à l'introduction de mutations ou à l'événement de recombinaison en lui-même.

**P49**  
**Caractérisation de la réponse immunitaire innée induite par les formes tronquées de persistance du virus Cocksackie B3 (CVB3/28) dans des cardiomyocytes primaires humains**

Marie Glénet, Fatma Berr, Laurent Andreoletti  
 EA4684-CardioVir, Université Reims Champagne-Ardenne, 51, rue Cognacq Jay, France  
 <mary.glenet.9123@hotmail.com>

Les virus Cocksackie B3 (CVB3), du genre Entérovirus, sont des petits virus non enveloppés, à ARN simple brin de polarité positive. Ils sont fréquemment impliqués dans les myocardites aiguës qui peuvent évoluer dans 10 % des cas vers la myocardite chronique et la phase de clinique de cardiomyopathie dilatée, seconde cause de transplantation cardiaque dans le monde. À ce jour, les mécanismes impliqués dans l'évolution de la myocardite aiguë vers la phase chronique sont toujours mal connus mais pourrait être liés à la sélection et à la persistance de formes virales tronquées en 5' non-codant (NC) (*deleted viral genomes* (DVG) délétions entre 15 et 50 nucléotides). L'existence de délétions dans les 50 premiers nucléotides détectées dans les DVG au niveau de l'extrémité 5' du génome CVB3, pourrait permettre l'échappement du virus à la réponse immunitaire innée (induction de la voie des interférons de type I) médiée par RIG-I et MDA5 (RLR) et permettre sa persistance dans les cellules cardiaques humaines. Dans un premier temps, nous avons validé le système cellulaire de production des IFN de type I après une infection par un CVB3 sauvage (CVB3/28) par une étude comparative de la charge virale et de la réponse IFN en cellules cardiaques primaires humaines et en cellules immortalisées (Hela229). Les souches de Mengovirus sauvage et muté dans sa protéine L ont été utilisés respectivement comme contrôle négatif et positif démontrant que l'activation des RLR est capable d'induire des IFN dans les cardiomyocytes humains. Les résultats de transfection (n = 4) dans des cardiomyocytes d'ARN synthétiques de différentes formes tronquées de 50 ou 100 nucléotides au niveau de l'extrémité 5'NC (D50 ou D100) et de la forme complète de CVB3 montrent une induction de niveau similaire des transcrits des récepteurs RIG-I et MDA-5 en comparaison aux cellules non-transfectées (p < 0,001). Ainsi les activités précoces de réplication post-transfection des virus sauvage et tronqués en 5'NC du CVB3 n'impactent pas sur l'expression et la stabilité des ARNm de ces récepteurs cytoplasmiques. Dans la cellule cardiaque, la production des ARNm d'IFN- $\beta$ , mesurée par la méthode des  $\Delta\Delta$ CT en RT-qPCR en SybrGreen, est induite de façon significative après transfection (n = 4) par le CVB3 complet et elle est significativement diminuée/inhibée après une transfection par les formes D50 (P < 0,0115) et D100 (P < 0,014). Une analyse de l'expression protéique des récepteurs RIG-I et MDA-5 et des IFN sécrétés lors de l'infection/transfection permettra d'identifier la voie et ses intermédiaires dans la cascade de production des IFN lors de la réponse antivirale à CVB3. Nos données obtenues indiquent que les formes virales

tronquées en 5'NC induisent une réponse IFN de type I significativement diminuée dans la cellule cardiaque humaine et que ce mécanisme pourrait être relié à une absence, ou une non-stimulation, des voies médiées par les RLR (RIG-I et MDA-5). Ces nouvelles données contribuent à la compréhension des mécanismes d'échappement à la réponse innée antivirale des virus ARN+ dans la cellule cible et ouvre des perspectives pour de nouvelles stratégies antivirales contre les infections persistantes en pathologie humaine.

#### P50

##### Replication of Yellow Fever/Dengue chimeric viruses in human primary-like hepatocytes, as compared to wild-type Yellow Fever and Dengue parent viruses

Marion Genevois<sup>1,2</sup>, Patrick Lécine<sup>1</sup>, Véronique Barban<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bioaster, Université Claude Bernard-Lyon I-UCBL (France), France

<sup>2</sup> Sanofi Recherche, Université Claude Bernard-Lyon I-UCBL (France), France

<genevois.mar@gmail.com>

Yellow Fever (YF) and Dengue (DEN) viruses are two mosquito-borne *Flavivirus* responsible for human diseases involving the liver in their severe forms. Chimeric YF/DEN viruses (CYD) are obtained by substituting the prME genes of the YF17D vaccine strain by the homologue genes from each of the 4 DENV serotypes. CYD have retained the *in vivo* attenuation properties of YF17D. We have previously shown that wild-type (WT) YF Asibi and YF17D strain differ in their ability to replicate into 3D-primary hepatocytes and activate the IFN pathway. The objective here was to determine if these differences were retained in the YF/DEN chimeras, as compared to the corresponding parental WT DENV. Time-course studies were conducted in human iPSC-derived hepatocytes (Cellular Dynamics Inc.), either in monolayers or in spheroids. Viral RNA was quantified and total hepatocyte RNA was extracted and analyzed on IFN pathway-focused gene expression array (QIAGEN). All tested viruses were able to infect and to replicate in iPSC-hepatocytes, but with strain-to-strain differences. Differences in the activation kinetics and amplitude of IFN pathway were also observed and suggested that YF/DEN chimeras behave closely to YF17D virus.

#### P51

##### Interactions entre les virus chikungunya et de la dengue au cours de co-infections séquentielles en cellules de moustiques et chez le moustique *Aedes aegypti*

Margot Enguehard<sup>1,2,3,4</sup>, Marie Cresson<sup>4,5</sup>, Dimitri Mompelat<sup>3</sup>, Claire Valiente Moro<sup>2</sup>, François-Loïc Cosset<sup>3</sup>, Carine Maise Paradisi<sup>4</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>2,6</sup>, Valérie Choumet<sup>7</sup>, Dimitri Lavillette<sup>2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Institut Pasteur in Shanghai, Chinese Academy of Sciences (IPS-CAS), Shanghai, Chine

<sup>2</sup> Écologie microbienne (EM), INRA UR1193, Université Claude Bernard Lyon 1, École nationale vétérinaire de Lyon, CNRS UMR5557, Villeurbanne, France

<sup>3</sup> Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), École normale supérieure, Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm U1111, CNRS UMR5308, France

<sup>4</sup> Infection Virale et Pathologie Comparée (IVPC), INRA (INRA) UMR754, Université Claude Bernard-Lyon I (UCBL), VetAgro Sup, France

<sup>5</sup> Institut Pasteur in Shanghai, Chinese Academy of Sciences (IPS-CAS), 225 South Chongqing Road, Shanghai 200025, Chine

<sup>6</sup> Viroscan3D, France

<sup>7</sup> Institut Pasteur, France

<margot.enguehard@ens-lyon.fr>

L'émergence des virus de la dengue (DENV), du Zika (ZIKV) et du chikungunya (CHIKV) entraîne une augmentation du nombre d'épidémies humaines à travers le monde, provoquant plusieurs millions de cas

cliniques graves au cours de la dernière décennie. Transmis par les moustiques *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, la distribution géographique de ces virus est souvent commune, en particulier en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud. Lors de récentes épidémies simultanées, le nombre de patients diagnostiqués comme étant co-infectés par le CHIKV et la DENV peut être élevé. De plus, des études ont démontré que les moustiques *Aedes albopictus* pouvaient être porteurs et transmettre simultanément le CHIKV et la DENV. Avec un tropisme similaire à la fois chez le moustique et chez l'homme, ces deux virus peuvent emprunter des mêmes voies cellulaires nécessaires pour leur réplication. Ces interactions hôte-virus similaires ont probablement un impact sur l'infection par un virus lors de la co-infection. Il est crucial de considérer dans quelle mesure un hôte infecté par un premier micro-organisme est modifié et si sa réaction à l'infection par un second micro-organisme est par conséquent modifiée. À ce jour, aucune étude ne détaille de potentielles interactions entre Alphavirus et Flavivirus. Notre étude vise à caractériser toute interférence ou synergie entre le virus DENV et le CHIKV au cours de co-infection chez le moustique. Des co-infections séquentielles ont été menées sur des lignées cellulaires dérivées de *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* mais également sur moustiques *Aedes aegypti*. Nous avons constaté que la permissivité et la production de flavivirus (DENV-1, -3, -4; YFV et ZIKV) sont renforcées en présence de CHIKV. Au contraire, la pré-infection par le DENV-2 n'impacte pas une seconde infection par le CHIKV. Par ailleurs, la co-infection séquentielle chez le moustique *Aedes aegypti* a révélé une augmentation du taux d'ARN de la DENV-2 dans les glandes salivaires uniquement, contrairement à l'intestin moyen. Ainsi, nos résultats *in vitro* et *in vivo* ouvrent la voie à la caractérisation de l'interaction moléculaire entre la DENV et le CHIKV chez les moustiques. Cette étude peut être cruciale pour une meilleure compréhension de la maladie et de l'épidémiologie lors d'épidémies simultanées.

#### P52

##### Étude des propriétés oncolytiques de vecteurs viraux dérivés du virus de la vaccine sur des lignées cellulaires et des explants de tumeurs mammaires canines

Jérémy Béguin<sup>1,2,3,3</sup>, Christelle Maurey<sup>1,3</sup>, Eve Laloy<sup>1,4</sup>, Virginie Nourtier<sup>2</sup>, Johann Foloppe<sup>2</sup>, Philippe Erbs<sup>2</sup>, Bernard Klonjowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Virologie UMR1161 (VIRO), INRA UR1161, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, ENVA Maisons Alfort, France

<sup>2</sup> Transgene SA, Illkirch-Grattenstaden, France

<sup>3</sup> Service de médecine interne, École nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France

<sup>4</sup> Service d'anatomie pathologique, École nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France

<jeremy.beguin@vet-alfort.fr>

Chez le chien comme chez l'homme, le cancer est une des principales causes de décès. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont développées afin d'améliorer l'arsenal médicamenteux disponible. Parmi elles, la virothérapie oncolytique a pour finalité la lyse d'une masse tumorale après infection des cellules cancéreuses par un vecteur viral. Afin d'accroître leur capacité thérapeutique, ces vecteurs viraux peuvent être armés d'un gène suicide, permettant une chimiothérapie locale. Les objectifs de cette étude sont d'évaluer : (i) le caractère permissif de lignées cellulaires humaine, canine, porcine et féline à la réplication du vecteur viral ; et (ii) les propriétés oncolytiques du TG6002, un vecteur viral oncolytique armé du gène *FCU1*, sur des explants de tumeurs mammaires canines. *Matériels et méthodes*. Les vecteurs viraux utilisés sont des virus de la vaccine (VV) de souche Copenhague délétés des gènes codant la thymidine kinase et la ribonucléotidase. Le premier, un vecteur traçable, le VV-GFP exprime la protéine fluorescente verte (GFP). Le second, le TG6002, est armé du gène suicide *FCU1* permettant la conversion d'une prodrogue non toxique, le 5-fluorocytosine (5-FC) en agent de chimiothérapie, le 5-fluorouracile (5-FU). Des lignées cellulaires humaines (HEK-293, HeLa), canine (DKE1 et A72), porcine (PK15) et féline (CrFK) ont été infectées par le vecteur VV-GFP. Trois explants d'adénocarcinomes mammaires canins ont

été infectés par le VV-GFP ou le TG6002. La susceptibilité des lignées cellulaires et des explants tumoraux à l'infection par le VV-GFP a été évaluée à différentes doses par microscopie à fluorescence et/ou cytométrie en flux. Le caractère permissif des lignées cellulaires à la réplication du VV-GFP a été déterminé à des multiplicités d'infection de  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  par la méthode des plages de lyse. Pour les explants tumoraux, les propriétés oncolytiques du TG6002 ont été évaluées par analyse histologique et les concentrations en 5-FC et 5-FU ont été mesurées dans le milieu de culture. **Résultats.** L'évaluation de l'expression de la GFP a confirmé la susceptibilité des lignées cellulaires à l'infection par le VV-GFP. Un facteur de réplication de  $10^6$  à  $10^7$  a été mesuré après 4 jours d'infection. Dès 16 heures après l'infection, des plages de lyse ont été observées. L'évaluation de l'expression de la GFP a également confirmé la susceptibilité des trois adénocarcinomes mammaires canins à l'infection par le vecteur viral. Les analyses histologiques ont révélé une lyse de 90 % des cellules épithéliales tubulaires. Enfin, une conversion de plus de 50 % du 5-FC en 5-FU a été constatée dans le milieu de culture six jours après l'infection. **Conclusion.** Cette étude montre la susceptibilité de différentes lignées cellulaires à l'infection par le vecteur viral dérivé de la Vaccine ainsi que le caractère répliquatif de ce dernier. Elle révèle également les capacités oncolytiques du TG6002 sur des explants de tumeurs mammaires canines. Ces résultats prometteurs renforcent la volonté d'évaluer l'efficacité du TG6002 chez les chiens atteints de cancers. Enfin, cette proposition de thérapie innovante chez le chien atteint de tumeur inscrit pleinement la recherche translationnelle en oncologie dans la démarche "One World, One Medicine, One Health".

### P53

#### **Prédominance des formes non intégrées d'ADN au cours de la primo-infection VIH puis contribution majeure des formes intégrées à l'ADN-VIH total au stade chronique chez des patients non traités : étude rétrospective de cohorte sur 6 ans**

Pauline Trémeaux<sup>1,2</sup>, Tiphaine Lenfant<sup>1</sup>, Farouady Boufassa<sup>3</sup>, Asma Essat<sup>4</sup>, Adeline Mélard<sup>1</sup>, Marine Gousset<sup>1</sup>, Olivier Delelis<sup>5</sup>, Cecile Goujard<sup>4</sup>, Christine Rouzioux<sup>1,6</sup>, Laurence Meyer<sup>4</sup>, Véronique Avettand-Fenoel<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Infection à VIH, réservoirs, diversité génétique et résistance aux antirétroviraux (ARV) (EA 7327), Université Paris Descartes-Paris 5 : EA7327, Faculté de médecine Site Necker, 156 rue de Vaugirard 75730 Paris cedex 15 ; CHU Necker, 149 rue de Sèvres 75015 Paris, France

<sup>2</sup> CHU Cochin, AP-HP, Hôpital Cochin, Service de virologie, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques 75014 Paris, France

<sup>3</sup> Centre de recherche en épidémiologie et santé des populations (CESP), Inserm U1018, 16 avenue Paul-Vaillant Couturier 94807 Villejuif cedex, France

<sup>4</sup> Centre de recherche en épidémiologie et santé des populations (CESP), Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Sud-Paris 11, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Paul Brousse, Inserm U1018, 16 avenue Paul-Vaillant Couturier 94807 Villejuif cedex, France

<sup>5</sup> Laboratoire de biologie et de pharmacologie appliquée (LBPA), École normale supérieure Cachan, CNRS UMR8113, 61 avenue du Président Wilson 94235 Cachan cedex, France

<sup>6</sup> APHP, Hôpital Necker Enfants-Malades, Laboratoire de virologie, Paris, France, APHP, Hôpital Necker Enfants-Malades, Laboratoire de virologie, Paris, France  
<pauline.tremeaux@aphp.fr>

**Contexte.** La persistance de l'ADN-VIH dans les cellules infectées, qui caractérise le réservoir, est la principale barrière empêchant l'éradication du virus. Différentes formes moléculaires existent : provirus intégré très persistant, ADN linéaire non intégré, et formes épisomales. Les biomarqueurs évaluant la taille du réservoir, tels que l'ADN-VIH total et l'ADN-VIH intégré, ont été principalement étudiés chez les patients sous traitement antirétroviral. L'objectif de ce travail était d'étudier la dynamique de ces deux marqueurs en histoire naturelle, pendant la primo-

infection et au cours de l'évolution de l'infection récente vers l'infection chronique et le stade sida.

**Matériel et méthodes.** L'ADN-VIH total et l'ADN-VIH intégré ont été quantifiés par qPCR sur les cellules mononucléées sanguines (PBMC) de 74 patients en primo-infection (cohorte ANRS-PRIMO, infection < 3 mois) et de 97 séroconvertisseurs récents (cohorte historique ANRS-SEROCO, qui a inclus des patients avant l'ère des trithérapies, infection < 12 mois). Les valeurs prédictives des charges ADN-VIH sur l'évolution vers le sida ont été étudiées par modèles de COX, et leurs évolutions sur un suivi de 6 ans ont été modélisées (modèles linéaires à effet mixte).

**Résultats.** À l'inclusion, la proportion d'ADN-VIH intégré était faible pour la majorité des patients en primo-infection (médiane : 12 %), alors qu'elle était plus élevée pour les patients plus de 3 mois après la contamination (médiane : 65 %). Parmi les séroconvertisseurs récents, ceux qui ont atteint le stade sida pendant la durée du suivi (progressseurs rapides, n = 34) avaient à l'inclusion des niveaux plus élevés d'ADN-VIH total (3.22 vs 2.96 log<sub>10</sub> copies/MPBMC, p = 0.008) et d'ADN-VIH intégré (3.32 vs 2.53 log<sub>10</sub>, p < 0.001) que les autres patients (progressseurs, n = 63), ainsi qu'un ratio ADN-VIH intégré/ADN-VIH total plus élevé (100 % vs 44 % respectivement, p < 0.001). En analyse multivariée, la charge ADN-VIH intégrée était associée au risque de progression vers le SIDA (risque relatif = 2.6 pour une augmentation d'1 log<sub>10</sub> copies/MPBMC). Les deux marqueurs montrent une augmentation progressive en histoire naturelle (ADN-VIH total : + 0.574 log<sub>10</sub>/6 ans pour les progressseurs, +0.627 log<sub>10</sub> pour les progressseurs rapides ; ADN-VIH intégré : +0.796 log<sub>10</sub>/6 ans pour les progressseurs, +0.538 log<sub>10</sub> pour les progressseurs rapides), sans différence significative de pente entre les deux groupes. Au stade sida, l'ADN-VIH total est de 3.64 log<sub>10</sub> en médiane (IQR [3.42-3.98]) et l'ADN-VIH intégré de 3.69 log<sub>10</sub> [3.31-3.97].

**Discussion.** La contribution des différentes formes d'ADN-VIH varie au cours de l'infection et cela permet sans doute d'expliquer en partie la décroissance plus importante de l'ADN-VIH total lorsque le traitement est initié dès la primo-infection. Le traitement en primo-infection, en contrôlant la réplication, permet d'éliminer les formes majoritaires non intégrées, alors que le traitement au stade chronique est incapable de diminuer les formes majoritaires intégrées. De plus, le traitement précoce prévient l'augmentation progressive du réservoir VIH sanguin que nous montrons en histoire naturelle. Enfin, nos résultats suggèrent que le profil « progressseur » ou « progressseur rapide » est déterminé dès les premiers mois de l'infection, soulignant encore l'importance cruciale d'un dépistage et d'un traitement précoces.

### P54

#### **La matrice péritrophique de l'insecte : une barrière clé à franchir pour initier l'infection par les densovirus**

Laetitia Pigeyre<sup>1</sup>, Leila Gasmi<sup>2</sup>, Marc Ravallec<sup>3</sup>, Yann Guerardel<sup>4</sup>, Cécile Clouet<sup>3</sup>, Thierry Dupressoir<sup>1</sup>, Mylène Ogliastra<sup>3</sup>, Anne-Sophie Gosselin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EPHE PSL Research University, Pathologie comparée des Invertébrés (DGIMI), INRA (INRA) : UMR1333, Université Montpellier 2 (France), École pratique des hautes études [EPHE], Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier cedex 5, France

<sup>2</sup> Unitat d'Investigació de Genètica Bioquímica i Biotecnologia, Departament de Genètica, Universitat de València, 46100 València, Espagne

<sup>3</sup> UMR 1333 DGIMI, INRA, 34095, Montpellier cedex 5, France

<sup>4</sup> UMR 8576, CNRS, 59000, Lille, France

<anne-sophie.gosselin-grenet@umontpellier.fr>

L'utilisation des virus entomopathogènes pour contrôler les populations d'insectes ravageurs ou vecteurs de maladies est une alternative aux insecticides de synthèse. Dans ce cadre, nous évaluons le potentiel des densovirus. Nous développons pour cela une approche globale de l'interaction densovirus/insecte en utilisant comme modèles le densovirus *Jumonia coenia* Densovirus (JcDV) et le lépidoptère ravageur de cultures *Spodoptera frugiperda*, chez lequel nous avons décrit la pathogénèse virale (Mutuel *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2013). Pour les densovirus, comme pour tous

les agents infectieux par voie orale, l'étape clé qui détermine l'initiation et la réussite de l'infection de l'hôte est le franchissement de la barrière intestinale. Chez l'insecte, cette barrière est constituée d'un épithélium monocouche recouvert, sur la face apicale, par une matrice péritrophique. Cette matrice, qui protège l'épithélium des pathogènes et de l'abrasion par le bol alimentaire, est constituée d'un réseau de fibrilles de chitine (polymère de N-acétyl-glucosamine, GlcNAc) et de protéines glycosylées associées. La structure fine et la composition biochimique exhaustive de cette matrice demeure cependant mal caractérisées. À l'aide de la microscopie électronique à balayage, nous avons pu observer pour la première fois l'ultrastructure de la matrice péritrophique de *Spodoptera frugiperda*. Nos travaux ont révélé que le virus JcDV ingéré par la chenille se concentrait initialement sur cette matrice (Wang *et al.*, 2013) et que, dans ce cas, les pores du réseau de chitine présentaient un diamètre plus grand que chez les chenilles contrôles, ce qui pourrait expliquer le passage des particules virales au travers de ce réseau complexe (Pigeyre *et al.*, *in prep*). Nous avons, par ailleurs, mis en évidence que JcDV avait une affinité pour les glycannes de la matrice péritrophique, *in vitro* par *far western*, *ex vivo* sur matrices péritrophiques isolées et *in vivo* sur coupes semi-fines d'intestins de chenilles infectées oralement, par immunomarquage. Ces résultats ont été confirmés par des expériences de compétition dans lesquelles la pré-incubation des particules virales avec des doses croissantes de différents glycannes, dont le GlcNAc, entraîne une diminution de l'interaction entre JcDV et la matrice péritrophique (Pigeyre *et al.*, *in prep*). À présent, nous cherchons à identifier la nature des glycannes qui interagissent spécifiquement avec JcDV, nous avons lancé pour cela une étude glycomique dont les résultats, actuellement en cours d'analyse, seront présentés. Nous testerons le rôle de ces interactions sur la pathogénèse virale, en suivant la mortalité des chenilles infectées oralement par JcDV, pré-incubées ou non avec le(s) glycane(s) identifiés. Ces travaux originaux permettent d'avancer sur la compréhension des mécanismes de franchissement de la barrière intestinale de l'insecte par les virus entomopathogènes, essentielle à maîtriser pour leur utilisation sûre et efficace en lutte biologique.

## P55

### Caractérisation génotypique et phénotypique des variants VIH-1 compétents présents dans le réservoir de patients

Alexandre Nicolas

Inserm U941, IUH Hôpital Saint-Louis, France

<alexandre.nicolas@inserm.fr>

**Contexte.** La thérapie antirétrovirale utilisée actuellement pour traiter les patients infectés par le VIH permet un contrôle efficace de la virémie. Cependant, l'interruption du traitement résulte inexorablement par un rebond rapide de la charge virale. L'origine de ce rebond est reconnue comme étant due à la persistance de génomes proviraux, compétents pour la réplication, intégrés dans des lymphocytes T CD4+ mémoires quiescents. Notre étude porte sur la caractérisation phénotypique et génotypique de différents clones viraux issus du réservoir réactivable de deux patients. **Méthodes.** Les lymphocytes T CD4+ quiescents (CD69-; CD25-; HLADR-) sont isolés à partir du sang des patients. Les cellules sont activées par des anticorps anti-CD3 et CD28 couplés à des billes et cultivées dans deux conditions de dilution différentes afin de sélectionner la condition de culture permettant d'attribuer l'émergence d'un virus en culture à une seule cellule infectée. Les lymphocytes T CD4+ quiescents issus des patients sont co-cultivés avec des lymphocytes T CD4+ activés provenant de donneurs afin de permettre l'expansion des virus. L'émergence virale est suivie par quantification de la protéine virale p24 dans les milieux de cultures. Chaque clone est isolé par le biais de cultures à courts termes. Nous déterminons alors la capacité répliquative de chacun des clones par des tests de réplication à cycles multiples. L'infectiosité est également déterminée *via* des tests à cycle unique. Enfin, nous profitons des techniques de séquençage à haut débit pour obtenir les génomes complets de chaque clone isolé.

**Résultats.** Les lymphocytes T CD4+ quiescents de deux patients traités efficacement ont été étudiés. Nous avons pu isoler et caractériser pour

chaque patient un total de 12 clones viraux compétents pour la réplication. Les résultats observés pour chaque patient ont permis de mettre en évidence des cinétiques de réplication différentes parmi les clones. En effet, les pics de réplication apparaissent sur plusieurs jours (entre le 4<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour concernant le patient 1; entre le 9<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour pour le patient 2). De plus, la quantité de particules virales produites par des clones atteignant un pic de réplication le même jour varie grandement. L'infectiosité à cycle unique a ensuite été étudiée. Parmi les clones issus du patient 1, certains clones étaient jusqu'à 4 fois plus infectieux que d'autres. Pour les clones issus du patient 2, l'infectiosité de certains clones était 2 fois supérieure à celle des autres. Concernant le génotypage des clones issus d'un même patient, la comparaison des séquences complètes permettra de mettre en évidence des différences expliquant les divergences phénotypiques, en profitant de la proximité phylogénétique des virus de chaque patient.

**Conclusion.** Ce travail met en évidence des différences phénotypiques et génotypiques parmi les virus issus du réservoir de patients traités. La caractérisation des ces virus compétents pour la réplication est cruciale pour établir des stratégies de réduction de la taille du réservoir ou pour prévenir le rebond de la charge virale.

## P56

### Le virus d'Epstein-Barr est fréquemment clonal et latent dans les lymphomes T angioimmunoblastiques

Racha Bahri, François Boyer, Arnaud Jaccard, Jean Feuillard<sup>1</sup>, Sylvie Rogez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Contrôle de la réponse immunitaire B et des lymphoproliférations (CRIBL), Université de Limoges, CNRS UMR7276, GEIST : Génomique, environnement, immunité, santé, thérapeutique : FR3503, Faculté de médecine 2, rue du docteur Marcland 87025 Limoges cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire Virologie CHU Dupuytren, CHU Limoges, 2 avenue Martin Luther King 87000 Limoges, France

<sylvie.rogez@unilim.fr>

**Buts du travail.** Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus humain qui infecte plus de 90 % de la population mondiale. Il est décrit comme associé à plusieurs pathologies cancéreuses humaines comme les carcinomes nasopharyngés et gastriques et divers lymphomes, tels le lymphome de Burkitt, les lymphomes NK/T et certains lymphomes de Hodgkin. Deux types d'EBV existent : le type 1 et le type 2. Le lymphome T angio-immunoblastique (LAI) est une forme peu fréquente agressive de lymphome nodal T de mauvais pronostic. Il s'agit d'un cancer des cellules T helper folliculaires TFH, contenant souvent des cellules B porteuses de l'EBV. Le rôle de l'EBV dans la pathogénèse de cette maladie reste inconnu. Dans ce contexte, notre travail avait pour objectif de déterminer si l'EBV associé au LAI présentait une particularité laissant envisager son rôle dans cette pathologie. Pour ce faire, nous avons étudié la séquence complète de l'EBV au sein d'adénopathies de LAI et comparé les résultats à ceux obtenus pour d'autres lymphomes (B, NK/T) ainsi qu'aux séquences publiées.

**Méthodes.** Le séquençage a tout d'abord été réalisé sur 7 lignées cellulaires positives pour l'EBV (5 lignées B et 2 lignées NK/T), afin de valider la technique. Il a ensuite été appliqué aux adénopathies de 40 patients atteints de syndrome lymphoprolifératif dont 20 souffraient de LAI, et 2 contrôles. Pour chaque LAI, les clonalités B et T ont été déterminées. L'enrichissement en génome viral a été réalisé par capture à l'aide de sondes spécifiques du génome de l'EBV. Les librairies ont été synthétisées selon le protocole *NimbleGen Seqcap EZ library SR*, et séquencées sur les plate-formes *Illumina Miseq* ou *Nextseq*. Dans un deuxième temps, l'assemblage *de novo* des *reads* a été réalisé (*ViraAmp*, *Galaxy*) et la séquence complète du virus majoritaire a été déterminée pour chaque échantillon. La comparaison aux séquences de référence a été réalisée sur la plateforme *Galaxy*, permettant le typage viral et la détection des positions mutées. La détermination de la clonalité virale a été réalisée selon la méthode de Kwok (*J. Virol.* 2014). La charge virale EBV *et albumine*, réalisée par qPCR, a permis de déterminer l'état latent ou répliquatif du virus.

**Résultats.** Différentes souches virales ont été trouvées dans les LAI, mais 2 lignages ont pu être distingués. Les souches présentaient un profil proche de ce qui était obtenu pour les autres lymphomes. Seul 1 patient présentait un EBV de type 2. Les régions les plus mutées étaient les gènes de latence et tout particulièrement les épitopes reconnus par les cellules CD4+ ou CD8+. Dans tous les cas de LAI, le virus a été trouvé clonal et presque toujours latent, ceci même lorsque les lymphocytes B étaient polyclonaux.

**Conclusion.** Ces résultats semblent en faveur d'un rôle participatif de l'EBV dans les LAI. Les mutations très fréquentes observées sur les gènes de latence pourraient jouer un rôle important dans l'échappement au système immunitaire du virus dans ce contexte multicellulaire complexe.

## P57

### Infection, réplication et transmission inter-synaptique du Coxsackievirus B4 dans les cultures primaires de neurones

Habib Jmii

Laboratoire des maladies transmissibles et substances biologiquement actives, Faculté de pharmacie de Monastir, 5 avenue Avicenne, Monastir 5000, Tunisie  
<habibjmai87@yahoo.com>

Les Coxsackievirus de type B (CV-B) sont connus par leur neurotropisme. Ils se transmettent principalement par voie fécale orale. En premier temps, le virus se réplique au niveau du système gastro-intestinal. Par la suite, il gagne le SNC par voie sanguine. La propagation des CV-B via les voies neuronales n'avait jamais été étudiée. Ainsi, ce travail est une tentative d'explorer la diffusion du CV-B4 par voie neuronale. L'idée consiste à cultiver deux types de cellules neuronales et non neuronales, une culture primaire des neurones et de fibroblastes isolés d'embryons de souris Swiss Albinos, les infecter par CV-B4 en absence et en présence d'anticorps neutralisants et comparer la cinétique de l'infection (titrage de particules virales infectieuses, détermination par cytométrie en flux du pourcentage des cellules infectées). La viabilité cellulaire pour les 2 types de culture a été également étudiée par le billet du test MTT et la coloration acridine orange/BET. En absence d'anticorps neutralisants, les neurones produisaient moins de particules virales infectieuses, elles ont été moins touchées par l'infection et présentaient moins de mortalité par rapport aux cellules fibroblastiques.

Inversement, en présence d'anticorps neutralisants les neurones produisaient des quantités plus importantes de particules infectieuses en comparaison avec les fibroblastes. Au bout de 96 heures post-infection, nous sommes parvenus à détecter des particules virales infectieuses dans les surnageants de culture de cellules neuronales contrairement aux fibroblastes qui ont cessé de libérer de particules infectieuses 48 heures post-infection. En outre, les neurones ont été plus touchés par l'infection et présentaient plus de mortalité par rapport aux fibroblastes. Ces résultats suggèrent une transmission inter-synaptique de CV-B4 ce qui laisse penser à une transmission par voies neuronales de CV-B pour atteindre le SNC. Reste à déterminer les effets d'une telle transmission sur le fonctionnement des synapses.

## P58

### Le CPXV, responsable d'une mort fœtale ?

Audrey Ferrier-Rembert<sup>1</sup>, Gaëlle Frenois-Veyrat<sup>1</sup>, Evelyne Schvoere<sup>2</sup>, Sandrine Henar<sup>2</sup>, Fanny Jarjaval<sup>1</sup>, Isabelle Drouet<sup>1</sup>, Hawa Timera<sup>1</sup>, Laetitia Boutin<sup>1</sup>, Christophe Peyrefitte<sup>1</sup>, Olivier Ferraris<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), Ministère des armées, 1 place Valérie André 91220 Brétigny-sur-Orge, France

<sup>2</sup> Hôpital central [CHRU Nancy], 29 avenue du Maréchal de Lattre-de-Tassigny 54035 Nancy, France

<olivier.ferraris@irba.fr>

Les infections humaines à cowpox virus sont rares mais de plus en plus fréquentes depuis l'éradication de la variole et l'arrêt de la vaccination antivariolique, ceci dû à la protection croisée. La présentation clinique

d'une maladie à cowpox virus (CPXV) est le plus souvent dermatologique. Cependant, des cas d'infections oculaires, génitales et pulmonaires ont été rapportés ainsi que des formes disséminées, notamment chez des patients immunodéprimés et sur des terrains de dermatoses préexistantes. Ces dernières années, plusieurs infections cutanées à CPXV ont été rapportées, principalement dues à des transmissions par des rats et chats domestiques. Ces infections majoritairement bénignes sont sous-diagnostiquées car méconnues. En juillet 2017, une jeune patiente, enceinte, avec des lésions noirâtres isolées sur la main et le visage et présentant une forte fièvre (39 °C), a été admise à l'hôpital Brabois de Nancy. Initialement traitée pour une surinfection bactérienne, les analyses réalisées à partir d'une biopsie cutanée de pustule ont mis en évidence une infection à orthopoxvirus et plus précisément à CPXV. Sept jours après l'admission à l'hôpital, la mort du fœtus *in utero* fût constatée. L'analyse des prélèvements vaginaux, de plasma, de fœtus, a permis la mise en évidence d'un CPXV dont plusieurs souches circulent en France et notamment dans la région de Nancy.

Durant les nombreuses années de vaccination antivariolique sur la population mondiale, seulement une cinquantaine de cas de vaccine foetale (infection du fœtus par le virus de la vaccine) ont été reportées dont 3 aux États-Unis. Cependant, à notre connaissance, aucun cas d'infection foetale par le virus du cowpox n'a été décrit ce jour. L'étude fournit ici des informations supplémentaires importantes sur un cas rare d'infection foetale à CPXV et l'observation d'une virémie, chez une femme enceinte.

## P59

Annulé

## P60

### Caractérisation de lagovirus génétiquement distincts des lagovirus pathogènes du lièvre EBHSV chez des lièvres européens (*Lepus Europaeus*)

Clément Droillard<sup>1</sup>, Evelyne Lemaitre<sup>1</sup>, Marina Chatel<sup>1</sup>, François-Xavier Briand<sup>1</sup>, Stéphane Marchandeu<sup>2</sup>, Jean-Sébastien Guiton<sup>2</sup>, Ghislaine Le Gall-Reculé<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Uvipac, BP53, 22440 Ploufragan, France.

<sup>2</sup> Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS), Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS), Département de recherche, Unité faune de plaine, CS 42355, 44323 Nantes cedex 3, France <clement.droillard@anses.fr>

Le virus du syndrome du lièvre brun européen (*European Brown Hare Syndrome Virus*, EBHSV) est un calicivirus appartenant au genre *Lagovirus*, génotype GII.1. Ce virus, caractérisé pour la première fois en Suède en 1980, infecte le lièvre européen et moins fréquemment le lièvre variable et le lièvre corse. L'EBHSV provoque des nécroses hépatiques et une coagulation intravasculaire et est responsable de mortalités importantes chez ses hôtes. Le génogroupe GI des *Lagovirus* comprend un génotype de lagovirus pathogènes des lapins domestiques et sauvages du genre *Oryctolagus cuniculus* (GI.1), les virus de la maladie hémorragique virale du lapin (*Rabbit Hemorrhagic Disease Virus*, RHDV) initialement décrits en Chine en 1984. En 2010, un nouveau génotype pathogène pour les *O. cuniculus* et plusieurs espèces de lièvres a émergé (RHDV2, GI.2). D'autres génotype de lagovirus du lapin, appelés *Rabbit calicivirus* (RCV) et n'induisant ni mortalité ni signe clinique chez les lapins, ont été caractérisés. Le projet européen Anihwa « ECALEP » cherche à comprendre et à prédire l'émergence des lagovirus pathogènes chez les léporidés (lapins et lièvres). Une des hypothèses étudiées est l'évolution génétique de lagovirus non pathogènes (NP) vers les formes pathogènes. Comme pour le lapin, l'existence de lagovirus NP dans les populations de lièvres a été soupçonnée après la découverte d'animaux sains séropositifs vis-à-vis de l'EBHSV. Le premier lagovirus NP du lièvre a été récemment caractérisé

en Italie sur des lièvres nés et élevés dans un élevage et ne présentant aucun signe clinique. Ce virus proche des EBHSV mais génétiquement et antigéniquement distinct a été nommé HaCV (*Hare calicivirus*). Parallèlement, nous avons recherché la présence d'HaCV dans 185 échantillons de lièvres tués à la chasse sur tout le territoire français en 2015. Des échantillons de lièvres (14) morts sans diagnostic d'EBHS en 2014 ont été ajoutés. Une RT-PCR de criblage permettant d'amplifier une portion du gène codant la protéine de capsid VP60 de tout génotype de lagovirus a été utilisée. Le génotypage des lagovirus a été réalisé par séquençage et 20 HaCV ont été identifiés. L'obtention de la séquence complète du gène codant la VP60 a été obtenue pour 11 d'entre eux. L'analyse phylogénétique a montré que ces séquences se plaçaient avec la séquence italienne et à l'écart des autres lagovirus dans un cluster plus proche des EBHSV que des RHDV mais distinct, confirmant que les HaCV correspondent à un nouveau génotype au sein du GII. Notre étude a montré la grande diversité génétique des HaCV (jusqu'à 20 %) et l'existence probable de plusieurs génotypes. La première séquence de génome entier d'HaCV a été obtenue. Elle a révélé une organisation génomique similaire à celle des autres lagovirus et une divergence nucléotidique de 22 % avec les EBHSV. L'ancêtre commun le plus récent du gène VP60 des EBHSV et des HaCV est daté avant l'émergence des EBHSV. Cependant, la séparation phylogénétique et le faible pourcentage d'homologie existant entre les EBHSV et les HaCV caractérisés à ce jour ne sont pas en faveur de l'hypothèse de l'origine de l'EBHSV à partir de ces HaCV.

#### P88

##### Caractérisation de la réponse immunitaire innée de kératinocytes primaires humains à l'infection par le virus West Nile

Magali Garcia<sup>1,2</sup>, Céline Chessa<sup>1,2</sup>, Charles Bodet<sup>2</sup>, Nicolas Leveque<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> Laboratoire de virologie et mycobactériologie, CHU de Poitiers, France  
<sup>2</sup> Litec EA4331, Faculté de médecine et de pharmacie, Université de Poitiers, Université de Poitiers, France  
 <nicolas.leveque@chu-poitiers.fr>

La peau constitue le site d'inoculation et le site initial de réplication du virus West Nile (WNV) dans l'organisme, préalable à sa diffusion systémique. Paradoxalement, elle représente également la première ligne de défense rencontrée par le virus au cours de l'infection. Les kératinocytes, qui constituent 90 % des cellules résidentes de l'épiderme, disposent en effet de l'arsenal nécessaire à la détection des arbovirus *via* des *Pattern Recognition Receptors* (PRR) et à la mise en œuvre d'une réponse immunitaire innée antivirale, impliquant des gènes stimulés par l'interféron (ISG) et des peptides antimicrobiens (PAM). Néanmoins, malgré leur potentiel antiviral majeur, les capacités de synthèse du kératinocyte en ISG et PAM sont encore à ce jour incomplètement connues. L'objectif de ce travail était de caractériser la réponse immunitaire innée de kératinocytes primaires humains à l'infection par le virus West Nile. Des kératinocytes issus de pièces opératoires d'abdominoplasties de trois patients différents ont été infectés à une MOI de 10 pour une souche de West Nile de lignage 1 isolée d'un encéphale humain en Tunisie en 1997 (Dr Isabelle Leparç Goffart, CNR Arbovirus). Le surnageant de culture et la nappe cellulaire ont été recueillis à 0, 24 et 48 h pour, respectivement, une quantification virale par RT-qPCR et une analyse transcriptomique *full-genome* de la réponse cellulaire à l'infection en utilisant le kit GeneChip 3' IVT Plus (Affymetric, High Wycombe, Great Britain). La mesure de la charge virale a montré une réplication virale maximale, atteignant 10<sup>8</sup> copies par millilitre de surnageant, pendant les 24 premières heures de l'infection confirmant la perméabilité des kératinocytes primaires humains au WNV. Parmi les 20 000 gènes cellulaires testés en réponse à l'infection, 500 étaient surexprimés d'un facteur supérieur à 5 à 24 h. Quatre-vingt-six d'entre eux étaient des ISG incluant ceux codant trois protéines de la famille des PAMP (poly-ADP-ribose polymerases) dont le rôle anti-WNV n'a jusqu'ici jamais été étudié. À l'inverse, à 48 h d'infection, l'expression de 53 gènes était réprimée d'un facteur supérieur à 4 par rapport aux cellules non infectées. Parmi ceux-ci, 3 codaient des PAM de la famille S100 pouvant constituer un mécanisme ciblé d'échappement à la réponse antivirale de l'hôte. En conclusion, ce

travail a permis la caractérisation de la réponse inflammatoire du kératinocyte humain à l'infection par le WNV. Une analyse similaire doit encore être conduite dans d'autres types cellulaires du derme et de l'épiderme afin de définir la totalité du spectre des peptides et protéines produits par la peau en réponse à l'infection. Ces molécules, dont il faudra encore tester l'activité antivirale, pourraient servir de base à la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les arbovirus permettant de bloquer l'infection à sa porte d'entrée dans l'organisme.

#### P89

##### Modulation de la réplication virale et de la réponse immunitaire innée par la salive de moustique au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains par le virus West Nile

Magali Garcia<sup>1,2</sup>, Fodé Diop<sup>3</sup>, Dorothée Misse<sup>3</sup>, Haoues Alout<sup>4</sup>, Mylène Weill<sup>4</sup>, Charles Bodet<sup>2</sup>, Nicolas Leveque<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de virologie et mycobactériologie, CHU de Poitiers

<sup>2</sup> Litec EA4331, Faculté de médecine et de pharmacie, Université de Poitiers, Université de Poitiers

<sup>3</sup> Mivegec (UM-IRD 224-CNRS 5290), Institut de recherche pour le développement-IRD, France

<sup>4</sup> Institut des sciences de l'évolution [Montpellier] (ISEM), Université de Montpellier, Institut de recherche pour le développement [IRD] UR226, CNRS UMR5554, place E. Bataillon CC 064 34095 Montpellier cedex 05, France

<nicolas.leveque@chu-poitiers.fr>

La peau est le point d'entrée dans l'organisme du virus West Nile, un arbovirus émergent responsable de symptômes neurologiques. Le virus est inoculé dans l'épiderme et le derme de l'hôte par la piqure de moustique au cours du repas sanguin. Le kératinocyte, qui représente 90 % des cellules de l'épiderme, constitue ainsi la première ligne de défense de l'organisme contre l'infection par le déclenchement d'une réponse immunitaire innée. Cependant, au cours du sondage à la recherche de vaisseaux sanguins, le moustique vecteur inocule également sa salive, principalement dans l'espace extra-vasculaire. Il a été montré que les peptides et les protéines contenus dans cette salive neutralisaient la réponse hémostatique et altéraient la réponse immunitaire innée à l'infection, diminuant les niveaux de synthèse des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, à l'origine d'une immunosuppression ou d'une dérégulation locale à même d'augmenter la réplication virale et de faciliter la dissémination du virus dans l'organisme. Néanmoins, des données controversées ont été publiées concernant l'effet proviral de la salive de moustique au cours de l'infection par le WNV dans des modèles animaux tels que le poulet, la souris et le hamster. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer l'effet de la salive de moustiques sur la réplication virale et la réponse immunitaire innée des kératinocytes primaires humains infectés par le WNV. Un extrait salivaire d'*Aedes aegypti* à la concentration finale de 0,5 µg/mL a été ajouté à des kératinocytes primaires humains infectés par le WNV à une MOI de 1. Le surnageant de culture et la nappe cellulaire ont été recueillis à 24 et 48 h post-infection (p.i.) afin de mesurer par RT-qPCR la réplication virale et l'expression de marqueurs cellulaires de la réponse inflammatoire. À 24 h p.i. en présence de salive de moustique, une inhibition significative de la réplication virale était observée dans le surnageant de culture comme dans la nappe cellulaire. En revanche, après 48 h d'infection, la charge virale mesurée dans les puits contenant l'extrait salivaire était plus élevée d'un log que celle mesurée dans les puits contenant des kératinocytes infectés en l'absence de salive. L'expression des ARN messagers codant IRF7, IFIT2, IL-28A et CXCL10 comme celle des PRR TLR3, RIG-I et MDA5 était significativement réduite après 24 h dans les cellules traitées. Après 48 h d'infection, il n'existait, en revanche, plus de modulation constatée de la réponse inflammatoire par la salive de moustique. Nos données suggèrent donc un rôle proviral, facilitateur de la salive d'*Aedes* à travers la modulation de la réponse immunitaire innée des kératinocytes primaires humains et l'augmentation de la réplication virale au cours des premières étapes de l'infection par le WNV. D'autres études utilisant la salive de moustiques du genre *Culex*, vecteurs principaux du WNV, sont actuellement en cours.