



**HAL**  
open science

# Étude et développement de nouvelles méthodes de génétique inverse appliquées aux Arbovirus

Jean-Sélim Driouich

► **To cite this version:**

Jean-Sélim Driouich. Étude et développement de nouvelles méthodes de génétique inverse appliquées aux Arbovirus . Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01537911

**HAL Id: dumas-01537911**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01537911>**

Submitted on 13 Jun 2017

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

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

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET  
RECHERCHE

Soutenu le Vendredi 9 Juin 2017

Par **Jean-Sélim DRIOUICH**  
Né le 12 septembre 1990

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988  
tenant lieu de

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE

**Etude et développement de nouvelles méthodes de  
génétique inverse appliquées aux Arbovirus**

**JURY :**

Président : M. le Professeur Pascal RATHELOT  
Membres: M. le Professeur Mohamed SKIBA  
M. le Docteur Antoine NOUGAIREDE  
Mme. le Docteur Laetitia NINOVE  
M. le Docteur Simon-Djamel THIBERVILLE

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Thierry TERME
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, M. Alain NICOLAY, Mme Pascale PISANO
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeur émérite :</i>	M. José SAMPOL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. André ARNOUX, M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, M. Daniel GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI, M. Jean-Claude SOYFER, M. Alain VIALA
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	M. Eric ABELA

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Jean-Pierre REYNIER

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Yves BARRA
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Jean-Pierre REYNIER M. Philippe PICCERELLE

### MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra AURRAND-LIONS

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI-BOUKHALED

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

### ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

### DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

### PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

### MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI  
M. Thierry AUGIER  
M. Edouard LAMY  
Mme Alexandrine BERTAUD  
Mme Claire CERINI  
Mme Edwige TELLIER  
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Nathalie BARDIN  
Mme Dominique ARNOUX  
Mme Aurélie LEROYER  
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET  
M. Michel DE MEO  
Mme Anne DAVIN-REGLI  
Mme Véronique ROUX  
M. Fadi BITTAR  
Mme Isabelle PAGNIER

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO  
M. Aurélien DUMETRE  
Mme Magali CASANOVA  
Mme Anita COHEN

**A.H.U.**

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Sylvie COINTE

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

**ATER**

MICROBIOLOGIE

M. Emmanouil ANGELAKIS

**DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

**PROFESSEURS**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Henri PORTUGAL  
Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –  
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT  
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE  
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

**PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)**

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE  
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Christiane ODDOZE Mme Elisabeth SASTRE Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Catherine DIANA Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Thierry ATHUYT
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	M. Philippe BESSON

**AHU**

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	Mme Manon ROCHE
---------------------------------	-----------------

**ATER**

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Sébastien REDON
---------------------------------	--------------------

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**  
Responsable : Professeur Pascale PISANO

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	Mme Pascale PISANO
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL M. Benjamin GUILLET
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE
-----------------	--------------------

**ATER**

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

## CHARGES DE COURS A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le, 1<sup>er</sup> janvier 2014

## *Remerciements*

*La réalisation de ce travail de Diplôme d'Etudes Spécialisées en Innovation Pharmaceutique et Recherche a été possible grâce à l'UMR Emergence des Pathologies Virales (IRD 190 – Inserm 1207) de la Faculté de Médecine de Marseille.*

*A Monsieur le Professeur Pascal RATHELOT,*

*Je vous remercie d'avoir accepté de présider mon Jury de Thèse. Je vous remercie pour votre accueil et les informations prodiguées lors de mon arrivée sur Marseille.*

*A Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE,*

*Je te remercie d'avoir accepté de diriger ces travaux de Thèse. Je te remercie infiniment pour l'ensemble de tes conseils, pour ta patience, ta compréhension et pour tout le temps que tu m'as accordé.*

*A Madame le Docteur Laetitia NINOVE,*

*Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce Jury de Thèse.*

*A Monsieur le Professeur Mohamed SKIBA,*

*Je te remercie de participer à ce Jury de Thèse, j'espère que ces travaux t'auront intéressé. Merci aussi pour ton humour et ta bonne humeur dégagée lors de tes enseignements de pharmacie galénique.*

*A Monsieur le Docteur Simon-Djamel THIBERVILLE,*

*Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce Jury de Thèse. Merci de m'avoir conseillé et ouvert les portes de ce laboratoire.*

*A ma maman, merci pour tout. Malgré nos quelques différends, tu es la personne que j'aime et que je respecte le plus au monde. Il n'existe pas encore de mots assez forts pour exprimer tout l'amour que j'ai pour toi.*

*A mon papa, merci pour tout ce que tu m'as transmis. Tu es la personne qui a eu le plus d'influence dans ma vie, tu m'as forgé, tu es mon modèle, tu m'inspires. Merci d'avoir relu ce manuscrit et Merci pour le foot. Je t'aime trop fort.*

*A mon frère, merci d'être mon PETIT frère. Même si les chamailleries étaient courantes dans notre enfance, même si maintenant je ne comprends rien quand tu parles de tes études, je t'aime profondément (sauf si tu deviens un ripou !).*

*A ma petite sœur chérie, merci d'être là tout simplement. Je serai toujours présent pour toi, tu peux me demander n'importe quoi. Tu es mon rayon de soleil !! Je t'aime plus que tout !*

*A ma famille, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes, mes cousins, mes cousines, que vous soyez au pays Armoricaïn, au royaume Chérifien ou au sein de la ville lumière, je vous aime. Certes on ne choisit pas sa famille, mais si j'avais eu à choisir j'aurais opté pour celle-ci sans aucune hésitation. Merci pour ce que vous êtes.*

*Je remercie également les membres de mon équipe de recherche :*

*Le Professeur Xavier de LAMBALLERIE pour m'avoir accepté au sein de son équipe et pour la qualité de ses expertises scientifiques.*

*Le Docteur Fabien AUBRY, pour sa disponibilité et ses nombreux coups de pouce, pour cette soirée imprévue dont Steph se souviendra longtemps, pour ces parties de squash, ces rires et sa grande gueule.*

*Les Doctorants Souand MOHAMED ALI, Thérèse ATIEH, Diala AYOUBI et Abdenour AMROUN (dit « papa ») pour leur écoute et toutes les discussions que nous avons eues avoir.*

*Magali GILLES, Géraldine PIORKOWSKI, Karine BARTHELEMY, Morgan SESTON et Jean-Marc HASELOFF pour leur aide à tout instant et, pour certains, la réalisation de quelques manips.*

*Gregory MOUREAU pour la confiance qu'il me porte et pour avoir réalisé une grande partie des expériences animales.*

*Cécile BARONTI et Boris PASTORINO pour leur bêtise permanente.*

*Stéphane PRIET et Franck TOURET (« Tic et Tac ») pour avoir pris le temps de répondre à chacune de mes questions.*

*Mes voisins, Odile PY (« Let it be »), Iban CORCOSTEGUI (« Le bal masqué ») et Raphaëlle KLITTING (Ministre de la Transition écologique et solidaire) pour tous les fous rires qu'on a eus et surtout pour me supporter au jour le jour.*

*Merci à tous les autres membres de l'équipe du Laboratoire d'Emergence des Pathologies Virales (UMR 190) que je n'aurais pas cité ici. Chacune de ces rencontres a été pour moi unique.*

*Merci à toutes les personnes de la Faculté de Marseille qui m'ont aidé et soutenu tout au long de mon internat.*

*Merci à toutes les personnes de la Faculté de Rouen qui m'ont accompagné au cours de mes premières années d'étude en pharmacie.*

*Merci à toutes les personnes qui m'ont encadré lors de mes stages : la pharmacie de Quincampoix et Francis DURAN, le laboratoire COBRA et Hassan OULYADI, le « Department of Food Science and Human Nutrition », Tiffany WEIR et Aaron MAGNUSON.*

*A mes amis de longue date, JB, David, Alex, Soso, Tibel, Lolo, Max, Thom, Valou, Momo, Anto, Bricou, Loulou, ne changez rien ! Je suis fier qu'on est fait les 400 coups ensemble ! Vous êtes la bande de potes que je n'aurais jamais imaginée avoir ! Merci d'être ma deuxième famille...*

*A tous les gens que j'ai rencontré au PQFC, les jeunes comme les moins jeunes. Par vous, ce club a énormément compté pour moi. Merci d'avoir vécu cette aventure sportive avec moi.*

*A mes amis de la faculté de Pharmacie de Rouen, Milan, JCH, Benoit, Dubuc, Hélène, Clairou, Zaz, Tiphaine, Sophie, Kathleen, Manon, Lou, Benji, Amandine et tous les autres. Merci pour les moments studieux. Merci, surtout, pour les moments moins studieux.*

*A mes fanfarons que j'apprends encore à découvrir. Merci d'incarner la joie de vivre.*

*A mes amis internes de Marseille (dont certains sont devenus bien plus que de simples amis) :*

*Merci Vincou pour tes convictions alimentaires et pour « Shark Nail »*

*Merci Louise d'être notre « maman IPR » à tous, pour être ma confidente et pour m'avoir toujours soutenu dans les bons et les mauvais moments. Je te dois beaucoup.*

*Merci Evariste d'être mon « papa d'asso », pour m'avoir fait découvrir énormément de choses, pour toutes les bonnes et mauvaises idées qu'on a eues.*

*Merci Geoffroy d'être mon « deuxième papa d'asso » et pour avoir débarqué à Marseille afin d'éviter que je coule l'AIPM.*

*Merci Omar pour les soirées où tu me fais faire n'importe quoi et pour ta moustache.*

*Merci Arnaud et ton cerveau entier équivalent au quart du mien !*

*Merci à tous mes copains de l'AIPM, Rémi, Pierre, Lucie, Héloïse, Juliette, Mayeul, Anne-Line, Camille, Lisa, Léa, Noémie, Claire, William, Damien, Thomas, Lucie, Baptiste, Vincent, Emilie, Maëva, Léonard, Noureddine, Robin, Tristan, JB, Thomas etc... pour ces 3 années de folies.*

*Merci Alice, Julie, Célia, Doriane, Anne-Camille, Estelle, Clémence, Florence, Pauline, Chloé, Maude, Thibault, Julien, Jordan, Maxime, Adrien, Xavier pour tous les moments inoubliables passés ensemble.*

*Au bureau 2016/2017 de la FNSIP-BM, Clément (mon 3<sup>ème</sup> papa d'asso), JV (chasse pêche et tradition), Christel (la force tranquille), Morgane (Mormoul au grand cœur), Max (mon Max), Adrien (la disparition), Nico (l'apparition), Hugo (mon copain IPR), Aurélie (ma chérie), Terry (mon trou dans le budget), Tinou (le BG), Christelle (la trop discrète) et Anas (le timide). Vous savez déjà tous ce que je pense de vous. Merci pour cette année MAGIQUE !*

*A tous les autres internes de Marseille et de France que j'ai pu rencontrer dans des moments plus ou moins sérieux. Merci pour ces rencontres.*

*“Man often becomes what he believes himself to be. If I keep on saying to myself that I cannot do a certain thing, it is possible that I may end by really becoming incapable of doing it. On the contrary, if I have the belief that I can do it, I shall surely acquire the capacity to do it even if I may not have it at the beginning.”*

*“By opposing hate to hate, we only spread it on the surface and in depth.”*

*Mohandas Karamchand Gandhi*

**« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES  
DANS LES THESES. CES OPINIONS DOIVENT ETRE  
CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS »**

# *Table des matières*

<b>Remerciements .....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des Abréviations .....</b>	<b>18</b>
<b>Table des Illustrations .....</b>	<b>20</b>
<b>Prologue .....</b>	<b>22</b>
<b>Chapitre I : Généralités .....</b>	<b>25</b>
<i>Partie A : Le virus du Chikungunya.....</i>	<i>26</i>
1. Historique et situation épidémiologique .....	26
2. Classification et structure .....	27
3. Les cycles du virus .....	29
3.1. Cycle de réplication viral .....	29
3.2. Cycle naturel .....	30
4. Les syndromes cliniques .....	31
5. Les thérapies.....	32
5.1. Thérapies antivirales .....	32
5.2. Perspectives vaccinales .....	33
<i>Partie B : Le virus de l'encéphalite à tiques.....</i>	<i>34</i>
1. Historique et situation épidémiologique .....	34
2. Classification et structure .....	34
3. Les cycles du virus .....	37
3.1. Cycle de réplication viral .....	37
3.2. Cycle naturel .....	38
4. Les syndromes cliniques .....	39
5. Les thérapies.....	40
5.1. Thérapies antivirales .....	40
5.2. Vaccins .....	40
<i>Partie C : Les systèmes de génétique inverse .....</i>	<i>41</i>
1. Introduction .....	41
2. Les différents systèmes de génétique inverse .....	42
2.1. Le clone infectieux .....	42
2.1.1. Production d'ADNc.....	42

2.1.2. L'hôte .....	43
2.1.3. Le vecteur .....	43
2.1.4. Le promoteur .....	44
2.1.5. Les limites de l'utilisation de clones infectieux .....	45
2.2. Les approches « bacteria-free » .....	45
3. Relation entre les systèmes de génétique inverse et les populations virales .....	47
4. Quelques exemples d'utilisation .....	47
<b>Chapitre II : Etude du génotype et du phénotype des virus produits par génétique inverse .....</b>	<b>49</b>
<i>Introduction</i> .....	50
<i>Matériels et méthodes</i> .....	52
<i>Partie A : Impact de la méthode ISA sur les populations virales</i> ....	56
1. Matériels et méthodes spécifiques.....	56
2. Résultats .....	58
3. Discussion .....	65
<i>Partie B : Nouvelles perspectives</i> .....	67
1. Fidélité des polymérase .....	67
1.1. Matériels et méthodes spécifiques.....	67
1.2. Résultats .....	69
1.3. Discussion .....	73
2. « Clonal-ISA » .....	74
2.1. Matériels et méthodes spécifiques.....	74
2.2. Résultats .....	76
2.3. Discussion .....	78
<b>Conclusion Générale.....</b>	<b>80</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>83</b>

## *Liste des Abréviations*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**Arbovirus** : Arthropod-Borne Virus, virus transmis par un Arthropode

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ARS** : Agence régionale de santé

**BLAST** : Basic local alignment search tool

**C** : Protéine de capsid

**CAB** : Chromosome artificiel bactérien

**CAL** : Chromosome artificiel de levure

**CHIKV** : Virus du Chikungunya

**CI** : Clone infectieux

**Ct** : Cycle threshold

**dNTP** : Désoxyribonucléotides tri-phosphate

**E** : Protéine d'enveloppe

**ECP** : Effet cytopathogène

**Extrémité NTR** : Extrémité non-traduite

**FBS** : Fetal bovine serum

**Gln** : Glutamine

**HBSS** : Hank's balanced salt solution

**ISA** : Infectious subgenomic amplicons

**M** : Protéine de membrane

**MEGA** : Molecular evolutionary genetics analysis

**MEM** : Milieu essentiel minimal

**NGS** : New generation sequencing

**NS** : Protéine non-structurale des Flavivirus

**nsP** : Protéine non-structurale des Alphavirus

**OptiMEM** : Milieu essentiel minimal optimal

**ORF** : Open reading frame (cadre de lecture ouvert)

**P/S** : Pénicilline/Streptomycine

**PBS** : Phosphate buffer saline

**pCMV** : Promoteur du cytomégalovirus

**PCR** : Polymerase chain reaction

**Poly A** : Signal de polyadénylation

**prM** : Précurseur de la protéine de membrane

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RT-PCR** : Reverse transcriptase PCR

**RT-qPCR** : Reverse transcriptase quantitative PCR

**SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise

**SNC** : Système nerveux central

**SVF** : Sérum de veau fœtal

**TBEV** : Virus de l'encéphalite à tiques

**TCID<sub>50</sub>** : 50% tissue culture infective dose

**UA** : Unité arbitraire

**URSS** : Union des républiques socialistes soviétiques

**VIH** : Virus de l'immunodéficience Humaine

## *Table des Illustrations*

<b>Figure 1 :</b>	Structure des Alphavirus .....	27
<b>Figure 2 :</b>	Structure du génome viral du Chikungunya .....	28
<b>Figure 3 :</b>	Cycle de réplication du Chikungunya .....	30
<b>Figure 4 :</b>	Cycles naturels du virus .....	31
<b>Figure 5 :</b>	Structure des Flavivirus .....	35
<b>Figure 6 :</b>	Structure du génome viral du Virus de l'encéphalite à tiques .....	36
<b>Figure 7 :</b>	Cycle de réplication des Flavivirus .....	37
<b>Figure 8 :</b>	Cycle de vie de la tique et transmission aux mammifères .....	38
<b>Figure 9 :</b>	Procédure générale de construction et de transfection d'un clone infectieux .....	44
<b>Figure 10 :</b>	Procédure générale pour la méthode ISA .....	46
<b>Figure 11 :</b>	Schéma général des méthodes "Clone Infectieux, CI" et "Infectious Subgenomic Amplicons, ISA" .....	50
<b>Figure 12 :</b>	Nombre de mutations pour les virus WTchik, *WTchik et WTtbe .....	59
<b>Figure 13 :</b>	Nombre et caractéristiques des mutations pour les virus WTchik, *WTchik et WTtbe .....	59
<b>Figure 14 :</b>	Sites et caractéristiques des mutations des virus WTchik et *WTchik sur le génome du virus du Chikungunya .....	60
<b>Figure 15 :</b>	Sites et caractéristiques des mutations des virus WTtbe sur le génome du virus de l'encéphalite à tiques .....	60
<b>Figure 16 :</b>	Taux d'ARN viral et titres infectieux pour les virus WTchik, *WTchik et WTtbe .....	61
<b>Figure 17 :</b>	Compétitions représentées par le ratio virus « ISA » / virus « CI » .....	62
<b>Figure 18 :</b>	Evolution du titre infectieux des virus $\Delta$ WTchik .....	62
<b>Figure 19 :</b>	Nombre de mutations par passage pour les virus $\Delta$ WTchik .....	63
<b>Figure 20 :</b>	Courbe de survie des animaux infectés par les virus WTtbe .....	64
<b>Figure 21 :</b>	Taux d'ARN viral relatif des virus WTtbe dans les organes de souris .....	64
<b>Figure 22 :</b>	Nombre de mutations pour les virus WTtbe .....	69
<b>Figure 23 :</b>	Nombre et caractéristiques des mutations pour les virus WTtbe .....	70
<b>Figure 24 :</b>	Sites et caractéristiques des mutations des virus WTtbe sur le génome du virus de l'encéphalite à tiques .....	70
<b>Figure 25 :</b>	Taux d'ARN viral et titres infectieux pour les virus WTtbe .....	71
<b>Figure 26 :</b>	Courbe de survie des animaux infectés par les virus WTtbe .....	72
<b>Figure 27 :</b>	Taux d'ARN viral relatif des virus WTtbe dans les organes de souris .....	72
<b>Figure 28 :</b>	Schéma général comparatif des méthodes "Clone Infectieux, CI", "Infectious Subgenomic Amplicons, ISA" et "clonal-ISA, cISA" .....	75
<b>Figure 29 :</b>	Nombre de mutations pour les virus *WTchik .....	76
<b>Figure 30 :</b>	Nombre et caractéristiques des mutations pour les virus *WTchik .....	77
<b>Figure 31 :</b>	Sites et caractéristiques des mutations des virus *WTchik sur le génome du virus du Chikungunya .....	77
<b>Figure 32 :</b>	Taux d'ARN viral et titres infectieux pour les virus *WTchik .....	78

## *Prologue*

Aujourd'hui, nous sommes plus de 7 milliards d'habitants sur la planète. Nous nous entassons dans des mégapoles qui s'étendent horizontalement et verticalement, année après année. Cette proximité entre être vivants, animaux et humains, est propice à l'expansion de tout type d'épidémie. Une grande pandémie pourrait-elle alors aboutir à l'extinction de l'espèce humaine ? Sans même devoir répondre à cette question, nous sommes en mesure de nous demander quels seraient les pathogènes susceptibles de causer cette pandémie, ou plutôt de quels pathogènes devons-nous nous protéger pour prévenir cette possible épidémie ?

Bien que les bactéries, les parasites ou encore les champignons (moisissures) puissent être de très bons coupables, il semblerait que les virus soient les suspects numéros un.

Pour ne donner qu'un seul exemple d'épidémie causée par une bactérie, nous pouvons citer ici la « peste » causée par *Yersinia pestis*. Marseille, notre chère ville phocéenne, restera tristement célèbre pour son épisode de la « peste » au XVIII<sup>ème</sup> siècle, faisant de nombreuses victimes parmi ses habitants. Cette maladie continue malheureusement à sévir aujourd'hui encore dans certains pays d'Afrique comme Madagascar. Le *Plasmodium falciparum*, agent pathogène du paludisme, sévit encore de nos jours et reste, malgré les traitements, encore aujourd'hui la parasitose la plus meurtrière. Les aspergilloses, dignement représentées par *Aspergillus fumigatus*, ne sont pas en reste puisque ce dernier reste la cause la plus fréquente d'infection fongique invasive chez les personnes immunodéprimées.

Au cours des âges, l'Homme a également fait face à des grandes épidémies virales dont voici quelques exemples. Eradiquée fin des années 70, la variole a sévi durant toutes les périodes historiques, de la préhistoire aux temps modernes, sur tous les continents. En 1918-1919, une souche H1N1 du virus de la grippe fut particulièrement virulente. L'épidémie causée est connue sous le nom de « grippe espagnol ». Elle aurait fait 50 millions de morts et serait l'épidémie la plus mortelle en aussi peu de temps. Plus récemment, le monde a dû affronter des épidémies de virus émergents ou ré-émergents. Parmi lesquels nous pouvons citer l'épidémie du syndrome respiratoire aigüe sévère liée au coronavirus en 2002-2003, les épidémies de Chikungunya à la Réunion en 2005, 2009 et 2010, l'épidémie d'Ebola débutée en 2013, celle de Zika depuis 2015, celle du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et son pathogène le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui reste la plus grande et la plus tristement célèbre des infections virales de ces cinquante dernières années.

Depuis l'invention du vaccin, certaines de ces maladies ont pu voir leur incidence diminuer, mais n'en reste pas moins dangereuses. Dans cette catégorie nous pouvons relever

les virus de la grippe, de la fièvre jaune, de la dengue, de l'encéphalite japonaise, de la rubéole ainsi que l'éradication de la variole.

Devant tant de pathogènes, l'Homme a dû trouver des parades afin de contrer toutes ces épidémies. La première de ces armes est la prévention. L'information des populations sur la dangerosité de ces infections est la première étape de cette prévention qui peut être poursuivie par des injections vaccinales. La protection physique des personnes face au virus est également importante. L'Homme se doit de se protéger des différentes sources de contamination, que ce soit par un vecteur animal (moustique, etc...) ou non (exposition au sang, contamination aérienne, rapports sexuels, etc...). L'Homme peut également avoir recours aux médicaments. Un nombre, certes insuffisant, mais important de pathologies virales possède une thérapie. Le dernier outil à la disposition de l'Humanité est la connaissance. En effet la connaissance approfondie du virus, de ses propriétés biologiques, de sa virulence, de son cycle viral ou encore de son épidémiologie permet de mieux appréhender l'ensemble de ces épidémies.

Afin d'acquérir cette connaissance, l'Homme doit disposer de tous les moyens pour étudier les virus et comprendre leur cycle de développement, leurs propriétés biologiques et leur pouvoir pathogène. Cela inclut non seulement les moyens technologiques et les infrastructures mais également les méthodes et les techniques spécifiques à l'étude de ces microorganismes. Au sein de ces infrastructures, l'étude de virus ne pourrait se faire sans virus et il faut donc être capable de produire et conserver ces virus afin d'analyser leurs propriétés.

Ce mémoire se focalise uniquement sur l'étude des virus à ARN. Celle-ci bénéficie grandement de l'utilisation des systèmes de génétique inverse [1], définis par la synthèse de virus à partir d'ADNc [2]. Ces systèmes permettent de manipuler les génomes viraux et d'étudier les conséquences directes des modifications génotypiques sur leur phénotype et leur pathogénicité. Mais quel est l'impact direct de ces systèmes de génétique inverse sur les propriétés biologiques virales ? L'utilisation de telle ou telle méthode n'aura-t-elle pas une influence sur le génotype et/ou le phénotype du virus produit ?

**L'objectif de ce mémoire** du Diplôme d'Etudes Spécialisées en Innovation Pharmaceutique et Recherche (tenant lieu de Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie) est, i) de faire un état de l'art des connaissances sur le virus du Chikungunya, sur celui de l'encéphalite à tiques et sur les différentes méthodes de génétique inverse et ii) d'étudier l'impact de l'utilisation de trois méthodes de génétique inverse, dont une nouvelle méthode employée pour la première fois, sur la diversité des virus produits.

# *Chapitre I : Généralités*

# Partie A : Le virus du Chikungunya

## 1. Historique et situation épidémiologique

Le Chikungunya est un virus endémique et épidémique en Afrique et en Asie depuis plusieurs dizaines d'années. Plus récemment, il s'est également propagé à l'Océan Indien et aux Amériques [3-5].

C'est en 1952, que ce virus a été isolé pour la première fois à partir du sérum d'un patient malade au cours d'une flambée épidémique qui a eu lieu sur le plateau du Makonde dans la province du Tanganyika, dans le sud de la Tanzanie [6]. Ce nom, « Chikungunya », est donc d'origine « Makondé », langue parlée dans le Sud-est de la Tanzanie et dans le Nord-est du Mozambique. Il signifie : « qui se recourbe, qui se recroqueville ». En Français, Chikungunya peut être traduit par « maladie de l'Homme courbée ». En effet, les patients atteints du virus présentent de fortes douleurs articulaires et musculaires, ce qui leur donne une attitude voutée très caractéristique [7].

A partir de 1958, le continent Asiatique est également touché par ce virus. Une première épidémie s'est développée à Bangkok , puis s'est rapidement propagée à d'autres pays (Philippines, Cambodge, Vietnam, Inde, Indonésie, etc...) [8]. Après 20 ans « d'absence », le virus est réapparu en 2001-2003 en Indonésie, pour se répandre sur le reste du continent Asiatique, entraînant des épidémies à Hong Kong (2006) et en Chine (2010) [9].

Entre les années 1960 et les années 1990, de nombreuses épidémies ont été enregistrées en Afrique, touchant de très nombreux pays sub-sahariens : Afrique du Sud, Sénégal, Kenya, Niger, Nigéria, Zimbabwe, etc... [4]. Plus récemment, des épidémies ont été rapportées en République Démocratique du Congo (2000), au Cameroun (2006), au Gabon (2007 et 2010), au Congo (2011). En 2004, le Kenya est touché par une épidémie. Le virus va alors se répandre sur les îles de l'Océan Indien, à commencer par les Comores (2004) puis Mayotte, Madagascar, les îles Maurice et les Seychelles. En 2005-2006, l'île de La Réunion est également atteinte par une épidémie, ce qui a donné naissance à des émois médiatiques et politiques d'envergure en Métropole.

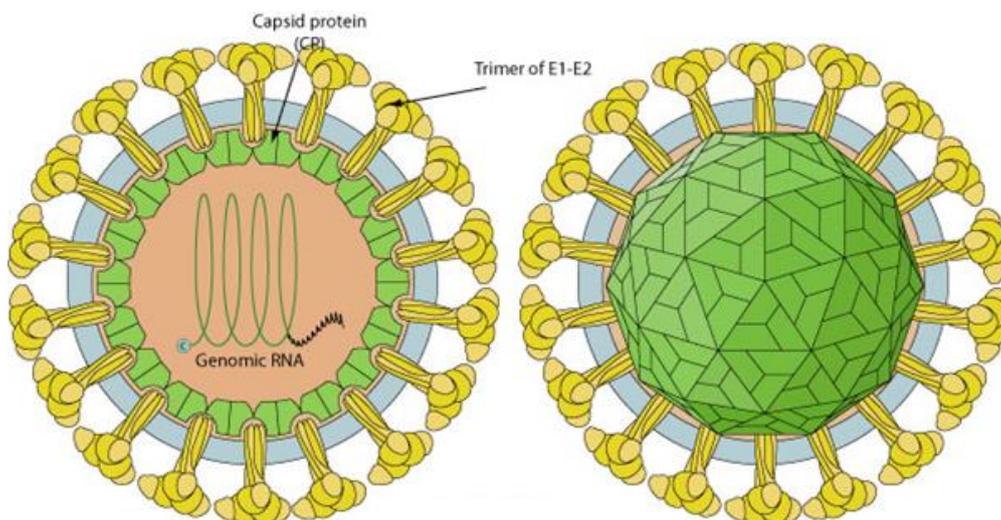
Depuis 2013, le virus a également atteint les Amériques et les Caraïbes. Ces régions sont, actuellement, les plus touchées par des épidémies de Chikungunya [5].

En Europe, la plupart des cas observés sont importés des régions endémiques. En 2007, en Italie, une épidémie s'est répandue à partir d'un « patient source », un touriste italien infecté de retour d'Inde [10]. Cependant en 2014, l'Agence Régionale de Santé (ARS) Languedoc-Roussillon a annoncé que quatre premiers cas d'infections locales avaient été détectés dans la région de Montpellier. Cela laisse présager que l'Europe n'est plus « à l'abri » d'une épidémie locale de Chikungunya, voire même que ce virus pourrait y devenir endémique.

## 2. Classification et structure

Le Chikungunya est un **Arbovirus** (**Arthropod-Borne Virus**, virus transmis par un Arthropode) puisqu'il est transmis par un insecte, le moustique. C'est un virus du genre *Alphavirus* et de la famille des *Togaviridae* faisant partie du Groupe IV de la Classification de Baltimore, les virus à ARN simple brin à polarité positive [4]. C'est également un membre du complexe antigénique « Semliki Forest Virus » (Virus de la Forêt de Semliki) [11].

Le virus possède une capsid icosaédrique entourée d'une enveloppe lipidique et fait 60 à 70 nanomètres de diamètre (**Figure 1**).



**Figure 1 : Structure des Alphavirus**

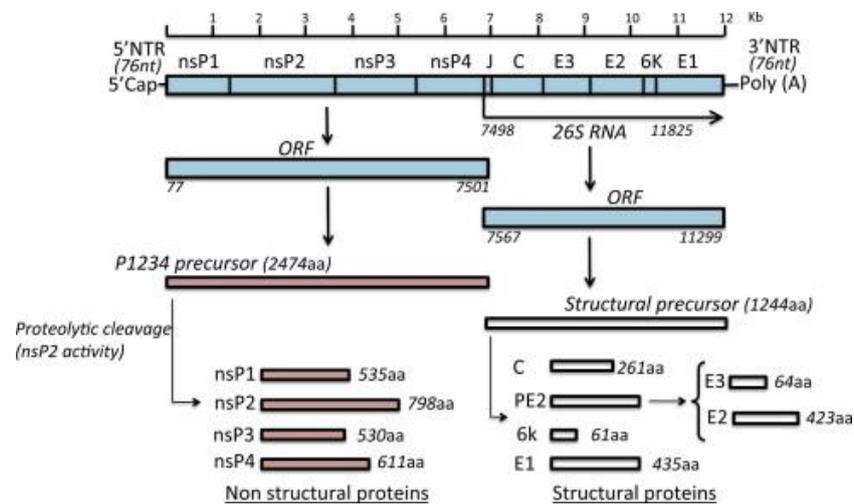
*Capsid protein (CP) : Protéine de la capsid Trimer of E1-E2 : Trimère des 2 protéines de l'enveloppe (E1 et E2)  
Genomic RNA : ARN génomique (<http://viralzone.expasy.org/>)*

Son génome est un ARN simple brin à polarité positive d'une taille d'environ 12 000 paire de bases [12]. L'ARN génomique se décompose en plusieurs parties :

- L'extrémité 5' non codante : 5' NTR
- Les protéines non structurales (nsP) : nsP1, nsP2, nsP3, nsP4
- La région « jonction » : J
- La protéine de capsid : C
- Les protéines d'enveloppe (E) : E3, E2
- Le peptide 6K : 6K
- La protéine d'enveloppe : E1
- L'extrémité 3' non codante : 3' NTR

Les extrémités 5' et 3' possèdent respectivement une coiffe 7-méthylguanosine et un signal de polyadénylation (poly (A)).

Cet ARN est traduit en deux cadres de lecture ouverts (ORF = Open Reading Frame). Celui situé du côté 5' du génome code pour les 4 protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4). De l'autre côté, l'ORF code pour une poly-protéine précurseur qui sera ensuite clivée donnant lieu à la protéine de capsid (C), deux protéines d'enveloppe (E1 et E2) et deux plus petites protéines (E3 et 6K) (**Figure 2**).



**Figure 2 : Structure du génome viral du Chikungunya**  
(Thiberville et al., 2013)

La protéine C, comme son nom l'indique, forme le complexe protéique de la capsid du virus. Les protéines E1 et E2 se regroupent sous la forme d'un hétérodimère pour former

l'enveloppe du virus. Elles sont responsables de l'adhésion du virus à la membrane cellulaire et de sa fusion avec celle-ci. La protéine E3 est impliquée dans l'interaction entre les protéines E1 et E2. Le peptide 6K interagit principalement avec la protéine E2 [13]. La protéine nsP1 possède des activités méthyl-transférase et guanylyl-transférase impliquées dans l'ajout de la coiffe aux ARNm viraux (ARN messagers viraux). La protéine nsP2 possède plusieurs activités différentes parmi lesquelles celles d'une hélicase et d'une protéase. La protéine nsP3, quant à elle, serait impliquée dans la synthèse de l'ARNm viral. Enfin, la protéine nsP4 a une activité d'ARN polymérase ARN dépendante [14].

### **3. Les cycles du virus**

#### *3.1. Cycle de réplication viral*

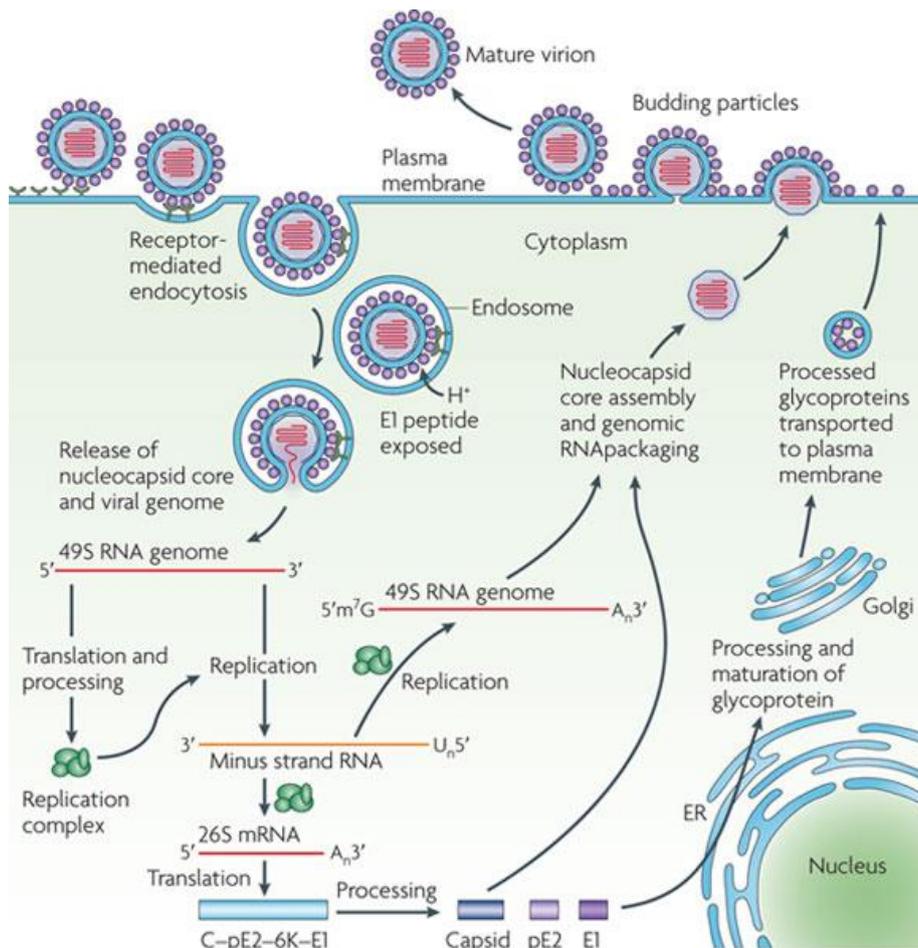
L'hétérodimère E1/E2 est responsable de l'interaction entre l'enveloppe du virus et la membrane cellulaire. Le virus va ensuite entrer dans le cytoplasme de la cellule hôte par endocytose, formant ainsi un endosome. L'enveloppe du virus et la membrane de l'endosome vont alors fusionner sous l'action du complexe protéique viral E1/E2. La nucléocapside se retrouve alors libre dans le cytoplasme et finit par se désassembler, phénomène connu sous le terme de la décapsidation.

Suite à cette étape, l'ARN du virus se retrouve à son tour libre dans le cytoplasme et va servir directement d'ARN messager pour les ribosomes de la cellule hôte. Les protéines structurales nouvellement produites vont alors s'associer afin de former un complexe de réplication virale. Ce complexe permet alors la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire de polarité négative.

A partir de cet ARN, ce même complexe va favoriser la synthèse d'un brin d'ARN contenant les gènes des protéines structurales. Après traduction, les protéines de capsidie resteront dans le cytoplasme tandis que les protéines d'enveloppe passeront par une étape de maturation dans le système endomembranaire de sécrétion impliquant le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi avant d'être externalisées au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte.

A partir du brin d'ARN complémentaire de polarité négative le complexe de réplication viral va favoriser la formation d'un nouveau brin d'ARN de polarité positive. Ce nouveau brin sera alors encapsidé par les protéines de capsid libères dans le cytoplasme.

La nucléocapside nouvellement formée va alors migrer au sein du cytoplasme puis s'entourer des protéines d'enveloppe au niveau de la membrane lors de l'expulsion par bourgeonnement du virion vers le milieu extracellulaire [15] (**Figure 5**).

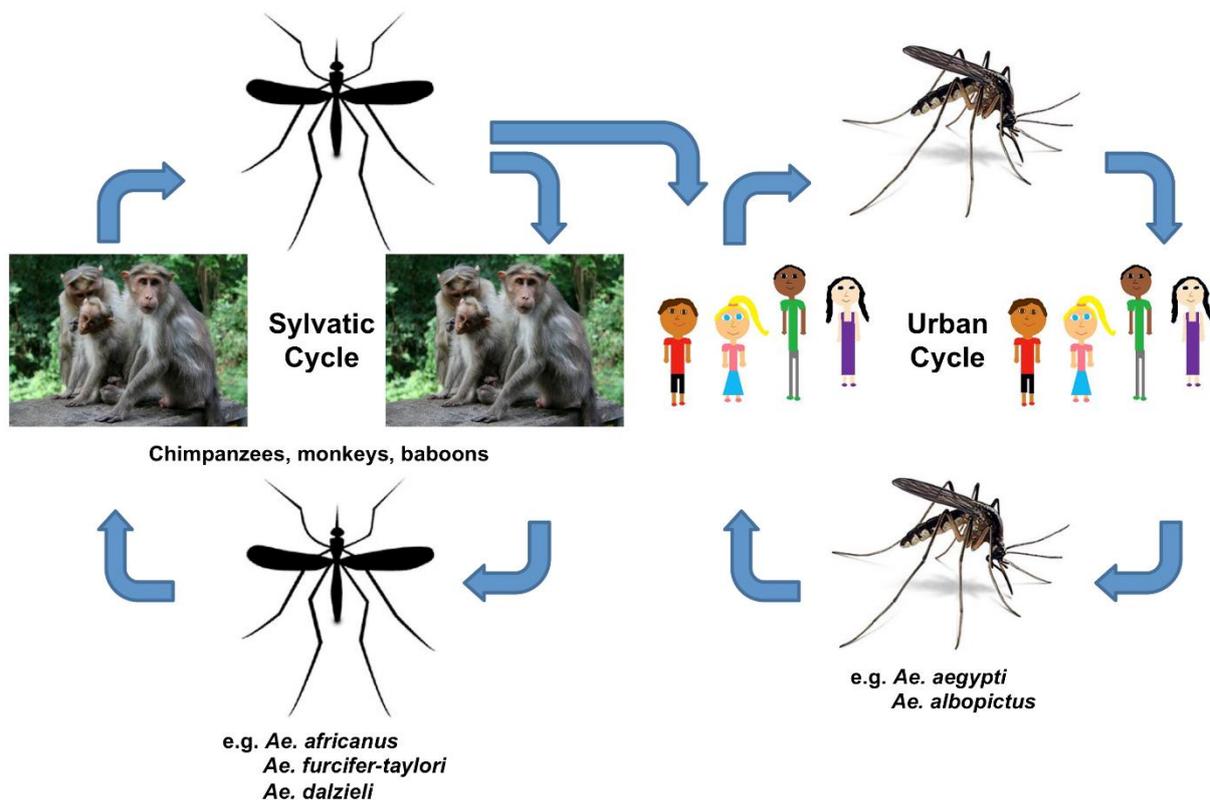


**Figure 3** : Cycle de réplication du Chikungunya  
(Schwartz et al. ; 2010)

### 3.2. Cycle naturel

L'agent vecteur du virus du Chikungunya est un moustique. Plus précisément, ce sont les femelles du genre *Aedes* qui sont responsables de la transmission chez les vertébrés. Par conséquent, le virus se multiplie alternativement dans un moustique puis dans un hôte vertébré.

Il existe deux types de cycle. Un premier cycle dit « sylvatique » et un second dit « urbain ». Le cycle sylvatique se retrouve majoritairement sur le continent Africain et est responsable d'une contamination animale (singes). De nombreuses espèces du genre *Aedes* sont responsables de sa transmission. A l'opposé, deux espèces sont principalement responsables de la transmission à l'Homme au cours du cycle urbain: *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. En effet, ces deux moustiques anthropophiles sont notamment connus pour vivre en zone urbaine ou péri-urbaine [16] (**Figure 4**).



**Figure 4 : Cycles naturels du virus**  
(Thiboutot et al. ; 2010)

#### 4. Les syndromes cliniques

L'infection par le virus du Chikungunya débute par une phase d'incubation. Malheureusement la durée exacte de cette phase est aléatoire et mal connue. Lors d'une épidémie en Afrique du Sud en 1977, le temps d'incubation a été estimé entre 2 et 10 jours [17]. La même conclusion a été faite sur les cas importés en France métropolitaine lors de l'épidémie à l'île de la Réunion en 2006 [18].

Dans un premier temps, il se développe une phase aiguë de la maladie. Le symptôme le plus fréquent est une poly-arthralgie présente chez plus de 87% des patients. Cette arthralgie touche principalement les articulations périphériques (poignets, chevilles et phalanges) et quelques grandes articulations (épaules, coudes et genoux). On retrouve aussi quelques douleurs au niveau des ligaments et des myalgies. Certaines manifestations cutanées, notamment des éruptions maculopapuleuses, des lésions cutanées ou des prurits, sont retrouvées chez 50% des patients. Des symptômes digestifs sont également rapportés chez moins de la moitié des patients atteints. Au cours de cette première phase, le taux de virus dans le sang est fortement élevé et l'on retrouve également certaines anomalies hématologiques (lymphopénie, thrombocytopénie, etc...). La symptomatologie a souvent un vrai impact négatif sur la qualité de vie des malades. L'infection par le virus du Chikungunya entraîne une diminution de l'activité physique et par conséquent une atteinte psychique des patients [18].

Après cette première phase, la majorité des patients rencontrent des symptômes persistants. C'est la phase tardive/chronique de l'infection. Une fois de plus les principaux symptômes rencontrés sont des douleurs osseuses, avec notamment des arthralgies, des douleurs musculo-squelettiques, des polyarthrites rhumatoïdes, etc... A une fréquence moins élevée, on retrouve également des syndromes pseudo-grippaux, des céphalées, des troubles digestives ou encore des troubles cutanés [18].

Il a également été démontré qu'il existait un nombre non-négligeable de cas asymptomatique. Cette proportion était variable lors des différentes épidémies (entre 4,8% et 27,7%) [18].

## **5. Les thérapies**

### *5.1. Thérapies antivirales*

Même si le virus du Chikungunya représente un réel problème de santé publique dans certaines régions du monde, il n'existe aujourd'hui aucun traitement contre cette pathologie. La prise en charge de l'infection se résume alors à une prise en charge symptomatique afin d'apaiser les douleurs par des antalgiques, des anti-inflammatoires ou encore des corticoïdes.

De nombreuses molécules, déjà connues pour avoir des activités sur d'autres pathogènes, ont été testées mais sans succès. Il existe donc un réel besoin en la matière et le développement de nouvelles molécules antivirales est, une absolue nécessité si l'on veut endiguer la maladie à l'avenir.

La plupart des molécules testées ciblent les différentes étapes du cycle de réplication du virus. On retrouve notamment des inhibiteurs de l'endocytose (*p.ex.* Chloroquine, Phénothiazines), des inhibiteurs de la traduction virale (*p.ex.* ARN interférents), des inhibiteurs de la réplication virale (*p.ex.* inhibiteurs de la protéine nsP2, Ribavirine), des inhibiteurs de la maturation des protéines virales. Certaines molécules de la réponse immunitaire ont également été testées, telles que l'Interféron alpha [19, 20].

## 5.2. Perspectives vaccinales

A l'heure actuelle, tout comme pour les thérapies antivirales, il n'existe aucun vaccin contre le virus de Chikungunya disponible sur le marché. Le développement d'un vaccin contre ce virus constituerait une réelle avancée thérapeutique. Depuis la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, plusieurs tentatives de mise au point d'un vaccin ont vu le jour. On retrouve notamment un vaccin inactivé au formol développé en 1967, un vaccin vivant atténué après passages successifs sur des cellules animales en 1986, un vaccin obtenu par recombinaison génétique en 2010, un vaccin à ADN conçu à partir de séquences génétiques codant pour les protéines d'enveloppe virales, trois vaccins chimériques à partir d'alphavirus en 2008 et un vaccin de type « virus like particles » constitué de l'enveloppe du virus sans le génome viral [15, 21-23].

Même s'il existe quelques vaccins prometteurs en phase pré-clinique ou clinique, les études visant le développement de nouveaux vaccins doivent être poursuivies et approfondies. Néanmoins, la plupart des tentatives vaccinales ont été abandonnées pour diverses raisons (effets secondaires et indésirables, coûts de production et de mise sur le marché trop élevés, etc...) [21].

## Partie B : Le virus de l'encéphalite à tiques

### 1. Historique et situation épidémiologique

La toute première description publiée remonte à 1931. Hans Schneider, médecin autrichien, a démontré une relation entre plusieurs cas de méningo-encéphalites saisonnières dans le sud-ouest de l'Allemagne [24].

C'est en 1898 que la maladie semble être apparue pour la première fois en Russie dans la région de l'Oural. Mais c'est uniquement entre 1937 et 1939, lors de graves épidémies, que le gouvernement russe décide de s'intéresser à ce fléau. En effet, de graves encéphalites ou méningo-encéphalites ont fait leur apparition dès 1914 dans certaines régions de la Russie, avec une nette recrudescence depuis 1933. En 1939, le virus sera isolé pour la première fois à partir du cerveau d'un patient décédé et le vecteur sera également identifié comme la tique *Ixodes persulcatus* [25, 26]. En 1943 le virus est également isolé en Biélorussie suite à une épidémie chez des militaires. Le virus est isolé à la fois à partir de patients mais également à partir de la tique *Ixodes ricinus* [27]. Après l'URSS, le virus a ensuite été isolé en Tchécoslovaquie en 1948, également à partir d'*Ixodes ricinus*. Depuis il a également été identifié et isolé dans de nombreux pays dont la Bulgarie, la Suède ou le Japon [28-30].

Le virus de l'encéphalite à tiques est retrouvé de manière endémique dans la nature en Europe Centrale, de l'Est et en Asie du Nord. Environ 10 000 cas sont déclarés chaque année par les hôpitaux d'Europe et d'Asie. Depuis les années 2000, le nombre de cas en Europe centrale (République Tchèque, Pologne, Lituanie, Allemagne) ne cesse d'augmenter, faisant de cette pathologie un sérieux problème de santé publique.

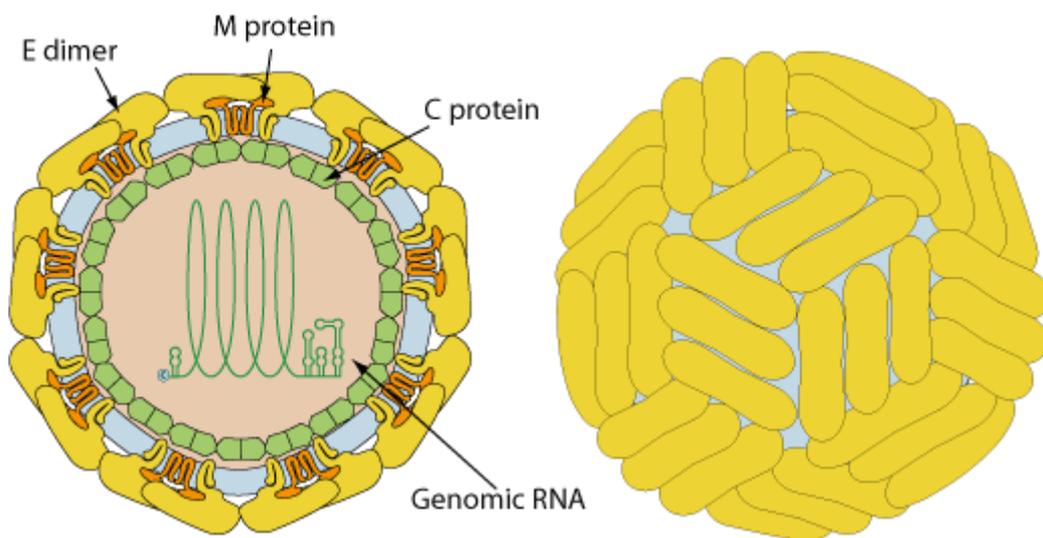
### 2. Classification et structure

Le virus de l'encéphalite à tiques est un virus du genre *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Il fait partie du Groupe IV de la Classification de Baltimore, les virus à ARN simple brin à polarité positive.

Le genre Flavivirus est composé d'environ 70 virus dont la plupart sont pathogènes chez l'Homme. Ce genre se décompose en 4 groupes : le groupe des virus transmis par les moustiques (*p.ex.* virus de la fièvre jaune, virus de le Dengue), le groupe des virus transmis par les tiques (*p.ex.* TBEV), le groupe des virus sans vecteur connu et enfin le groupe de certains virus atypiques [31].

Au sein du groupe des virus transmis par les tiques, on retrouve 2 sous-groupes : le sous-groupe associés aux oiseaux marins (« seabird tick-borne flaviviruses », S-TBFV) et le sous-groupe associés aux mammifères (« mammalian tick-borne flaviviruses », M-TBFV) au sein duquel on retrouve le sérocomplexe TBE (« tick-borne encephalitis ») [32]. Ce sérocomplexe est constitué de 3 sous-types : le sous-type Far-Eastern (*p.ex.* souche Oshima), le sous-type Siberian et le sous type Western European [33].

Le virus possède une capside icosaédrique entourée d'une enveloppe lipidique et fait environ 50 nm de diamètre (**Figure 5**).



**Figure 5 : Structure des Flavivirus**

*E dimer* : dimère de protéine d'enveloppe    *M protein* : protéine de membrane    *C protein* : protéine de capside  
*Genomic RNA* : ARN génomique (<http://viralzone.expasy.org/>)

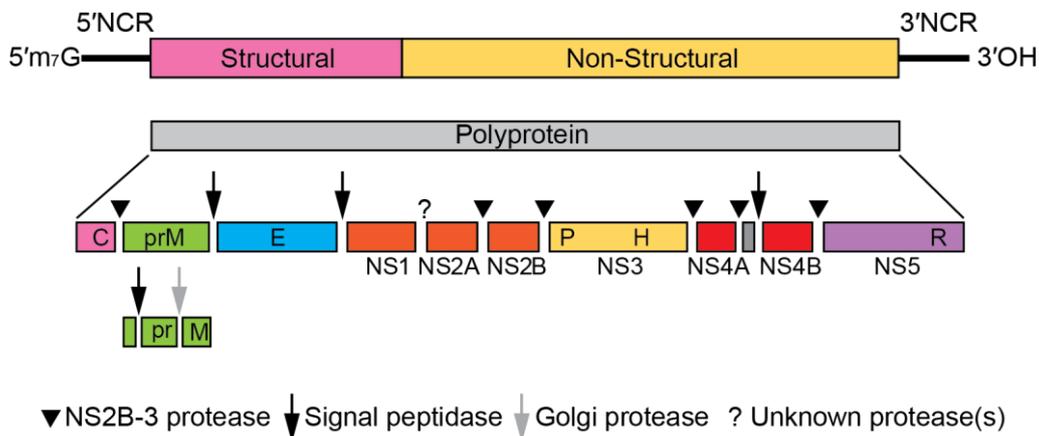
Son génome est un ARN simple brin à polarité positive d'une taille d'environ 11 000 paires de bases. L'ARN génomique se décompose en plusieurs parties :

- L'extrémité 5' non codante : 5' NTR
- La protéine de capside : C
- La protéine de membrane : prM

- La protéine d'enveloppe : E
- Les protéines non structurales (NS) : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5
- L'extrémité 3' non codante : 3' NTR

Les extrémités 5' et 3' possèdent respectivement une coiffe 7-méthylguanosine et un signal de polyadénylation (poly (A)) [34] (**Figure 6**).

Cet ARN contient un seul cadre de lecture ouvert (ORF = Open Reading Frame). Il code pour une polyprotéine de 3400 acides aminés qui sera clivée en deux types de protéines différentes, structurales et non-structurales. Les protéines structurales sont au nombre de 3, nommées C, M et E ; et les protéines non-structurales sont au nombre de 7 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [34] (**Figure 6**).



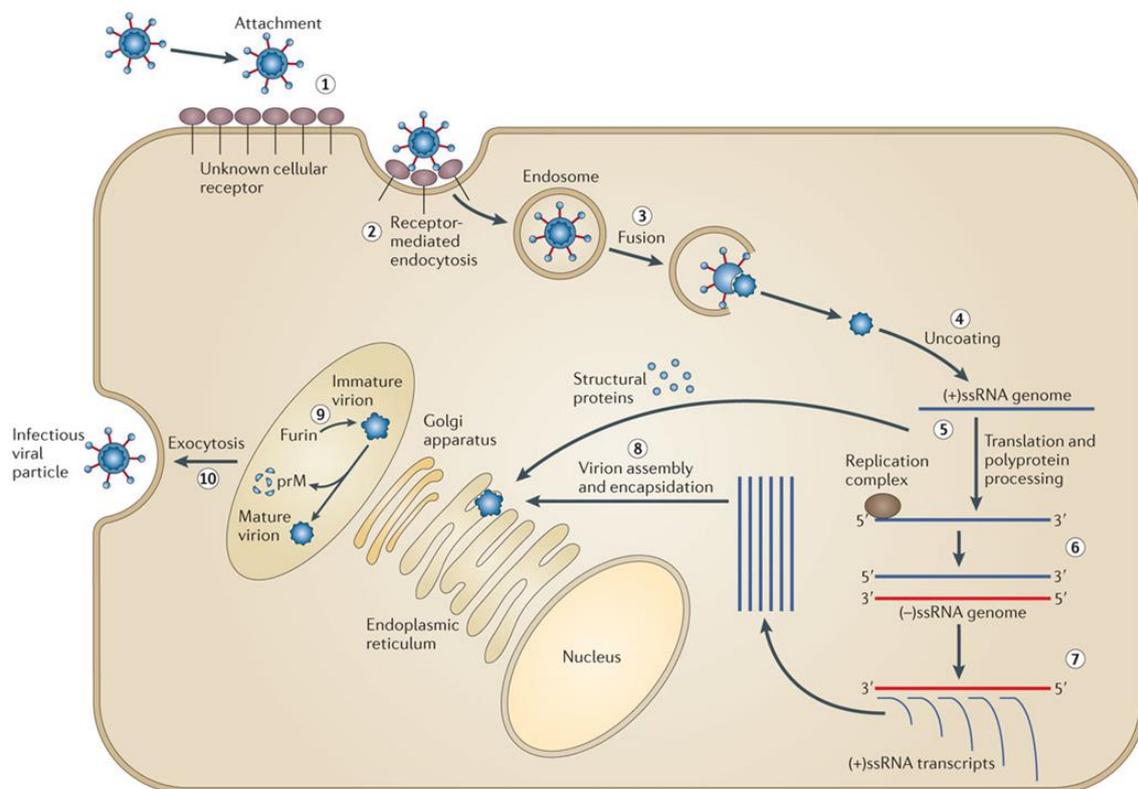
**Figure 6** : Structure du génome viral du Virus de l'encéphalite à tiques  
([www.talk.ictvonline.org](http://www.talk.ictvonline.org))

La protéine C forme la capside du virus. L'enveloppe est issue de la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule hôte. Dans cette membrane viennent s'enchâsser les protéine E (rôle de déterminant antigénique), organisées en dimères, et les protéines M [35]. La protéine NS1 semble jouer un rôle dans l'initiation de la synthèse du brin de polarité négative. La protéine NS2A semble posséder une activité dans l'assemblage des virions et la protéine NS2B possède une activité de protéase. La protéine NS3 possède des activités d'hélicase et d'ARN triphosphatase alors que la protéine NS5 a une activité de méthyltransférase et d'ARN polymérase ARN-dépendante. Le rôle des protéines NS4A et NS4B n'est, à ce jour, pas encore bien défini [36].

### 3. Les cycles du virus

#### 3.1. Cycle de réplication viral

Le virus pénètre par endocytose dans la cellule. La réorganisation des dimères de protéines de l'enveloppe en trimères permet la fusion de la membrane lipidique du virus à la membrane de la vésicule d'endocytose, libérant ainsi la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'ARN génomique est alors décapsidé et traduit par la machinerie cellulaire en polyprotéine précurseur. Cette polyprotéine est alors clivée afin de produire les différentes protéines virales. L'ARN génomique est également répliqué par le complexe NS5/NS3 par l'intermédiaire d'un brin de polarité négative. Ce brin sert de matrice pour la synthèse d'ARN génomique (pour l'encapsidation), d'ARNm (pour la traduction) et d'ARN matrices (pour la réplication). Les différentes protéines virales ainsi que l'ARN génomique sont assemblés afin de former un virion qui va bourgeonner au sein du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte, acquérant ainsi sa membrane issue de celle du RE. Les virions passent par une étape de maturation golgienne, notamment par le clivage du précurseur M en protéine M, avant d'être finalement libérés par exocytose hors de la cellule hôte [36] (**Figure 7**).



**Figure 7 : Cycle de réplication des Flavivirus**  
(Suthar et al., 2013)

### 3.2. Cycle naturel

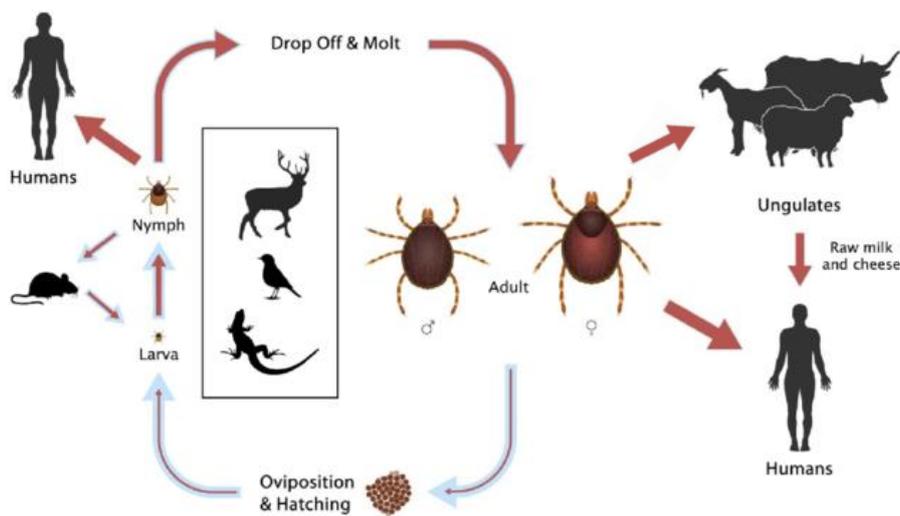
Le vecteur du virus de l'encéphalite à tiques est la tique du genre *Ixodes*. Il s'agit principalement de l'espèce *ricinus* mais on retrouve également la tique *Ixodes persulcatus* jusqu'en Sibérie. Ainsi, lors de son cycle de développement, ce virus présente alternativement une phase au sein de la tique et une autre chez l'hôte vertébré.

La tique peut être infectée de différentes manières [37]:

- Par transmission trans-stadiale : maintien du virus chez la tique lors du passage d'un stade évolutif à un autre
- Par transmission verticale : de la femelle aux œufs
- Par co-feeding : une tique infectée prenant un repas sanguin peut transmettre le virus à une tique non infectée qui se nourrit à proximité
- Par repas sur un hôte virémique

A chaque changement de stade évolutif (larve puis nymphe puis adulte), la tique se nourrit d'un repas sanguin. Au début de leur vie, les tiques se nourrissent plutôt sur des petits mammifères puis sur des animaux de plus en plus grands/gros. A chacun de ces repas, l'Homme peut être pris pour cible par la tique et, si celle-ci est infectée, lui transmettre le virus

L'Homme peut également être contaminé par les produits laitiers non pasteurisés de vaches, de chèvres ou de brebis contenant le virus [38] (**Figure 8**).



**Figure 8** : Cycle de vie de la tique et transmission aux mammifères  
(Estrada-Peña et al., 2014)

#### 4. Les syndromes cliniques

L'infection débute tout d'abord par une phase d'incubation qui, en général, dure entre 7 et 14 jours. Il arrive que certaines personnes développent quelques symptômes au cours de cette phase, mais rarement plus grave qu'un syndrome pseudo-grippal [33].

Au cours de la phase aiguë de l'infection, on retrouve plusieurs formes cliniques [39]:

- Une forme fébrile, qui se traduit par une courte période fébrile sans atteinte du système nerveux central.
- Une forme méningée, proche de la forme fébrile avec nausées, vomissements, photophobies, etc...
- Une forme méningo-encéphalite, moins fréquente mais avec une atteinte du système nerveux central (SNC) beaucoup plus sévère et des séquelles graves (épilepsie, hémiplégie, décès).
- Une forme poliomyélitique, qui peut aller jusqu'à une atrophie musculaire rendant le rétablissement des patients long et rarement total.
- Une forme polyradiculo-névritique, caractérisée par une atteinte des nerfs périphériques et des douleurs associées.

En Sibérie et en extrême orient, on retrouve une phase chronique de l'infection qui se différencie en deux formes distinctes :

- Une première forme qui se caractérise comme étant les séquelles d'une des formes aiguës précédentes [33].
- Une deuxième forme qui peut survenir plusieurs années après la morsure de la tique et sans phase aiguë au préalable. Elle présente des symptômes graves tels que de l'épilepsie, des névrites ou des atrophies musculaires dont l'issue peut être la mort [40].

## 5. Les thérapies

### 5.1. Thérapies antivirales

Même si des traitements à base de corticoïdes [41], d'immunoglobuline [42] ou encore d'ARN interférents [43] ont été testés, avec plus ou moins de succès, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif des infections par le virus de l'encéphalite à tiques.

La prise en charge de la maladie est purement symptomatique et consiste essentiellement en la prise d'analgésiques, d'antipyrétiques et de vitamines, tout en veillant à une bonne hydratation du patient [44].

### 5.2. Vaccins

En Europe, deux vaccins sont disponibles sur le marché :

- FSME-IMMUN (Pfizer)
- Encepur (Chiron-Behring)

Le FSME-IMMUN (TicoVac en France) est le vaccin le plus utilisé en Europe. Il est développé depuis 1979 et est constitué du virus entier, produit sur cellules d'embryon de poulet et inactivé au formol [45, 46]. La vaccination contre l'encéphalite à tiques comprend trois doses : deux premières injections à 1 mois d'intervalle et un rappel un an plus tard. Il existe aussi un schéma accéléré avec des injections à J0, J7, J21 et un an après. Afin d'optimiser la protection vaccinale un rappel peut être réalisé tous les 3 à 5 ans. Ce vaccin est efficace contre tous les sous-types de TBEV.

Sur le marché, les deux vaccins sont également disponibles sous une forme adaptée pour les enfants.

## Partie C : Les systèmes de génétique inverse

### 1. Introduction

L'introduction d'ARN viral (génom complet) au sein de cellules est connue depuis plus d'une quarantaine d'année comme permettant la production de particules virales infectieuses par ces cellules [47]. Grâce aux nombreuses avancées scientifiques en biologie moléculaire, cette propriété a été étudiée et exploitée afin de conduire aujourd'hui aux systèmes de génétique inverse. Nous présenterons ici uniquement les systèmes de génétique inverse des virus à ARN de polarité positive.

Cette évolution scientifique s'est produite en parallèle au développement de la PCR (Polymerase Chain Reaction) depuis 1986, de la RT-PCR (reverse transcriptase-PCR), des améliorations en terme de fidélité d'amplification et de la standardisation de ces méthodes au sein de kit commerciaux largement disponibles [48, 49].

Les systèmes de génétiques inverse ont également grandement bénéficié des méthodes de séquençage. La première d'entre elle est la méthode « Sanger » permettant de déterminer l'ordre des 4 nucléotides composant un brin d'ADN [50]. Dans un premier temps manuelle et utilisant une électrophorèse sur gel distinguant la taille des brins amplifiés, elle fut ensuite améliorée par l'introduction de fluorophores différents pour chaque nucléotide émettant une lumière distincte à chaque hybridation, rendant cette méthode automatisable [51]. Les nouvelles méthodes de séquençage sont nommées « Next-Generation Sequencing » (NGS). Il existe de nombreuses stratégies d'amplification différentes, toutes permettant l'obtention de séquence complète en un temps record. Parmi elles, il est possible de citer la technologie de semi-conducteur utilisée par l'Ion Torrent, détectant les ions hydrogène libérés lors de la polymérisation de l'ADN.

Les progrès en bio-informatique ont aussi joué un grand rôle dans le développement des systèmes de génétique inverse. La communauté scientifique dispose de nombreuses bases de données de séquence (*p.ex.* GenBank [52]), de programmes d'identification de gènes (*p.ex.* BLAST [53]) ainsi que des logiciels d'alignement de séquences et de construction d'arbres phylogénétiques (*p.ex.* MEGA [54]).

Aujourd'hui, en virologie, les systèmes de génétique inverse sont définis comme la synthèse de virus infectieux à partir d'ADN complémentaire du génome viral [2]. C'est en 1981 que, pour la première fois, l'ADN complémentaire de l'ARN simple brin linéaire de polarité positive du virus de la poliomyélite a conduit à la production de virus infectieux, après sa transfection au sein de cellules de mammifères [55].

## 2. Les différents systèmes de génétique inverse

Il existe de nombreux systèmes de génétique inverse. L'outil le plus utilisé est le clone infectieux ; toutefois celui-ci présente quelques limites entravant son efficacité. Des alternatives ont alors été développées afin de contrecarrer ces problèmes.

### 2.1. Le clone infectieux

Un clone infectieux est un ADN complémentaire d'un ARN viral génomique complet incorporé, de manière stable, au sein d'un vecteur circulaire, cloné à l'intérieur d'un hôte. Il existe plusieurs vecteurs disponibles (plasmide, chromosome artificiel bactérien, cosmide) ainsi que différents hôtes (bactéries, levures). Après transfection, ce clone infectieux conduit à la production de virus, infectieux le cas échéant. Un promoteur de l'ARN polymérase à l'extrémité 5' de l'ADNc est indispensable à la génération d'ARN viral [56]. Dans certains cas, un ribozyme (ARN qui possèdent la propriété de catalyser une réaction chimique spécifique) peut également être ajouté à l'extrémité 3' de la séquence d'ADNc [57] (**Figure 9**).

#### 2.1.1. Production d'ADNc

Dans un premier temps, il est nécessaire de disposer de la séquence d'ADNc. Les premières tentatives font état d'une synthèse de plusieurs fragments d'ADN (« sub-cloning ») reliés entre eux par ligation [58]. Les progrès dans le domaine de la PCR ont ensuite permis d'obtenir de plus longs fragments d'ADN de meilleure qualité [49]. La synthèse *de novo* du fragment est également possible mais n'est pas considérée comme la méthode de premier choix.

### 2.1.2. L'hôte

Afin de cloner ce fragment d'ADNc, l'utilisation d'un hôte est indispensable. Dans le monde bactérien, *Escherichia coli* dispose du système d'expression le plus souvent utilisé pour le clonage de l'ADNc puisque sa génétique et sa physiologie sont parfaitement connues. Il existe une grande variété de souches de cette bactérie disposant de caractéristiques spécifiques permettant de choisir celle convenant au mieux à la séquence et au vecteur utilisés [59].

Lorsque la procédure est impossible avec des bactéries (instabilité du fragment), il est possible d'utiliser, comme hôte, des levures. *Saccharomyces cerevisiae* est la levure la plus utilisée de nos jours [60].

### 2.1.3. Le vecteur

Il est également nécessaire de choisir un vecteur optimal afin d'y incorporer le fragment d'ADNc d'intérêt. Le vecteur le plus utilisé est le plasmide bactérien. Il s'agit d'une molécule d'ADN double brin, indépendante de l'ADN chromosomique, se répliquant de manière autonome. Le fragment d'intérêt est incorporé au plasmide qui est à son tour introduit dans les bactéries. Afin de s'assurer de l'incorporation du plasmide, les bactéries sont mises en culture sur un milieu supplémenté en antibiotique. Le gène de résistance à cet antibiotique, inséré dans le plasmide en amont, permet aux bactéries de s'y multiplier. Il est ensuite possible de récupérer des grandes quantités de plasmide incorporant le fragment d'intérêt [61].

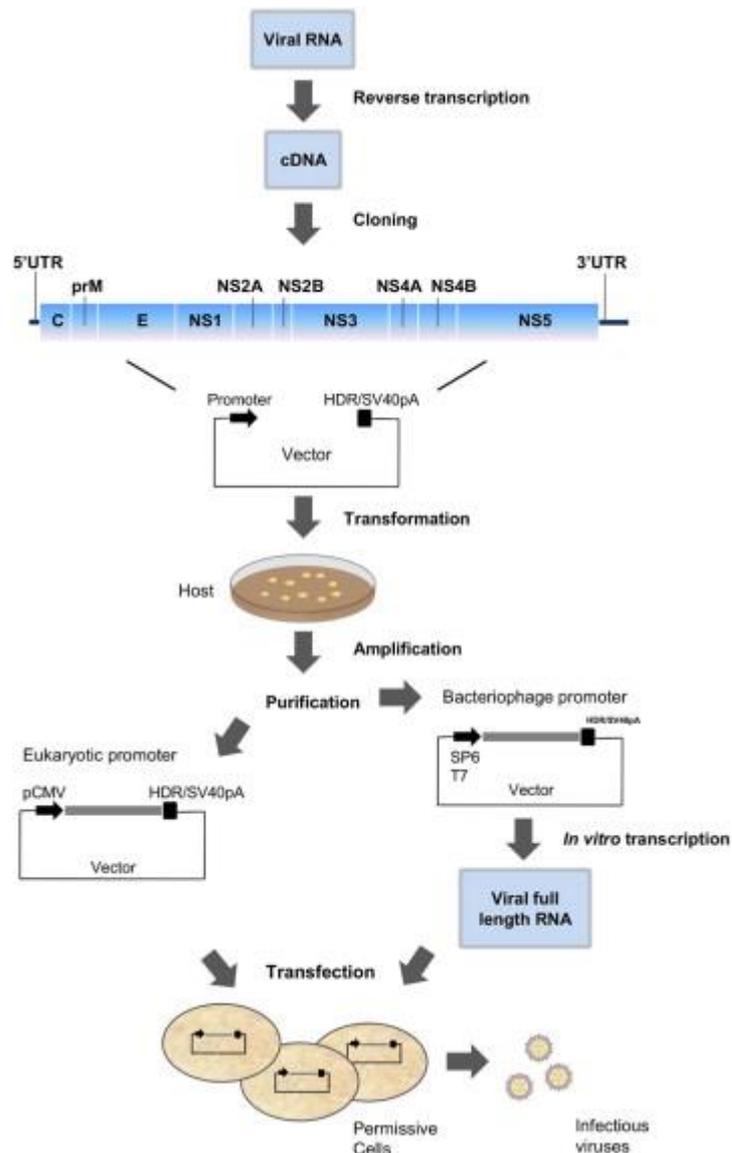
Les Chromosomes Artificiel Bactérien (CAB) sont des molécules d'ADN circulaires également utilisables comme vecteurs. Ils sont dérivés du facteur F de fertilité d'*E. coli* qui se présente sous la forme d'un plasmide impliqué dans la conjugaison bactérienne dont l'intégration au chromosome bactérien est réversible [62].

Le clonage peut également se réaliser à partir de cosmides. Ce sont des vecteurs composés d'une petite région du bactériophage  $\lambda$  contenant un site cohésif (« cos ») et d'un plasmide (« mide »). Ces cosmides présentent la même méthode de multiplication dans la bactérie que les plasmides [63].

Concernant les levures, la principale stratégie est d'utiliser le Chromosome Artificiel de Levure (CAL), qui consiste en un plasmide bactérien dans lequel est inséré certaines séquences de levures [60].

#### 2.1.4. Le promoteur

Afin de permettre la fixation de l'ARN polymérase et d'initier la transcription de l'ARN viral, un promoteur doit être situé en amont du fragment d'ADNc. Il est possible d'utiliser soit des promoteurs de bactériophage (nommés T7 et SP6), soit le promoteur du cytomégalovirus (pCMV) [64]. Les promoteurs bactériophage sont utilisés afin de produire de grande quantité d'ARN viral *in vitro*, à partir d'ADN complémentaire, qui sera ensuite directement transfectée dans des cellules permissives. A l'inverse, le pCMV est utilisé afin de générer de l'ARN viral *in cellulo* après transfection (**Figure 9**).



**Figure 9** : Procédure générale de construction et de transfection d'un clone infectieux (Aubry et al., 2015)

### 2.1.5. Les limites de l'utilisation de clones infectieux

Les clones infectieux représentent un outil très intéressant pour la manipulation des génomes viraux. Cependant, leur utilisation présente certaines limites. Ce type de construction peut présenter une instabilité quand il est cloné au sein d'un hôte et peut être toxique pour ces organismes. En effet, ces clones sont prédisposés à des réarrangements génétiques spontanés ou à des acquisitions de mutations, rendant ce type de construction particulièrement instable au sein de l'hôte.

D'autre part, l'objectif de ce type de manipulation est d'obtenir un grand nombre de plasmides clonés au sein d'une colonie bactérienne et donc au sein d'une seule bactérie. Même si la traduction des protéines virales à partir du fragment d'ADNc d'intérêt est faible chez l'hôte, la présence d'un grand nombre de clones peut entraîner la production d'un trop fort taux de protéines s'avérant toxiques pour l'hôte [56]. Ces forts taux de protéines sont d'autant plus augmentés par l'utilisation d'un promoteur particulièrement efficace tel que celui du CMV [65]. Par conséquent certains clones infectieux ont été particulièrement difficiles, voire impossible, à construire [1].

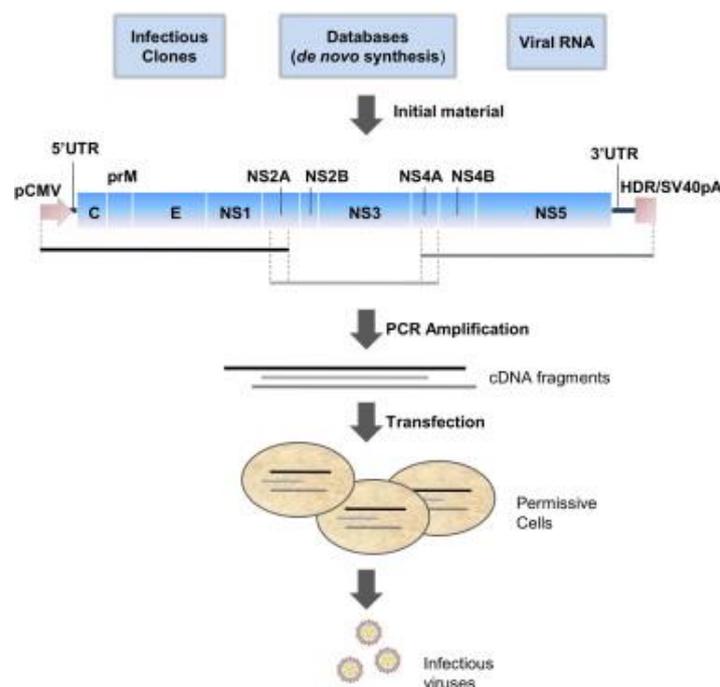
Comme indiqué précédemment, il est possible d'utiliser différents hôtes (bactéries, levures) mais également différents vecteurs (plasmides, CAB, cosmides, CAL) afin de disposer des outils les plus adaptés. Mais parfois il a fallu faire preuve d'ingéniosité. Par exemple, l'insertion d'un intron contenant un codon stop, prévenant de la synthèse des protéines toxiques, s'est montrée bénéfique [66]. Une autre étude fait état de la suppression de l'amplificateur (séquence régulatrice d'ADN stimulant la transcription d'un gène), afin de diminuer la transcription [67].

### 2.2. Les approches « *bacteria-free* »

Afin d'éviter les problèmes liés à l'utilisation d'un hôte (plus particulièrement ceux bactériens), des techniques « *bacteria-free* » (sans bactéries) ont été développées. Grâce à des protocoles de PCR particuliers (obtention d'un grand nombre de produit de PCR homogène, de grande taille), il a été possible d'obtenir 2 fragments d'ADNc chevauchants représentant le génome viral dans son ensemble. Ces deux fragments ont ensuite été liés entre eux soit par ligation soit par « PCR fusion », puis directement injectés chez la souris, conduisant à la production de virus infectieux [49]. Il a également été possible de synthétiser un clone infectieux à partir de la technique « Circular Polymerase Extension Cloning ». Pour cela de

nombreux fragments de RT-PCR possédant des extrémités chevauchantes (le premier et le dernier fragment comportent des extrémités chevauchantes avec le vecteur), sont amplifiés dans le bon ordre par une ADN polymérase, recomposant ainsi un clone infectieux dans son ensemble [68]. De manière identique, il est envisageable d'assembler ces fragments par la méthode de Gibson, grâce à l'utilisation de trois enzymes : une exonucléase, une ADN polymérase et une ADN ligase [69].

La dernière méthode présentée ici est appelée ISA (« Infectious Subgenomic Amplicons »). Elle consiste en l'amplification par PCR du génome viral en trois fragments d'ADNc d'environ 4 kb, chacun des fragments se chevauchant d'environ 70 à 100 pb. Le premier et le dernier fragment sont respectivement flanqués en 5' par le promoteur du cytomégalovirus humain (pCMV), capable d'initier la transcription de l'ADN en ARN, et en 3' par le ribozyme du virus de l'hépatite delta suivi par le signal de polyadénylation du virus simien 40. La transfection des trois fragments en quantité équimolaire dans des cellules permissives permet la production de virus infectieux. Contrairement aux autres approches « bacteria-free », cette méthode ne nécessite aucune étape supplémentaire (clonage ou transcription *in vitro*) à l'amplification par PCR nécessaire à l'obtention des différents fragments d'ADNc. Le processus d'assemblage des différents fragments ainsi que la production de l'ARN viral se font directement *in cellulo*, ce qui facilite la procédure et raccourcit grandement sa durée [70] (**Figure 10**).



**Figure 10 : Procédure générale pour la méthode ISA**  
(Aubry et al., 2015)

### **3. Relation entre les systèmes de génétique inverse et les populations virales**

Il est important de noter que les génomes des virus à ARN ne circulent pas dans la nature sous la forme d'une seule et identique séquence, mais sous la forme d'une population virale hétérogène, possédant une séquence consensus autour de laquelle gravitent des mutants arborant une ou plusieurs mutations. L'ensemble de ces mutants est appelé le « spectre de mutants » [71].

La première conséquence de l'utilisation de ces différents systèmes de génétique inverse se situe au niveau des populations de virus produits. En effet, la transfection d'un matériel dit « clonal » (*p.ex.* clone infectieux) engendre la production d'une population virale homogène génétiquement, où le spectre de mutant est limité voire complètement absent. A l'opposé, l'utilisation des nouvelles méthodes « bacteria-free », nécessitant l'intervention de polymérases, connues pour commettre des erreurs lors de l'amplification par PCR, pourrait entraîner une variabilité génétique différente de celle observée naturellement.

Alors qu'il était communément admis que le phénotype d'un virus donné était directement lié à la séquence consensus, il a été récemment démontré que le « spectre de mutants » dans son ensemble joue également un rôle important [72]. Le phénotype observé serait donc dépendant de la méthode de génétique inverse utilisée. Il est donc important de sélectionner la méthode la plus appropriée, lors de la conception de protocoles expérimentaux.

### **4. Quelques exemples d'utilisation**

Ces systèmes de génétique inverses permettent la manipulation de génomes viraux et notamment leur modification par mutation dirigée ou réarrangement. Ils sont donc de remarquables outils pour la recherche en virologie.

Ils sont utilisés dans l'étude de l'influence de mutation dirigée. Par exemple, l'introduction de trois mutations au niveau de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de l'encéphalite à tiques a conduit à une neurovirulence réduite chez la souris [73].

Il est également possible d'étudier les interactions virus/hôte grâce à ces systèmes. Ainsi, la région codante pour le précurseur de la protéine de membrane du virus de la dengue a

subi quelques délétions afin de mettre en évidence son interaction avec une ATPase vacuolaire. [74]. D'autre part, certaines équipes ont également exploré le rôle de certaines régions du génome dans la spécificité d'hôte du virus [75, 76].

Ces systèmes de génétique inverse ont aussi permis de mettre en évidence les fonctions des protéines non-structurales NS2A et NS2B, l'importance de la glycosylation sur l'activité de la protéine non-structurale NS1 ainsi que de définir et caractériser les différentes composantes de l'extrémité 3' NTR du génome viral [77-79].

Ils ont également permis de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Ils ont ainsi contribué à la production de candidats vaccins vivants atténués par la création de virus chimériques. Par exemple, un virus chimérique peut être composé des gènes codants pour les protéines structurales d'un premier virus et des gènes codants pour les protéines non-structurales d'un second virus. Parce que les gènes structuraux d'un virus induisent la production d'anticorps neutralisant, ce type de construction peut donc entraîner une immunité protective. Pour la première fois démontré grâce aux différentes souches du virus de la dengue, cette technique a ensuite été appliquée à d'autres virus (notamment le virus de l'encéphalite à tiques) en utilisant comme gènes non structuraux ceux de la souche vaccinale du virus de la fièvre jaune, appelée « souche 17D » [80, 81].

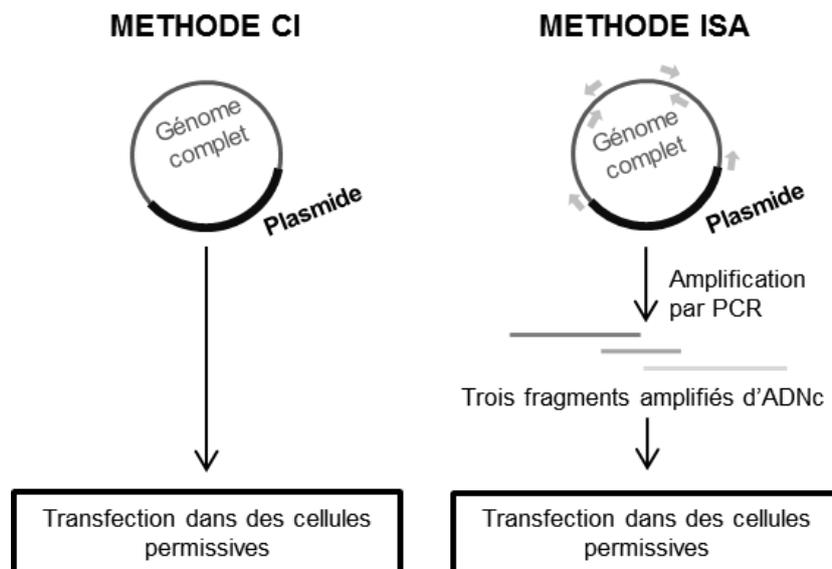
Enfin, les systèmes de génétique inverse ont permis de caractériser des mécanismes de résistance aux antiviraux. La mutation suspectée qui entraîne une résistance peut être introduite dans le génome viral. Les virus produits posséderont donc cette mutation et pourront être testés contre l'antivirus afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de départ. Cette stratégie a été mise en œuvre lors de la caractérisation du mécanisme de résistance des virus de la dengue contre la molécule « Brequinar » [82].

*Chapitre II : Etude du génotype et du  
phénotype des virus produits par  
génétique inverse*

## Introduction

L'étude des virus à ARN a grandement bénéficié des systèmes de génétique inverse qui permettent la production de virus infectieux à partir de copies d'ADN de leurs génomes [1, 2]. Ces systèmes permettent donc d'améliorer notre connaissance sur la pathogenèse et les cycles de vie des virus à ARN et de développer de nouveaux composés antiviraux ainsi que de nouvelles stratégies vaccinales [83, 84].

Le système de génétique inverse le plus communément utilisé est le clone infectieux (IC), il s'agit d'une copie d'ADNc double brin de l'ensemble du génome viral incorporé dans un vecteur (généralement bactérien) [56]. Malgré de nombreuses avancées technologiques simplifiant sa construction et son utilisation, cet outil reste encore difficile à manipuler, en particulier en raison de l'instabilité et de la toxicité de certaines séquences virales au sein des bactéries [49, 56, 58]. Afin de pallier à ces difficultés, de nouvelles approches « bacteria-free » ont été développées, parmi lesquelles on retrouve la méthode ISA (Infectious Subgenomic Amplicons) récemment décrite et appliquée à une variété de virus [49, 68-70]. Cette méthode ne nécessite aucune étape supplémentaire après la PCR, telle que le clonage ou la transcription *in vitro*, pour produire des virus infectieux puisque l'assemblage des fragments ainsi que la production d'ARN viral sont réalisés directement *in cellulo* [70] (**Figure 11**).



**Figure 11** : Schéma général des méthodes "Clone Infectieux, CI" et "Infectious Subgenomic Amplicons, ISA"

Plusieurs outils de génétique inverse sont aujourd'hui disponibles pour produire des virus sauvages ou génétiquement modifiés, chacun d'entre eux possèdent ses propres avantages et inconvénients. Lors de la conception de stratégies expérimentales pour répondre à une question scientifique, il est donc important de sélectionner la méthode de génétique inverse la plus appropriée. Ainsi, si l'objectif est d'étudier les interactions entre la particule virale et l'hôte pendant le cycle naturel du virus, les méthodes permettant la conservation de la diversité génétique des populations virales devraient être utilisées de préférence [85]. D'un autre côté, si l'objectif est de déterminer l'impact d'une ou plusieurs mutations sur les propriétés biologiques du virus, les méthodes permettant la production de populations virales clonales, comme l'utilisation d'un clone infectieux, pourraient être choisies [86].

La méthode ISA nécessite l'amplification de fragments d'ADNc qui sont ensuite directement transfectés dans des cellules permissives permettant ainsi la production de particules virales infectieuses. Au cours de cette amplification par PCR, les polymérases utilisées peuvent faire des erreurs de mésappariements et donc pourraient générer une hétérogénéité virale artificielle [87]. Ainsi, dans l'étude présentée ci-dessous, nous avons étudié l'impact de l'utilisation de la méthode ISA sur la diversité génétique des populations virales et sur le phénotype résultant. En effet, il est maintenant bien établi que le spectre de mutants (c'est-à-dire la variabilité intra-population) façonne le phénotype des virus [71, 72, 88].

La diversité génétique, le fitness répliatif *in cellulo* et la pathogénicité *in vivo* des virus générés à l'aide de la méthode ISA ont été étudiés et comparés à ceux des populations virales clonales générées à l'aide d'un clone infectieux. Comme nous l'avons indiqué précédemment, la méthode ISA nécessite l'utilisation de polymérases et il existe des polymérases présentant des fidélités variables. Nous avons donc tenté d'utiliser des polymérases de haute-fidélité afin de réduire la variabilité génétique des populations produites par la méthode ISA. Nous avons également développé une nouvelle méthode de génétique inverse, dérivée de la méthode ISA, appelée « clonal-ISA » qui permet de produire une population clonale de virus tout en conservant les avantages de la méthode ISA (c'est-à-dire l'utilisation de fragments d'ADN subgénomique ainsi que la rapidité, la flexibilité et la versatilité de la méthode).

Le virus du Chikungunya (CHIKV; *Togaviridae*; *Alphavirus*) ainsi que le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV ; *Flaviviridae* ; *Flavivirus*) ont été utilisés comme modèle dans cette étude. Les deux souches choisies de ces virus sont : la souche LR2006 du CHIKV (génotype Est-Central-Sud-Africain) pour laquelle un clone infectieux (CI) a déjà été décrit et la souche Oshima 5-10 du TBEV isolée au Japon en 1995 [89, 90].

## Matériels et méthodes

### Cellules et Animaux

Les cellules Vero (dérivées du rein du vervet vert africain) ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu essentiel minimal (Life Technologies) avec 7% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (FBS, Life Technologies), 1% de pénicilline/streptomycine (PS; 5000 U.mL<sup>-1</sup> et 5000 µg.mL<sup>-1</sup>; Life Technologies) et 1% de glutamine (Gln; 200 mmol.L<sup>-1</sup>; Life Technologies). Les cellules HEK-293 (cellules embryonnaires de rein humain) ont été cultivées à 37 ° C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans le même milieu que les cellules Vero mais avec 1% d'acides aminés non essentiels (Life Technologies) en plus.

Les souris femelles C57Bl/6J de trois semaines ont été fournies par le laboratoire Charles River (France). Les « protocoles animaux » ont été examinés et approuvés par le "Comité d'éthique en expérimentation animale de Marseille" (Protocole n°2504). Les expériences sur les animaux ont été effectuées conformément à la législation européenne relative à l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques (directive 210/63/UE) et conformément aux directives nationales françaises.

### Clones Infectieux (CI)

Nous avons utilisé des CI, un de la souche LR2006 du CHIKV et un autre de la souche Oshima 5-10 du TBEV [89, 90]. Ces génomes complets sont flanqués en 5' et 3' respectivement par le promoteur du cytomégalo virus humain (pCMV) et le signal de polyadénylation du virus simian 40 (HDR/SV40pA). Toutes ces régions ont été insérées dans un plasmide pBR322.

Nous avons modifié le CI du CHIKV en introduisant une mutation synonyme à la position 4420 (C → A). En bref, le fragment d'intérêt a été retiré de la séquence codante du CI du CHIKV par digestion (grâce aux enzymes MfeI et AgeI) et remplacé par le fragment muté. Le fragment muté a été obtenu en utilisant deux amorces mutées chevauchantes. Les deux produits de PCR résultants ont ensuite été fusionnés par PCR de fusion. L'intégrité des CI a été contrôlée en effectuant des cartes de restriction (grâce à l'enzyme NheI) et leurs séquences ont été vérifiées par séquençage.

Transfection.

Une quantité totale de 1 µg d'un mélange équimolaire des trois fragments d'ADNc (amplicons) ou 1 µg de clone infectieux ont été transfectés. Pour cela, deux mix ont été préparés. Le premier contient 125 µL d'optiMEM (Gibco®) et 7,5 µL de Lipofectamine 3000 (Life Technologies). Le second contient 125 µL d'optiMEM (Gibco®), l'ADN à transfecter (1 µg) et 2 µL du réactif fourni (Life Technologies). Après 5 minutes à température ambiante, les deux mix sont mélangés puis laissés de nouveau 5 minutes à température ambiante. Le mix final a été ajouté à une flasque de culture de 12,5 cm<sup>2</sup> de cellules HEK-293 à 90% confluentes, contenant 2 mL de milieu sans antibiotiques. Après 24 h à 37°C, le surnageant des cellules a été éliminé, les cellules ont été rincées deux fois avec du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; Life Technologies) et 3,5 mL de milieu frais ont été ajoutés à la flasque.

Le surnageant des cellules a été récolté après 6 à 7 jours, centrifugé, aliquoté et stocké à -80°C. Chaque virus a ensuite été passé sur une nouvelle flasque de cellules Vero. Les passages ont été réalisés en inoculant 333 µL de surnageant de l'ancienne flasque dans une nouvelle flasque de culture de 12,5 cm<sup>2</sup> contenant 666 µL de milieu. Après 2 h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été rincées deux fois avec du HBSS et 3,5 mL de milieu frais ont été ajoutés. Le surnageant des cellules a été récolté et aliquoté comme décrit ci-dessus.

Ces surnageants de culture ont été utilisés pour quantifier l'ARN viral, pour réaliser les expériences de TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose), pour entreprendre les expériences de compétition de virus et pour effectuer les expériences *in vivo*. Les génomes des virus présents dans ces surnageant ont été séquencés (voir « *Séquencage et analyse des génomes* »).

PCR quantitative en temps réel.

Afin d'évaluer la production de particules virales dans les surnageants de culture, les quantités d'ARN viral ont été mesurées en utilisant le kit « GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System » (Promega) et toutes traces d'ADN restantes ont été détectées par le kit « Takyon » (Eurogentec). Le kit « EZ1 mini virus 2.0 » et le robot « EZ1 Biorobot » (tous deux de Qiagen) ont été utilisés pour extraire les ARN, selon les instructions du fabricant.

Le mix « GoTaq » (volume final de 20 µL) contient 10 µL de « 2X Master Mix », 0,5 µL de chaque amorces (10 µM), 0,13 µL de sonde spécifique (10 µM), 0,5 µL de « GoSCRIPT RT Mix », 0,87 µL d'eau et 7,5 µL d'acides nucléiques extraits. Le mix « Takyon » (volume final de 20 µL) est composé de 10 µL de « Takyon TM Master Mix », 0,5 µL de chaque

amorces (10  $\mu\text{M}$ ), 0,16  $\mu\text{L}$  de sonde spécifique (10  $\mu\text{M}$ ), 3,84  $\mu\text{L}$  d'eau et 5  $\mu\text{L}$  d'acides nucléiques extraits.

Ces PCR en temps réel ont été effectuées à l'aide du « CFX96 Touch real-time PCR Detection System Touch » (Bio-Rad) dans les conditions suivantes: 50°C pendant 15 min, 95°C pendant 2 min, suivi de 40 cycles de 95°C pendant 15s et 60°C pendant 1 min. Les données sont récupérées pendant l'étape à 60°C.

Les quantités d'ADN détectées étaient négligeables par rapport aux taux d'ARN viral ( $10^6$  fois inférieur). La production d'ARN viral a été évaluée par les valeurs « cycle threshold » (Ct). Les quantités d'ARN viral exprimées en « limite de détection de dose » (unité arbitraire; UA) ont été déterminées à partir de courbes standardisées (les standards étaient des acides nucléiques viraux issus des surnageants de culture).

Titration par Tissue-culture infectieuse dose 50 (TCID<sub>50</sub>)

La TCID<sub>50</sub> (« Tissue-Culture Infectious Dose 50 ») correspond à la dose infectante entraînant un Effet Cytopathogène (ECP) sur 50% des cellules inoculées [91]. Pour chaque virus, deux plaques de 96 puits de cellules Vero à 90% de confluence, contenant 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture par puits, ont été inoculées par 50  $\mu\text{L}$  de surnageant de culture pour chaque puits. Au préalable, les surnageants de culture étaient dilués au dixième en cascade afin d'obtenir les 50  $\mu\text{L}$  à inoculer à différentes dilutions. Chaque colonne des plaques comprenait six puits d'une même dilution et deux témoins négatifs. Les plaques ont été incubées pendant 7 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide puis observées afin de distinguer les puits avec ou sans ECP. Cette observation en point final permet la détermination de la TCID<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup> grâce à la méthode de Reed & Muench [92].

Séquençage et analyse des génomes

Les surnageants de culture ont d'abord été centrifugés et traités avec le tampon de lyse viral « AVL » (Qiagen). Après l'extraction de l'ARN en utilisant le kit « EZ1 mini virus 2.0 » et le robot « EZ1 Biorobot » (tous deux de Qiagen), des paires d'amorces spécifiques ont été utilisées pour générer des amplicons chevauchants recouvrant la séquence du génome dans son ensemble (à l'exclusion des 41 nucléotides en amont de la queue polyA) grâce au kit « RT-PCR Taq HIFI System » (Invitrogen).

L'ADN amplifié a été analysé à l'aide du séquenceur haut débit « Ion PGM Sequencer » [93] (Life Technologies) afin d'effectuer le séquençage complet du génome. Les résultats

obtenus sous forme de « reads de séquence » ont été analysés avec le logiciel « CLC Genomics Workbench 6 ». Ces « reads » (petites séquences d'environ 200 nt) ont été corrigés: tout d'abord à l'aide d'un score de qualité, puis par l'élimination des amorces utilisées pendant l'amplification et finalement par la suppression systématique de 6 nucléotides aux extrémités 5' et 3'. Seul les « reads » d'une longueur supérieure à 29 nucléotides ont été utilisés et alignés à la séquence référence du génome viral.

Pour estimer la diversité génétique de la population virale, la fréquence des différentes mutations à chaque position a été calculée de la façon suivante : nombre de « reads » avec la mutation sur le nombre total de « reads » obtenues à cette position. Pour l'analyse finale des données, seule les substitutions avec une fréquence d'au moins 1% ont été prises en compte.

#### Analyse statistique

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel R [94]. Il s'agit du test de Shapiro-Wilk, du test de Wilcoxon, du test de Fischer, du test de Welch, du test de Student et de test de Kaplan-Meier.

# Partie A : Impact de la méthode ISA sur les populations virales

## 1. Matériels et méthodes spécifiques

Préparation des fragments pour la méthode ISA

Les génomes complets ont été amplifiés par PCR en trois fragments d'ADN chevauchants de 4,8 kb, 2,9 kb et 5,2 kb pour le CHIKV et de 4,8 kb, 4,1 kb et 3,4 kb pour le TBEV. Les amplicons ont été produits à l'aide du kit « Platinum PCR SuperMix High Fidelity » (Life Technologies). Le mélange (volume final de 50  $\mu\text{L}$ ) consiste en 45  $\mu\text{L}$  de « SuperMix », 2  $\mu\text{L}$  d'ADN à 1  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (clone infectieux) et 200 nM de chaque amorce. Cette PCR a été effectuée sur un thermocycleur « Biometra Professional Standard Gradient » dans les conditions suivantes: à 94°C pendant 2 min suivi de 40 cycles à 94°C pendant 15s, 56°C pendant 30s et 68°C pendant 5 min.

Expériences de compétition *In cellulo*

Pour comparer plus précisément le fitness répliatif des virus générés à l'aide d'un CI ou de la méthode ISA, le virus du CHIKV a été mis en compétition avec celui modifié. Chaque virus a été généré en utilisant les deux méthodes en double (deux transfections indépendantes). Le virus du CHIKV produit à partir du CI a été mis en compétition avec le virus modifié produit en utilisant la méthode ISA (deux compétitions avec des virus provenant de deux transfections différentes) et le virus modifié produit à partir du CI a été mis en compétition avec le virus non-modifié produit en utilisant la méthode ISA (deux compétitions avec des virus provenant de deux transfections différentes).

Pour chacune de ces quatre expériences de compétition, trois puits d'une plaque de 6 puits ont été utilisés. Les cellules Vero à 90% de confluence ont été inoculées avec un mélange des deux virus (avec un rapport 50/50 de  $\text{TCID}_{50}$  et une multiplicité d'infection de 0,5) 2 heures à 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ , rincées (HBSS) puis incubées pendant 48 heures après l'addition de 4 mL de milieu frais. La multiplicité d'infection correspond au nombre de particules infectieuses par cellule lors de l'infection. Le surnageant récupéré a ensuite été passé 10 fois, de la même manière, sur une nouvelle plaque de 6 puits de cellules Vero. L'ARN viral a été extrait à partir de 200  $\mu\text{L}$  de surnageant en utilisant le kit « EZ1 mini virus 2.0 » et le robot « EZ1 Biorobot » (tous deux de Qiagen).

La proportion relative de chaque virus a été évaluée en amplifiant et séquençant un fragment génomique de 252 paire de bases comprenant la position 4420 qui différencient ces deux virus (voir ci-dessus): l'amorce sens (ACTTCTCTAATTATTTCGGAGTCT, position 4291) et celle antisens (TGGCCTCAGATATTTTCTTCTC, position 4521) ont été utilisées avec le kit « Superscript III One-Step RT-PCR Platinum *Taq* High Fidelity » (Life Technologies). Les amplicons ont été séquencés comme décrit ci-dessous. La proportion de bases C/A, à la position 4420, a permis de calculer la quantité relative de chaque virus.

#### Expériences d'adaptation

Un virus réencodé du CHIKV précédemment décrit a été utilisé [89]. Il a été transfecté comme décrit précédemment puis passé cinq fois sur de nouvelles cellules. A chaque passage, les surnageants de culture ont été centrifugés et aliquotés. Les ARN viraux présents au sein de ces surnageants ont été extraits comme précédemment expliqué. Les génomes des virus des surnageants de culture ont été séquencés en utilisant le séquenceur haut débit « Ion PGM » (Life Technologies) [93]. Comme précédemment, la diversité génétique des populations virales a été évaluée. Avant le premier et au quatrième passage, des titrages par TCID<sub>50</sub> ont été réalisés.

#### Expériences *in vivo*

Des souris femelles C57Bl/6J de trois semaines ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 100 µL contenant 2.10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> de virus TBEV générés à l'aide du CI ou de la méthode ISA. Un groupe témoin de souris a été utilisé, elles ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 100 µL de « Phosphate Buffer Saline » (PBS).

Les souris ont été surveillées quotidiennement afin d'établir des courbes de survie. Les cerveaux et les rates ont été récupérés à partir des souris euthanasiées. Les échantillons ont été collectés dans 500 µL de PBS supplémenté par 20% de Sérum de Veaux Fœtal (SVF) et une bille de tungstène. Les organes ont été broyés à l'aide d'un « TissueLyser » (Qiagen) pendant 4 minutes à 30 cycles/s, puis centrifugés 5 minutes à 3500 tours/min. Les surnageants des organes traités ont ensuite été aliquotés et conservés à -80°C. Des tests de RT-qPCR ont été effectués en utilisant ces surnageants. L'extraction d'acide nucléique a été réalisée à l'aide de 40µL de surnageant, 150µL de tampon de lyse « AVL » (Qiagen) et 10µL de bactériophage MS2 (servant de contrôle interne) en utilisant le kit « EZ1 RNA Tissue Mini » et le robot « EZ1 Biorobot » (tous deux de Qiagen). Les taux d'ARN viral ont été exprimés en fonction du taux d'actine, également déterminé par RT-qPCR, contenu dans l'échantillon.

## 2. Résultats

Nous avons étudié l'impact des méthodes de génétique inverse sur la diversité génétique des populations virales, le fitness répliatif *in cellulo* et la pathogénicité *in vivo*.

Deux souches du virus du Chikungunya (souches LR2006 OPY) ont été utilisées: la souche sauvage (appelée « WTchik ») et une souche dérivée de la première (appelée « \*WTchik ») qui se différencie de la précédente par une seule mutation synonyme (C→A à la position 4420). La souche Oshima 5-10, du virus de l'encéphalite à tiques, a également été utilisée, nommée « WTtbe ».

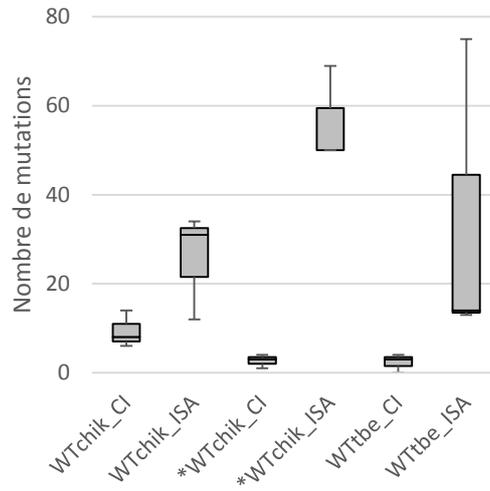
Les CI de ces trois souches étaient disponibles au laboratoire et ont permis de produire des virus appelés WTchik\_CI, \*WTchik\_CI et WTtbe\_CI. En utilisant ces CI en tant que substrat de la PCR, des virus ont été produits grâce à la méthode ISA et ont été nommés WTchik\_ISA, \*WTchik\_ISA et WTtbe\_ISA.

Des cellules HEK-293 ont été transfectés et les surnageants ont ensuite été passés sur des cellules Vero. Les surnageants de culture aliquotés ont été utilisés pour les analyses.

Impact sur la diversité génétique des populations virales

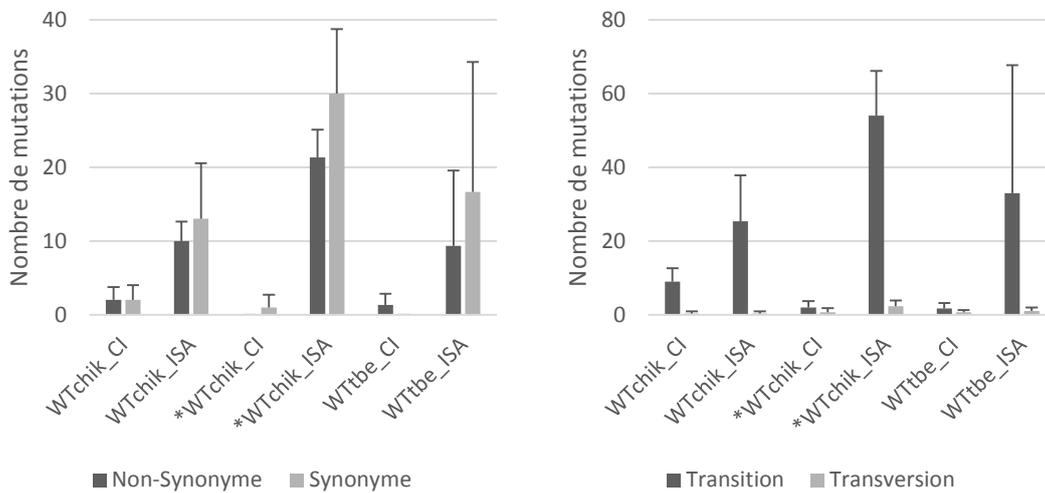
Afin d'évaluer l'influence de la méthode ISA sur la diversité génétique des populations virales et de la comparer à celle des virus générés à partir d'un CI, les génomes des virus WTchik\_CI, WTchik\_ISA, \* WTchik\_CI, \* WTchik\_ISA, WTtbe\_CI et WTtbe\_ISA ont été séquencés (en utilisant les séquences des CI comme références, les substitutions avec une fréquence supérieure ou égale à 1% ont été prises en compte pour l'analyse).

En premier lieu, les virus générés à l'aide de la méthode ISA présentaient un nombre moyen de mutations plus élevé que les virus produits à l'aide d'un CI (25,67 contre 9,33, 56,33 contre 2,67 et 34 contre 2,33 pour les virus WTchik, \*WTchik et WTtbe respectivement ; **Figure 12**). Cette différence n'est significative que pour le virus \*WTchik (test de Welch,  $p = 0,0124$ ).



**Figure 12 :** Nombre de mutations pour les virus WTchik, \*WTchik et WTtbe  
 La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus produits en trois exemplaires.

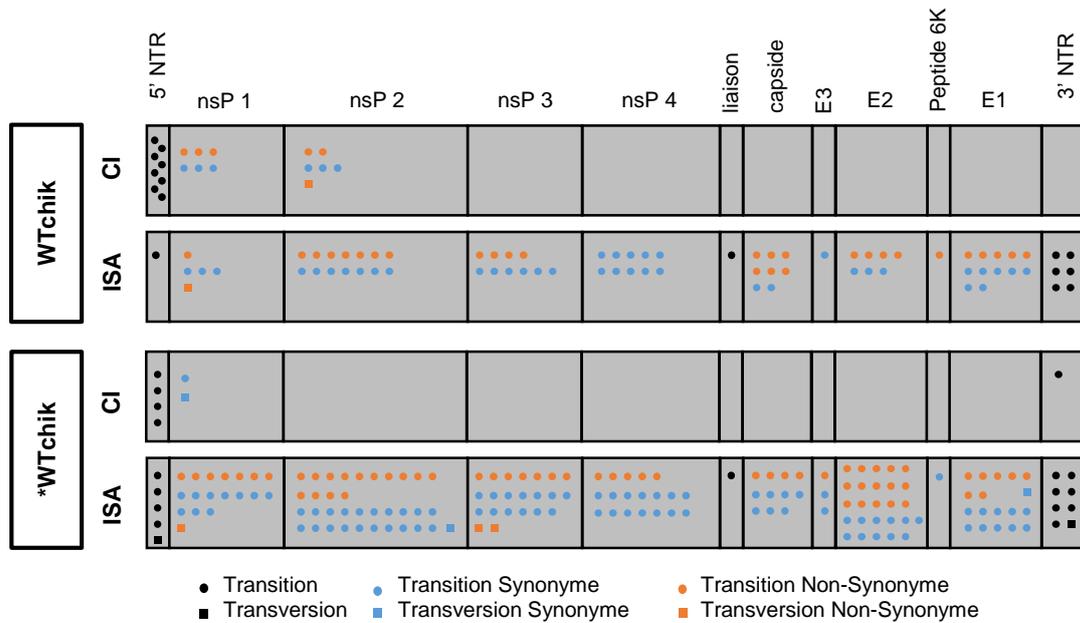
Quelle que soit la méthode de génétique inverse utilisée pour générer les virus, nous avons toujours retrouvé une petite majorité de mutations synonymes et une grande majorité des transitions à l'exception des virus WTtbe\_CI qui ne présentaient pas de mutations synonymes (**Figure 13**).



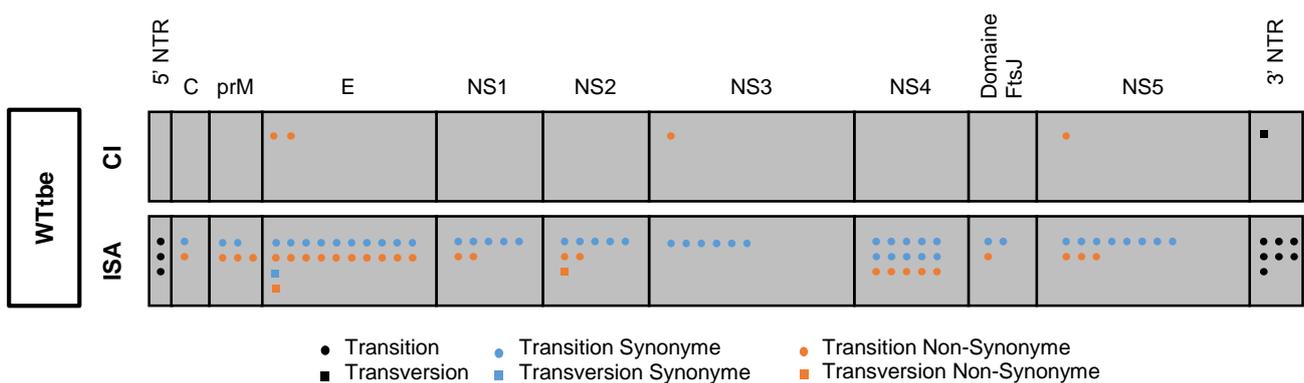
**Figure 13 :** Nombre et caractéristiques des mutations pour les virus WTchik, \*WTchik et WTtbe  
 La barre d'erreur représente l'écart-type pour chaque virus produits en trois exemplaires.

Pour tous les virus, les mutations observées chez les populations virales produites à l'aide de la méthode ISA étaient réparties de manière aléatoire sur l'ensemble du génome. Pour les virus du Chinkungunya, les mutations observées chez les virus générés par la transfection

d'un CI se situaient principalement dans la région 5' non traduite (5'NTR) et la région nsP1 (70% et 86% des sites de mutations pour WTchik et \*WTchik respectivement ; **Figure 14**). Pour le virus de l'encéphalite à tiques, ces mêmes mutations étaient réparties sur 4 régions du génome. Néanmoins, devant le faible nombre de mutations retrouvées chez les virus WTtbe\_CI, il reste difficile d'interpréter ces résultats (**Figure 15**).



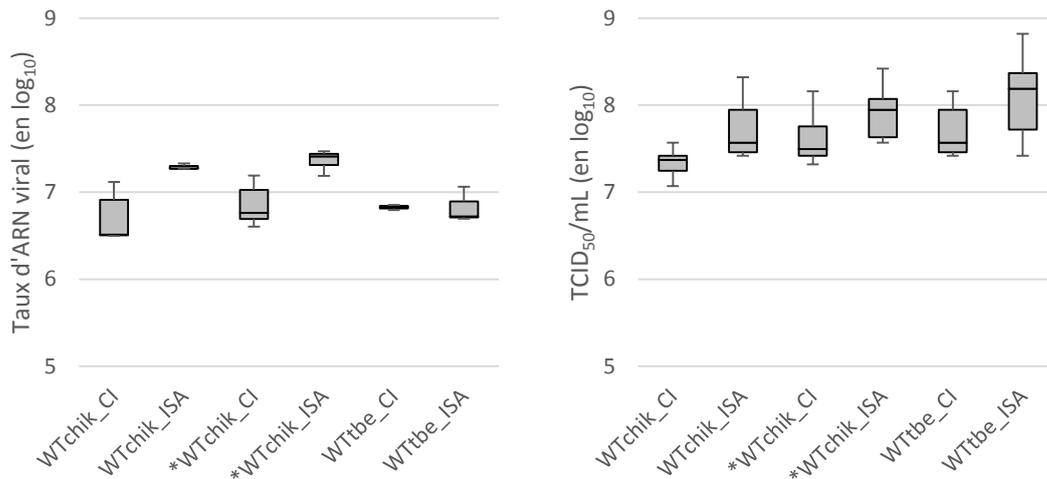
**Figure 14** : Sites et caractéristiques des mutations des virus WTchik et \*WTchik sur le génome du virus du *Chikungunya*



**Figure 15** : Sites et caractéristiques des mutations des virus WTtbe sur le génome du virus de l'encéphalite à tiques

Impact sur le fitness répliatif *in cellulo*

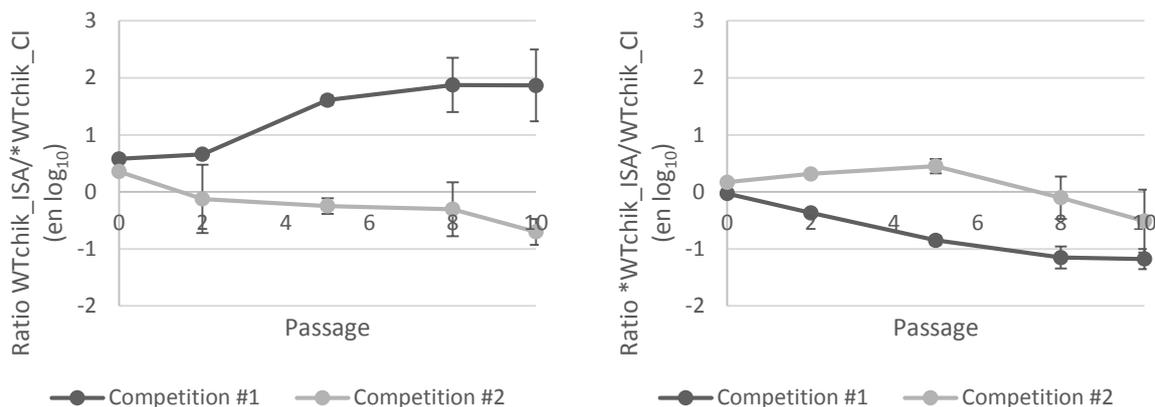
Afin de déterminer l'impact de la méthode ISA sur le fitness répliatif *in cellulo*, les quantités d'ARN viral (dosage de RT-qPCR) et de titres infectieux (essai TCID<sub>50</sub>) des surnageants de culture ont été déterminés. Pour les deux types de virus, dans les deux expériences, des valeurs similaires ont été retrouvées et aucune différence significative n'a été observée (tests de Student et de Wilcoxon, **Figure 16**).



**Figure 16 :** Taux d'ARN viral et titres infectieux pour les virus WTchik, \*WTchik et WTtbe  
La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus produits en trois exemplaires.

Avec les virus du Chikungunya, nous avons conduit des expériences de compétition. Il s'agit d'une méthode plus sensible permettant de comparer le fitness répliatif de deux virus. Les virus WTchik et \*WTchik ont été mixés à un rapport initial de TCID<sub>50</sub> de 50/50 pour infecter des cellules Vero. Les surnageants ont été passés 10 fois afin de permettre un suivi régulier et à long terme des populations virales. La proportion relative de chaque virus a été évaluée aux passages 0, 2, 5, 8 et 10 en amplifiant et séquençant un fragment génomique comprenant la position 4420, qui différencie les deux virus (les résultats ont été exprimés en log<sub>10</sub> du rapport virus produits par la méthode ISA / virus issus de la transfection d'un CI).

Dans l'ensemble, aucune tendance franche n'a pu être mise en évidence (**Figure 17**): lors de trois compétitions, les virus issus de la transfection d'un CI ont semblé prendre un léger avantage (rapport final moyen situé entre -0,51 et -1,18 en log<sub>10</sub>), alors que les virus produits par la méthode ISA ont pris un ascendant un peu plus net lors d'une seule compétition (rapport final moyen de 1,87 en log<sub>10</sub>). Il est à noter que nous avons retrouvé une faible variabilité entre les trois réplicas d'une même compétition (représenté par l'écart-type de la **Figure 17**).

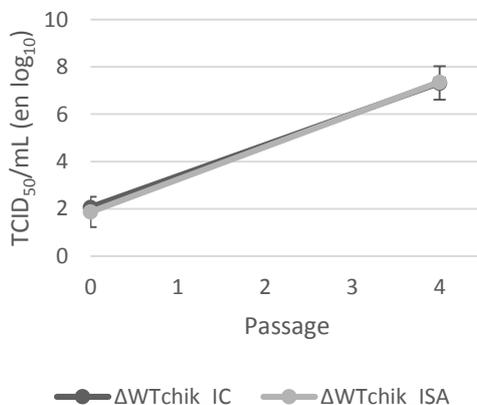


**Figure 17 :** *Compétitions représentées par le ratio virus « ISA » / virus « CI »*

*Evolution du ratio virus produits par la méthode ISA (virus « ISA ») / virus issus de la transfection d'un CI (virus « CI ») au cours des passages successifs. Les barres d'erreurs représentent les écart-type à chaque passage pour chaque compétition réalisée en trois exemplaires.*

Impact sur l'évolution d'un virus ré-encodé du Chikungunya

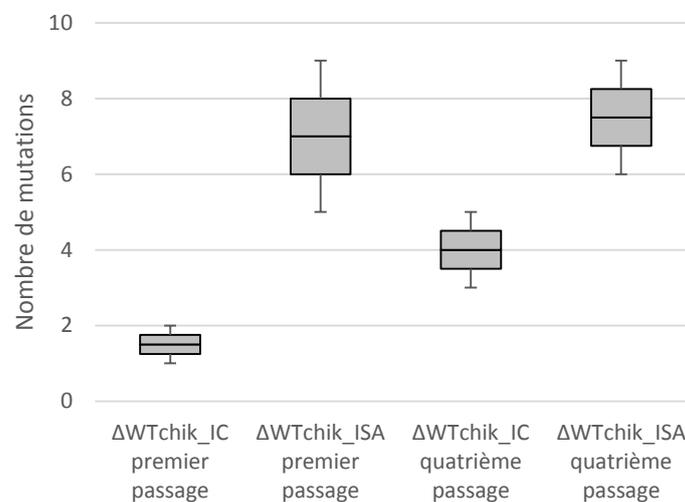
Parce que nous n'avons trouvé aucune différence de fitness répliatif avec l'utilisation des virus sauvages (probablement bien adaptés aux conditions de culture), nous avons décidé de travailler avec une souche du virus du Chikungunya ayant un faible fitness répliatif. Cette souche ré-encodée, précédemment décrite, nommée «  $\Delta$ WTchik »), qui contient 882 mutations synonymes localisées dans trois régions codantes différentes, est connue pour augmenter son fitness répliatif lors de passages en série dans des cellules Vero [89]. Par conséquent, nous avons essayé de déterminer l'influence de l'utilisation de la méthode ISA sur l'évolution de son fitness répliatif au cours de passages successifs. Nous avons constaté que les titres infectieux avant le premier et après le quatrième passage étaient similaires pour les virus  $\Delta$ WTchik\_CI et  $\Delta$ WTchik\_ISA (**Figure 18**).



**Figure 18 :** *Evolution du titre infectieux des virus  $\Delta$ WTchik*

*Les barres d'erreurs représentent les écart-type à chaque passage pour chaque virus produits en deux exemplaires.*

Les génomes des virus  $\Delta$ WTchik\_CI et  $\Delta$ WTchik\_ISA ont également été séquencés en double aux premier et quatrième passages. Dans les deux cas, les résultats ont révélé que les virus  $\Delta$ WTchik\_ISA avaient plus de mutations que les virus  $\Delta$ WTchik\_CI (**Figure 19**). Nous avons également observé que les virus  $\Delta$ WTchik\_CI avaient chacun fixé une mutation (5467G> A et 1597C> T respectivement pour les répliques #1 et #2) et qu'il existait une augmentation progressive du nombre de mutations de basse fréquence entre le premier et le quatrième passage. Différentes voies évolutives ont été observées avec les virus  $\Delta$ WTchik\_ISA: les fréquences des mutations étaient variables au cours des passages mais ont toujours été inférieures à 73%.



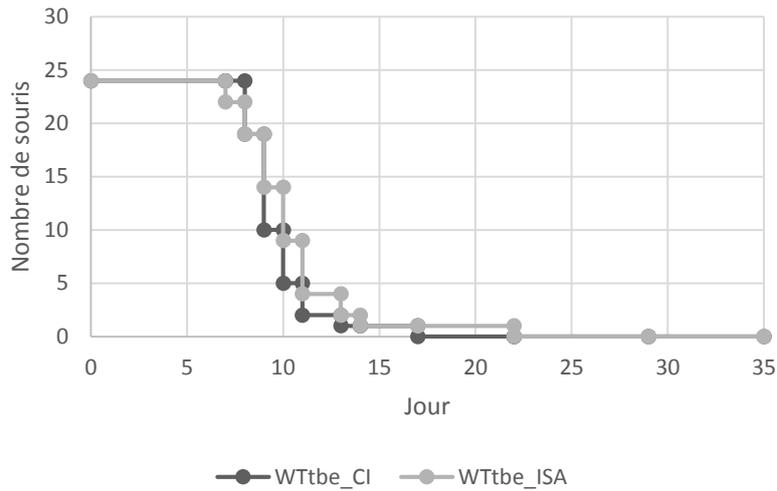
**Figure 19** : Nombre de mutations par passage pour les virus  $\Delta$ WTchik

La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus produits en deux exemplaires à chaque passage.

#### Impact sur la pathogénicité *in vivo*

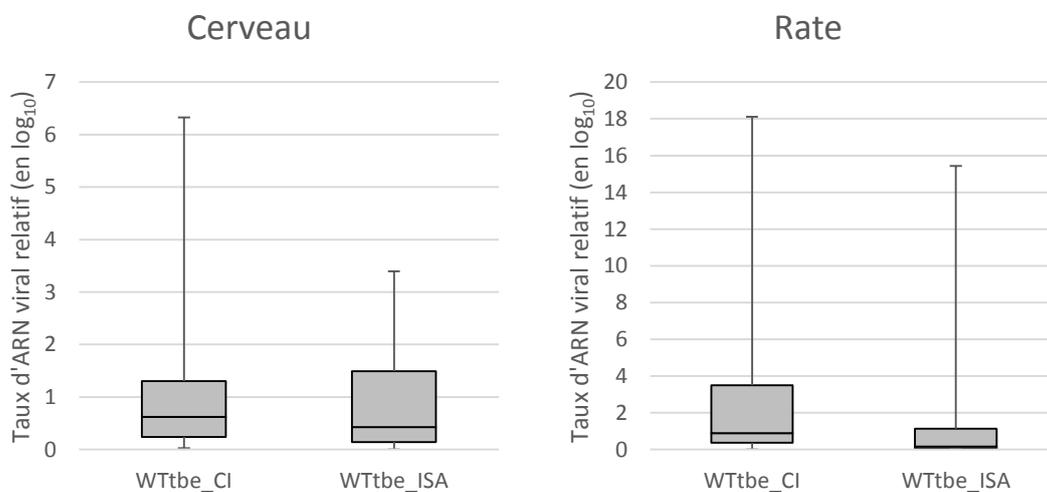
Pour évaluer l'impact de la méthode ISA sur la pathogénicité *in vivo*, des souris femelles C57Bl/6J de trois semaines ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 100  $\mu$ L contenant  $2.10^6$  TCID<sub>50</sub> de virus WTtbe\_CI ou WTtbe\_ISA. Les deux groupes de rongeurs ont été suivis quotidiennement afin d'établir des courbes de survie. Les quantités d'ARN viral présentes dans le cerveau et la rate ont été déterminées par RT-qPCR.

Le suivi de la mortalité des animaux n'a pas démontré de différence significative entre les deux méthodes de génétique inverse : la mortalité était de 100% dans les deux cas et les courbes de survie étaient similaires (test de Kaplan-Meier,  $p = 0.28$  ; **Figure 20**).



**Figure 20 :** Courbe de survie des animaux infectés par les virus *WTtbe*

Que ce soit dans le cerveau ou dans la rate, les quantités d'ARN retrouvées étaient similaires entre les deux groupes de souris et aucune différence significative n'a été observée (test de Student ; **Figure 21**).



**Figure 21 :** Taux d'ARN viral relatif des virus *WTtbe* dans les organes de souris

Le taux d'ARN viral est pondéré par le taux d'actine présent dans chaque échantillon. La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus chez toutes les souris.

### 3. Discussion

La méthode ISA, récemment décrite, permet une production facilitée de virus à ARN puisqu'elle ne nécessite notamment pas d'étape de clonage [70]. Cependant les propriétés biologiques de ces virus n'ont jamais été étudiées et comparées à celles des virus générés par la méthode communément utilisée, le CI.

Nos résultats ont confirmé que la transfection d'un clone infectieux dans des cellules permissives conduit à la production d'une population virale homogène, puisqu'après la transfection d'un CI de trois virus différents, le nombre moyen de mutations à une fréquence supérieur ou égale à 1% était faible (9,33, 2,67 et 2,33 respectivement pour WTchik\_CI, \*WTchik\_CI et WTtbe\_CI).

Au cours de la procédure ISA, l'utilisation de polymérases lors de la PCR pouvait avoir un impact sur la diversité génétique des populations virales générées. Nos résultats ont confirmé cette hypothèse. Les virus produits par la méthode ISA ont présenté un nombre moyen de mutations supérieurs à ceux générés à partir d'un CI. De plus, ces mutations étaient distribuées sur l'ensemble du génome. Cette observation renforce l'idée que ces mutations ont été introduites aléatoirement lors de l'amplification par PCR. A l'inverse, les virus générés à partir d'un CI présentaient des sites de mutations spécifiques (particulièrement pour WTchik\_CI et \*WTchik\_CI).

Malgré ces différences, quel que soit la méthode de génétique inverse employée, les mutations observées présentent les mêmes caractéristiques. Pour tous les virus, nous avons retrouvé une majorité de transition et une majorité de mutation synonyme (sauf pour les virus WTtbe\_CI qui présentaient 100% de mutation non-synonyme). Les populations virales produites grâce à la méthode ISA ne semblent donc pas être complètement différentes, d'un point de vue des caractéristiques mutationnelles, de celles générées par la transfection d'un CI.

Afin de comparer le fitness répliatif des virus produits par les deux systèmes de génétique inverse, plusieurs expériences ont été mises en œuvre.

Tout d'abord nous avons mis en évidence, qu'après la transfection et un passage sur de nouvelles cellules, des quantités similaires de virus étaient produites. Le dosage par RT-qPCR des taux d'ARN viral présents au sein des surnageants de culture a clairement montré que ceux-

ci n'étaient pas impactés par la méthode de génétique inverse utilisée. Les résultats de TCID<sub>50</sub> ont démontré que ces virus étaient également à des titres infectieux comparables *in cellulo*.

Suite à ces premiers résultats, annonçant une grande similitude entre les 2 populations virales, une étude plus précise du fitness répliatif de ces virus a été menée et a conduit à la même conclusion.

Lors des expériences de compétition, les virus issus de la transfection d'un CI ont pris 3 fois sur 4 un léger avantage sur leurs homologues générés par la méthode ISA ce qui ne permet pas de conclure à une différence marquée entre ces deux populations.

De plus, avant le premier passage des virus réencodés,  $\Delta$ WTchik\_CI et  $\Delta$ WTchik\_ISA, leurs titres infectieux étaient faibles et identiques. Au quatrième passage, ils étaient tous deux élevés. Quel que soit le système de génétique inverse utilisé, les virus sont donc capables de regagner une infectivité similaire même s'ils ne présentent pas la même variabilité génétique (représentée par le nombre de mutation au premier et quatrième passage).

Les résultats obtenus lors de l'étude *in vivo* ont corroboré l'ensemble des conclusions précédentes. Les courbes de survie des animaux infectés par les virus WTtbe\_CI ou WTtbe\_ISA n'étaient pas significativement différentes. De plus, dans les deux groupes de souris nous avons retrouvé 100% de mortalité. Les quantités d'ARN viral détectées au sein des cerveaux et des rates de souris étaient, dans les deux groupes, très variables d'une souris à l'autre mais n'ont pas révélé de différence particulière. Ainsi, les virus présentaient la même pathogénicité *in vivo* quel que soit le système de génétique inverse utilisé.

Nous avons donc confirmé notre hypothèse de départ, à savoir : les virus générés par l'utilisation de la méthode ISA présentent une variabilité génétique supérieure à celle retrouvée chez les virus issus de la transfection d'un CI. Une grande partie de cette hétérogénéité a fort probablement été générée par les erreurs de mésappariements introduites par la polymérase utilisée lors de l'amplification par PCR. Néanmoins, cette variabilité ne semble pas affecter le phénotype des virus générés par la méthode ISA : leurs fitness répliatifs étaient similaires à ceux des virus produits par un CI.

Par conséquent, la méthode ISA peut donc être une procédure de choix pour l'étude des virus à ARN, lorsque, par exemple, un CI est difficile à construire.

## Partie B : Nouvelles perspectives

La nouvelle méthode ISA a conduit à la production de populations virales avec une grande variabilité génétique. Même si les virus générés possèdent un phénotype proche des virus issus de la transfection d'un CI, ils sont particulièrement éloignés génétiquement. Pour certaines expériences, il est nécessaire de travailler avec des populations clonales. Aujourd'hui, il n'existe pas d'alternative concrète à l'utilisation d'un CI pour obtenir une population virale homogène génétiquement.

Nous nous sommes donc demandé s'il était possible de combiner les avantages des deux techniques afin de générer une population clonale grâce à la méthode ISA.

Pour cela nous avons développé deux nouvelles approches :

- En premier lieu, nous avons tenté de réduire l'impact de l'amplification par PCR sur l'hétérogénéité génétique viral en utilisant des polymérases de plus haute-fidélité que celle utilisée initialement.
- En second lieu, nous avons décidé de digérer, en grande quantité, des fragments d'ADN cloné dans des plasmides afin de nous dispenser de l'étape de PCR.

Les deux principaux objectifs de ces approches étaient (i) de diminuer la diversité génétique des virus produits par la méthode ISA et, (ii) de conserver tous les avantages de la méthode ISA (c'est-à-dire l'utilisation de fragments d'ADN subgénomique ainsi que la rapidité, la flexibilité et la versatilité de la méthode).

### 1. Fidélité des polymérases

#### *1.1. Matériels et méthodes spécifiques*

Préparation des fragments pour la méthode ISA

Pour le TBEV, les génomes complets ont été amplifiés par PCR en trois fragments d'ADN chevauchants de 4,8 kb, 4,1 kb et 3,4 kb. Les amplicons ont été produits à l'aide du kit « Platinum PCR SuperMix High Fidelity » (Life Technologies) ( $2,2 \cdot 10^{-5}$  erreurs par nucléotide

par cycle) comme décrit précédemment. Ils ont également été produits par la polymérase « Pfu » (Thermo Scientific) ( $2,6 \cdot 10^{-6}$  erreurs par nucléotide par cycle) et par la polymérase « Phusion » (Thermo Scientific) ( $4,4 \cdot 10^{-7}$  erreurs par nucléotide par cycle).

Le mélange (volume final de 50  $\mu$ L) comprend 2  $\mu$ L d'ADN à 1 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> (clone infectieux), 200 nM de chaque amorces et:

- 5  $\mu$ L de tampon « Pfu 10X », 0,75  $\mu$ L de polymérase « Pfu » et 5  $\mu$ L d'un mix de dNTP (désoxyribonucléotides tri-phosphates) pour le kit « Pfu ».
- 10  $\mu$ L de tampon « 5X Phusion », 0,5  $\mu$ L de polymérase « Phusion » et 1  $\mu$ L d'un mix de dNTP pour le kit « Phusion ».

Ces amplifications ont été effectuées sur le même thermocycleur, dans les conditions suivantes, respectivement pour le kit « Pfu » et le kit « Phusion »:

- 95°C pendant 2 min suivie de 30 cycles à 95°C pendant 30s, 57°C pendant 30s et 72°C pendant 10 min.
- 98°C pendant 2 min suivi de 30 cycles à 98°C pendant 10s, 59°C pendant 30s et 72°C pendant 75s.

La taille de tous les fragments obtenus par PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés avec le kit « Amicon Ultra 0,5 mL, Millipore ». Comme les CI ont été utilisés comme échantillon de base pour la PCR, l'élimination complète de cet échantillon de départ avant transfection a été assurée par digestion grâce à l'enzyme de restriction DpnI (New England Biolabs) [70].

#### Expériences *in vivo*

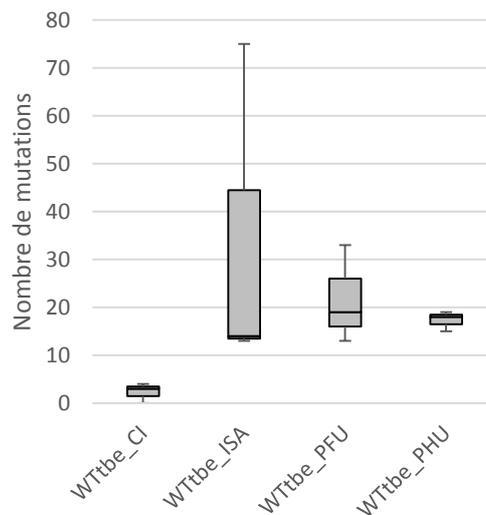
Des souris femelles C57Bl/6J de trois semaines ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 100  $\mu$ L contenant  $2 \cdot 10^6$  TCID<sub>50</sub> de virus TBEV générés à l'aide du CI ou de la méthode ISA. Pour la méthode ISA, les virus générés à partir de la transfection d'amplicons produits par deux kits ont été utilisés : le kit « Platinum PCR SuperMix High Fidelity » (Life Technologies) et le kit « Phusion » (Thermo Scientific). Un groupe témoin de souris a été utilisé. Dans ce groupe les souris ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 100  $\mu$ L de « Phosphate Buffer Saline » (PBS).

## 1.2.Résultats

Impact sur la diversité génétique des populations virales

Afin d'évaluer l'impact de l'utilisation de polymérase de haute-fidélité lors de la méthode ISA sur la diversité génétique des populations virales, les génomes des virus WTtbe\_PFU et WTtbe\_PHU ont été séquencés et comparés aux séquences génomiques des virus WTtbe\_CI et WTtbe\_ISA.

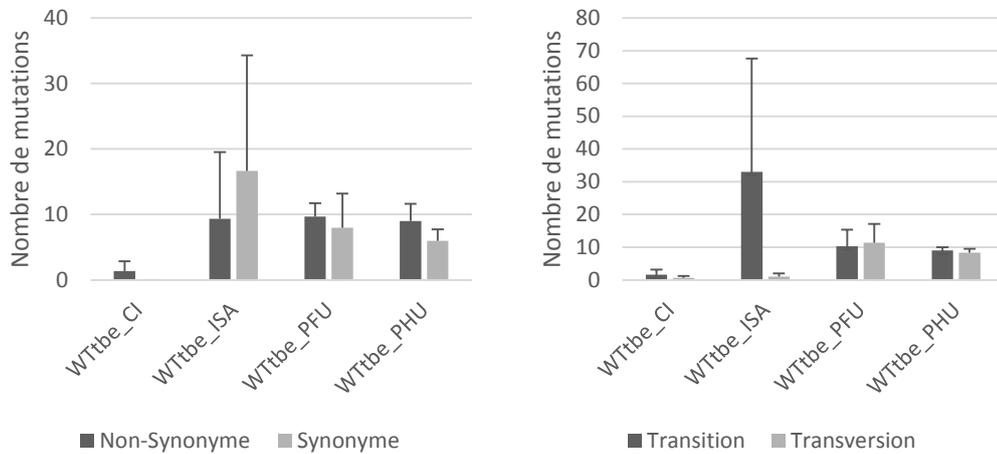
Les nouveaux virus générés à l'aide de la méthode ISA présentaient un nombre moyen de mutations plus élevé que les virus WTtbe\_CI (21,67 contre 2,33 et 17,3 contre 2,33 pour les virus WTtbe\_PFU et WTtbe\_PHU respectivement ; **Figure 22**). Cette différence n'est significative que pour le virus WTtbe\_PHU (test de Student,  $p = 0,001$ ). Ces nouveaux virus présentaient également un nombre moyen de mutations moins élevé que les virus WTtbe\_ISA, mais cette différence n'était pas significative (test de Wilcoxon ; **Figure 22**).



**Figure 22 : Nombre de mutations pour les virus WTtbe**

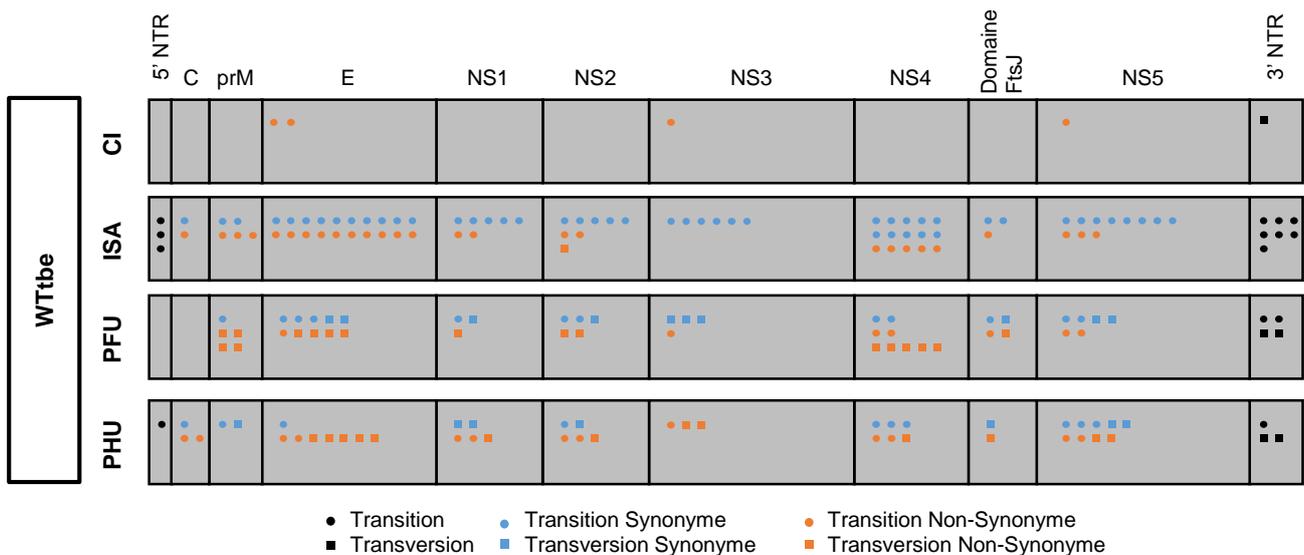
La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus produits en trois exemplaires.

Contrairement aux résultats précédemment exposés, les virus WTtbe\_PFU et WTtbe\_PHU présentaient une majorité de mutations non-synonymes et un nombre sensiblement identique de transitions et de transversions (**Figure 23**).



**Figure 23** : Nombre et caractéristiques des mutations pour les virus WTtbe  
La barre d'erreur représente l'écart-type pour chaque virus produits en trois exemplaires.

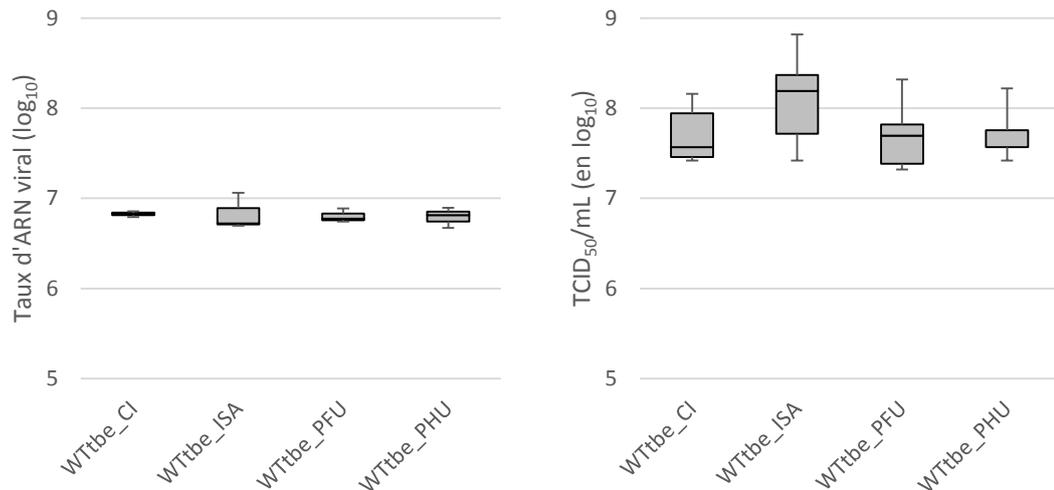
Que ce soit pour le virus WTtbe\_ISA, WTtbe\_PFU ou WTtbe\_PHU, les mutations étaient réparties sur l'ensemble du génome (uniquement les virus WTtbe\_PFU disposaient de 2 régions non mutées). Les mutations observées chez les virus issus de la transfection d'un CI se situaient sur 4 régions du génome. Ces résultats restent difficiles à interpréter à cause du faible nombre de mutations retrouvées chez les virus WTtbe\_CI (**Figure 24**).



**Figure 24** : Sites et caractéristiques des mutations des virus WTtbe sur le génome du virus de l'encéphalite à tiques

### Impact sur le fitness répliatif *in cellulo*

Pour estimer l'influence de l'utilisation de polymérase de haute-fidélité lors de la méthode ISA sur le fitness répliatif *in cellulo*, les quantités d'ARN viral (dosage par RT-qPCR) et de titres infectieux (TCID<sub>50</sub>) des surnageants de culture ont été déterminés. Dans tous les cas, des valeurs similaires ont été retrouvées et aucune différence significative n'a été observée (tests de Student et de Welch ; **Figure 25**).



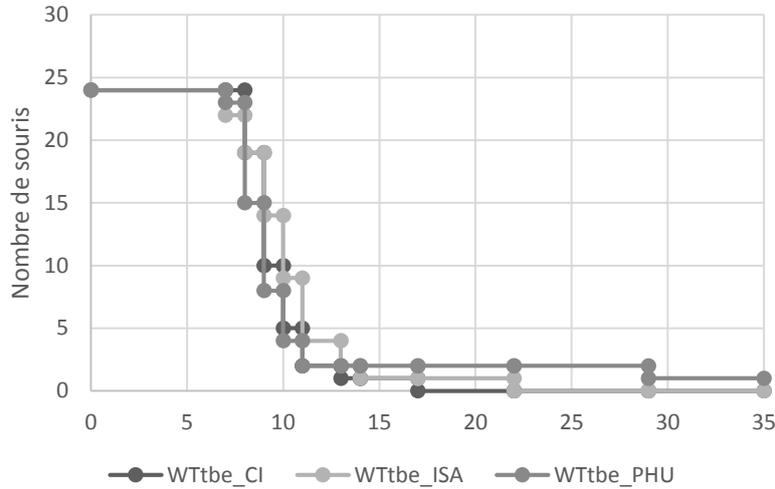
**Figure 25** : Taux d'ARN viral et titres infectieux pour les virus WTtbe

La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus produits en trois exemplaires.

### Impact sur la pathogénicité *in vivo*

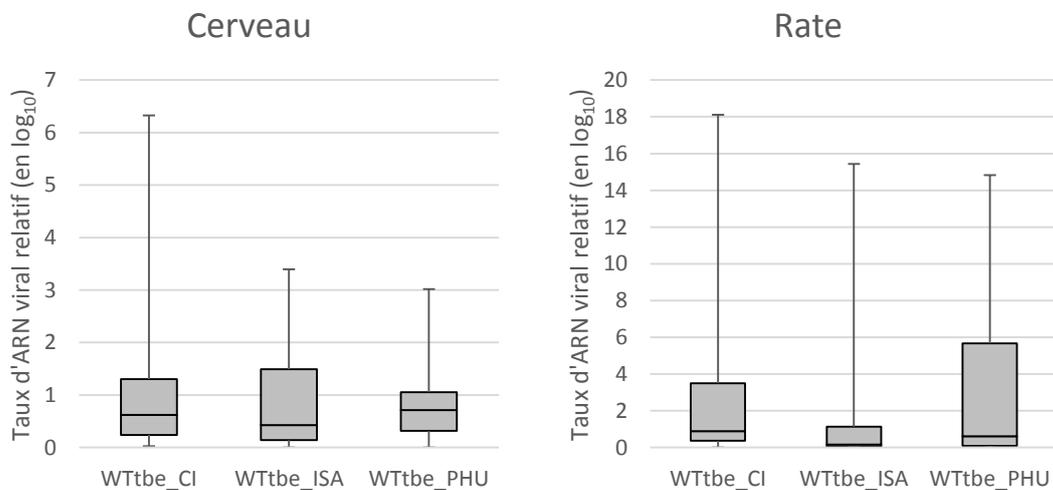
Afin d'évaluer l'impact de l'utilisation de polymérase de haute-fidélité lors de la méthode ISA sur la pathogénicité *in vivo*, des souris femelles C57Bl/6J de trois semaines ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 100 µL contenant 2.10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> de virus WTtbe\_IC, WTtbe\_ISA ou WTtbe\_PHU. Les trois groupes de rongeurs ont été suivis quotidiennement afin d'établir des courbes de survie. Les quantités d'ARN viral présentes dans le cerveau et la rate ont été déterminées par RT-qPCR.

Le suivi de la mortalité des animaux n'a pas démontré de différence significative entre les virus WTtbe\_PHU et ceux générés à partir du CI ou par la méthode ISA: 1 seule souris a survécu pour les virus WTtbe\_PHU (100% de mortalité pour les autres) et les courbes de survie étaient semblables (test de Kaplan-Meier, p = 0.80 pour WTtbe\_CI et p = 0,40 pour WTtbe\_ISA ; **Figure 26**).



**Figure 26 :** Courbe de survie des animaux infectés par les virus WTtbe

Que ce soit dans le cerveau ou dans la rate, les quantités d'ARN retrouvées étaient similaires entre les trois groupes de souris et aucune différence significative n'a été observée (test de Student ; **Figure 27**).



**Figure 27 :** Taux d'ARN viral relatif des virus WTtbe dans les organes de souris

Le taux d'ARN viral est pondéré par le taux d'actine présent dans chaque échantillon. La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus chez toutes les souris.

### *1.3.Discussion*

L'utilisation de la méthode ISA entraîne la production de populations virales d'une grande variabilité génétique. Cette hétérogénéité est fort probablement la conséquence de l'utilisation de polymérase lors de l'étape de PCR. Les polymérases sont connues pour commettre des erreurs de mésappariements qui peuvent être à l'origine de cette variabilité [87]. Les progrès en biologie moléculaire ont permis à la communauté scientifique de disposer de polymérases de plus en plus fidèles (généralisant beaucoup moins d'erreurs). Nous avons donc, dans cette partie de nos expériences, remplacé la polymérase initialement utilisée par des polymérases de haute-fidélité.

Comme prévu, les virus WTtbe\_PFU et WTtbe\_PHU ont présenté en moyenne moins de mutations que les virus générés par la méthode ISA. Cependant, les populations virales obtenues n'ont pas pu être qualifiées de clonale puisque qu'elles contenaient en moyenne plus de mutations que celles des virus WTtbe\_CI (34, 21,67, 17,33 et 2,33 mutations en moyenne respectivement WTtbe\_ISA, WTtbe\_PFU, WTtbe\_PHU et WTtbe\_CI). En outre, les mutations des virus produits grâce à la méthode ISA, quel que soit la polymérase utilisée, étaient également réparties aléatoirement sur l'ensemble du génome. Ces deux observations ont donc confirmé la conclusion apportée à l'expérience initiale, à savoir que la variabilité génétique des virus générés par la méthode ISA est la conséquence de l'utilisation de polymérase lors de l'amplification par PCR des fragments d'ADN chevauchants.

Cependant, bien que les polymérases de haute-fidélité utilisées ici aient permis de conduire à des populations plus homogènes par la méthode ISA, les caractéristiques des mutations observées étaient bien différentes. En effet, là où les virus WTtbe\_CI et WTtbe\_ISA présentaient une grande majorité de transition, les virus WTtbe\_PFU et WTtbe\_PHU avaient un nombre moyen de transition et de transversion similaire. De plus les virus, WTtbe\_ISA possédaient une majorité de mutations synonymes contrairement au virus WTtbe\_PFU et WTtbe\_PHU qui présentaient une majorité de mutations non-synonymes. Ces caractéristiques semblent donc être directement liées au type de polymérase utilisée, chaque polymérase ayant ces propres propriétés spécifiques. Ces résultats confirment une fois de plus le lien étroit entre la variabilité génétique des populations virales générées par la méthode ISA et l'étape d'amplification par PCR de la méthode.

Par les expériences que nous avons mises en place, les virus de l'encéphalite à tiques, qu'ils aient été générés par la transfection d'un CI ou par la méthode ISA avec les trois polymérases, n'ont pas présenté de différence de fitness répliatif.

Après transfection et passage, des quantités similaires de virus ont été produites. Aucune différence des taux d'ARN viral obtenus par RT-qPCR n'est observée entre les 4 types de populations virales. Les résultats de TCID<sub>50</sub> ont également prouvé que ces virus étaient à des titres infectieux comparables *in cellulo*.

De plus, même si une seule souris a survécu (WTtbe\_PHU), les courbes de survie des animaux ne permettaient pas de conclure à une différence entre les populations virales. Les quantités d'ARN viral détectées au sein des cerveaux et des rates de souris n'étaient pas différentes entre les trois groupes. L'utilisation de polymérases de haute-fidélité lors de l'étape de PCR de la méthode ISA, n'a pas eu d'influence sur la pathogénicité *in vivo* des virus produits.

Par l'utilisation de polymérases de fidélité plus élevée que celle précédemment utilisée, nous avons donc bien réussi à réduire la variabilité génétique des virus générés par la méthode ISA, sans toutefois rendre cette population clonale. Nous avons également confirmé le lien entre les propriétés de la polymérase utilisée lors de l'étape d'amplification par PCR de la méthode ISA et le nombre et les caractéristiques des mutations des virus générés. Les propriétés phénotypiques des virus, étudiées *in cellulo* et *in vivo*, ne sont nullement affectées par l'utilisation de la méthode ISA, et de polymérases différentes, en lieu et place de la transfection d'un CI.

## **2. « Clonal-ISA »**

### *2.1. Matériels et méthodes spécifiques*

Préparation des fragments pour la méthode « clonal-ISA »

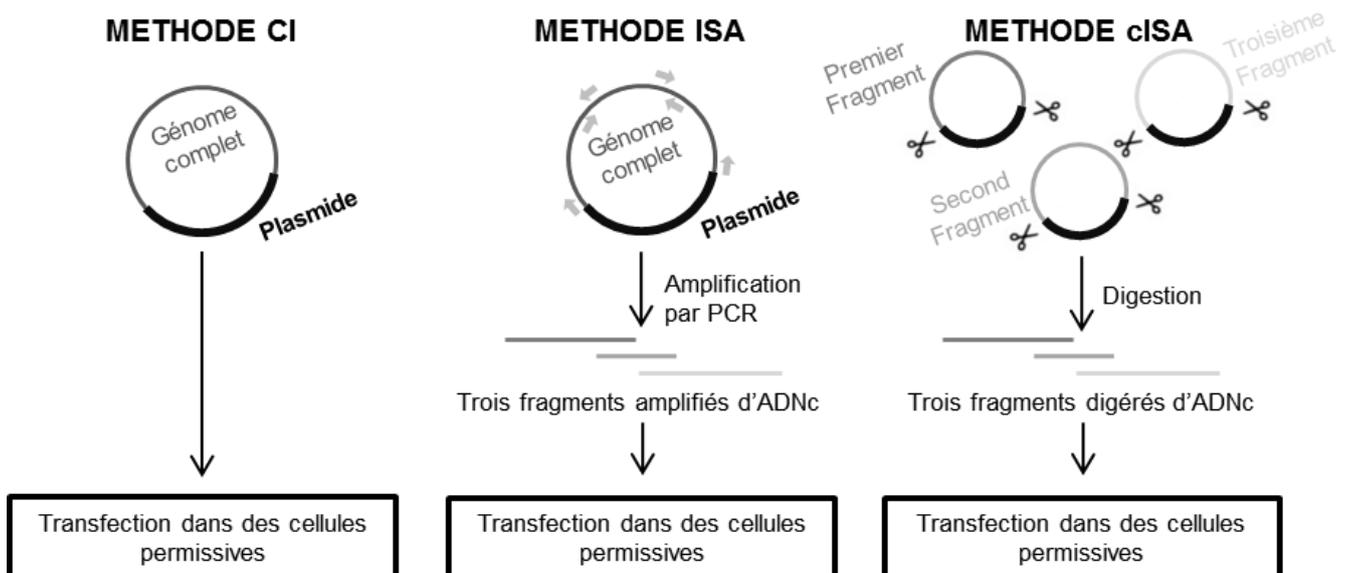
Chaque fragments d'ADN utilisés pour générer le virus modifié du Chikungunya, \*WTchik, (les mêmes que ceux utilisés lors de la méthode ISA) ont été clonés séparément dans des plasmides bactériens (« StrataClone Vector Mix amp/kan; Agilent »). Des sites de restriction, NotI et AvrII, ont été ajoutés respectivement aux extrémités 5' et 3' de chaque

fragment d'ADN avant le clonage. L'intégrité de ces trois plasmides a été contrôlée en effectuant des cartes de restriction et leurs séquences ont été vérifiées par séquençage. Les fragments d'ADN pour la méthode « clonal-ISA » ont été générés en digérant ces plasmides avec les enzymes de restriction NotI et AvrII à 37 ° C pendant toute une nuit. Avant la transfection, les produits de digestion ont été contrôlés par électrophorèse sur gel et purifiés comme précédemment.

Description et mise en application de la méthode "clonal-ISA"

La différence majeure entre la méthode ISA et la méthode « clonal-ISA » est la nature des fragments d'ADN utilisés pour la transfection. En effet, pour assurer « la clonalité » de ces fragments, nous avons transfecté directement les plasmides digérés. La procédure de la méthode « clonal-ISA » comprend les étapes suivantes (**Figure 28**):

- Clonage des fragments chevauchants d'ADN dans un plasmide, flanqués de part et d'autre d'un site de restriction.
- Digestion de chaque fragment chevauchant d'ADN cloné dans un plasmide par des enzymes de restriction.
- Préparation d'un mélange équimolaire des fragments chevauchants d'ADN digérés (identique à la procédure ISA).
- Transfection de cellules permissives (identique à la procédure ISA).



**Figure 28** : Schéma général comparatif des méthodes "Clone Infectieux, CI", "Infectious Subgenomic Amplicons, ISA" et "clonal-ISA, cISA"

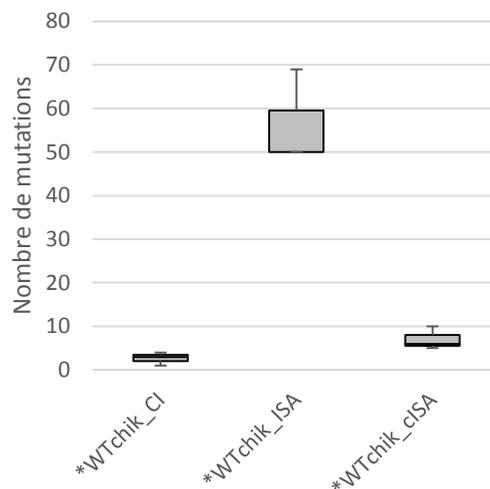
## 2.2.Résultats

Lors de l'application de la méthode « clonal-ISA », dans tous les cas (deux expériences indépendantes de 3 transfections séparées), des virus infectieux ont été détectés. Ils ont été nommés \*WTchik\_cISA. Les quantités d'ARN viral, de titres infectieux et les résultats du séquençage des virus sont présentés ci-dessous.

Impact sur la diversité génétique des populations virales

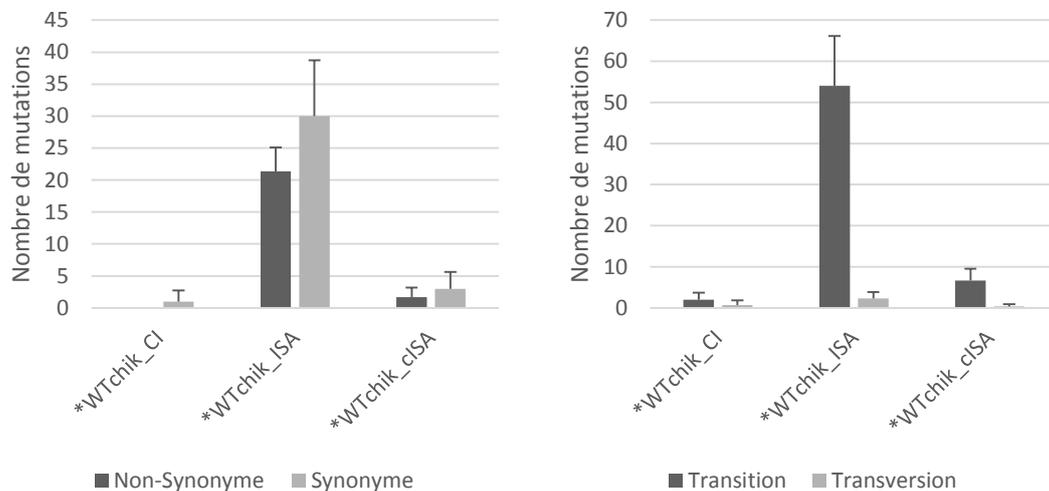
Afin d'estimer l'incidence de la méthode « clonal-ISA » sur la diversité génétique des populations virales, les génomes des virus \*WTchik\_cISA ont été séquencés et comparés aux séquences génomiques des virus \*WTchik\_CI et \*WTchik\_ISA.

Comme suspecté, les virus générés en utilisant la méthode « clonal-ISA » ont présenté un nombre moyen de mutations significativement moins élevé que les virus produits en utilisant la méthode ISA (7 contre 57,33, test de Student:  $p = 0,0016$  ; **Figure 29**). Bien que les virus \*WTchik\_cISA présentaient un nombre moyen de mutations plus élevé que les virus produits à l'aide d'un CI, cette différence n'était pas significative (7 contre 2,67; test de Student:  $p = 0,07$ ; **Figure 29**).



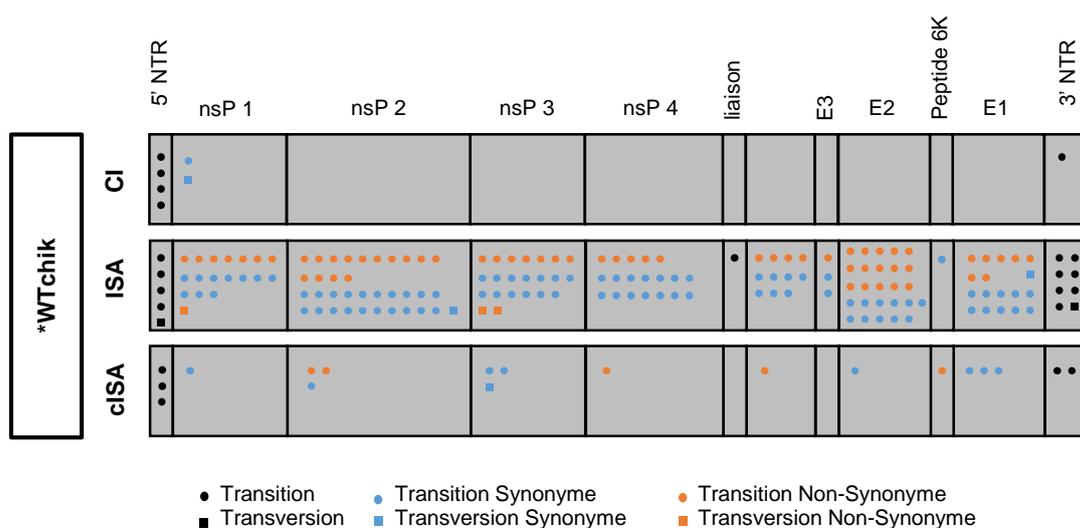
**Figure 29** : Nombre de mutations pour les virus \*WTchik  
La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus produits en trois exemplaires

Indépendamment de la méthode de génétique inverse utilisée pour générer les virus, les caractéristiques des mutations (c'est-à-dire mutations synonymes/non-synonymes et transition/transversion) étaient similaires entre les virus (**Figure 30**).



**Figure 30 :** Nombre et caractéristiques des mutations pour les virus \*WTchik  
La barre d'erreur représente l'écart-type pour chaque virus produits en trois exemplaires.

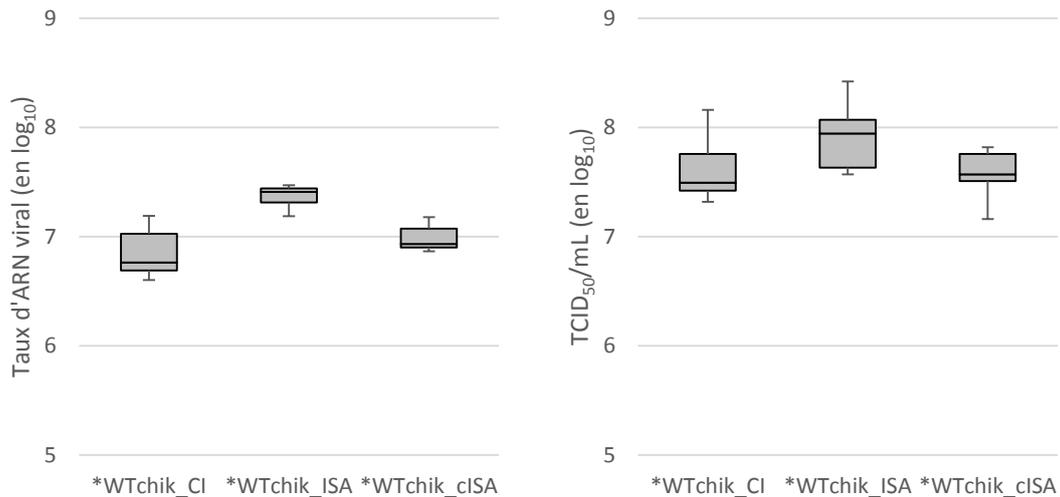
Les mutations détectées sur les virus \*WTchik\_cISA étaient réparties sur l'ensemble du génome. Ces virus présentaient néanmoins une forte proportion de mutations situées dans l'extrémité 5'NTR (5,3%; 3/19 ; **Figure 31**) alors que cette région ne représente que 0,6% du génome.



**Figure 31 :** Sites et caractéristiques des mutations des virus \*WTchik sur le génome du virus du Chikungunya

## Impact sur le fitness répliatif

Les quantités d'ARN viral et les titres infectieux des surnageants de culture ont été déterminés respectivement par RT-qPCR et par titrage par TCID<sub>50</sub>. Quelle que soit la méthode de génétique inverse utilisée, des valeurs identiques ont été retrouvées et aucune différence significative n'a été observée (test de Student et de Wilcoxon ; **Figure 32**).



**Figure 32** : Taux d'ARN viral et titres infectieux pour les virus \*WTchik

La valeur centrale représente la médiane, les bords du rectangle sont les quartiles (premier et troisième) et les extrémités sont les valeurs maximum et minimum pour chaque virus produits en trois exemplaires.

### 2.3. Discussion

Ce travail présente pour la toute première fois le développement, la mise en application et la réussite de la méthode « clonal-ISA », puisque cette nouvelle procédure a permis de générer des virus infectieux. Cette méthode a été développée afin de bénéficier de tous les avantages de la méthode ISA tout en permettant d'obtenir des populations de virus génétiquement homogène.

Sans toutefois permettre d'obtenir un nombre moyen de mutations présents chez les virus produits à partir de la méthode « clonal-ISA » équivalent à celui retrouvé chez les virus issus de la transfection d'un clone infectieux, cette nouvelle méthode a permis de réduire la variabilité des virus obtenus d'une manière importante. Puisqu'aucune différence significative, en terme de nombre moyen de mutations et de caractéristiques de ces mutations, n'a été mise en évidence entre les virus \*WTchik\_CI et \*WTchik\_cISA, il a donc été possible de qualifier les populations virales obtenues par cette nouvelle méthode comme clonales.

Néanmoins, il reste difficile d'expliquer la provenance des mutations supplémentaires observées chez les virus produits grâce à la méthode « clonal-ISA » (7 et 2,67 mutations en moyenne respectivement pour \*WTchik\_cISA et \*WTchik\_CI). En parallèle, la répartition sur le génome de ces mutations semble être intermédiaire entre celle observée chez les virus issus de la transfection d'un CI et celle constatée chez les virus produits par la méthode ISA. Ces deux observations nous conduisent à nuancer nos propos et à rapprocher les populations virales produites grâce à la méthode « clonal-ISA » des caractéristiques de celles générées par la méthode ISA.

Une fois de plus, sur le plan phénotypique, aucune différence de fitness répliatif n'a été mise en évidence entre les trois types de populations virales. Les méthodes ISA et « clonal-ISA » représentent donc d'excellentes alternatives à la transfection d'un CI, pour l'étude des virus à ARN.

Tout comme la méthode ISA, cette nouvelle méthode permet de produire des virus infectieux en quelques jours et de contrôler les séquences génomiques des virus générés de manière encore plus précise. Néanmoins, l'ensemble des observations précédentes nous a permis de conclure que cette nouvelle méthode, permettant d'obtenir des populations virales, phénotypiquement similaire et génétiquement proches de celles obtenues par la transfection d'un CI, gardait certaines caractéristiques de la méthode ISA et restait par conséquent perfectible. Cette nouvelle méthode fort intéressante mérite d'être améliorée dans l'avenir et utilisée en virologie.

## *Conclusion Générale*

Les systèmes de génétique inverses sont utilisés depuis de nombreuses années comme outils permettant de manipuler les génomes viraux. Ces systèmes sont indispensables pour approfondir nos connaissances en virologie, notamment pour les virus à ARN. Ils permettent d'étudier de nombreuses caractéristiques virales comme la pathogénèse, les interactions virus/hôte ou encore le rôle de certaines protéines. Ces systèmes jouent également un rôle non négligeable dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (notamment de vaccins) et dans la mise en évidence de phénomènes de résistance.

Il existe de nombreux systèmes de génétique inverse pour les virus à ARN. Le plus communément utilisé est le clone infectieux. Il s'agit d'un ADN complémentaire d'un ARN viral incorporé au sein d'un vecteur circulaire cloné à l'intérieur d'un hôte. Cet outil présente de nombreux avantages mais aussi certains inconvénients. Pour certains virus il a été très difficile, voire impossible, de développer un clone infectieux. C'est pour cette raison que de nouvelles stratégies ont été développées, parmi lesquelles on retrouve la méthode ISA (Infectious Subgenomic Amplicons).

La méthode ISA est rapide et versatile. Elle permet la production de virus par la transfection de 3 fragments d'ADN distincts et chevauchants, amplifiés par PCR. Néanmoins, les populations virales obtenues n'ont jamais été étudiées génotypiquement et phénotypiquement et comparées à celles générées par la transfection d'un clone infectieux.

Dans ce travail, nous avons montré que les virus générés par la méthode ISA ne possèdent pas de phénotype différent de celui des virus issus de la transfection d'un clone infectieux. Cependant, de grandes différences génotypiques subsistent. Les virus produits par la méthode ISA présentent une grande variabilité génétique. Nous avons également montré que cette hétérogénéité est largement induite par l'utilisation de polymérases lors de l'étape de PCR. Ces résultats ont conforté notre hypothèse initiale et nous permettent de considérer la méthode ISA comme une alternative importante à l'utilisation d'un clone infectieux.

Cette méthode est maintenant largement utilisée au sein de notre laboratoire et dans d'autres laboratoires de par le monde. Toutefois, son mécanisme exact reste encore inconnu. Ainsi à titre d'exemple, le mécanisme de recombinaison des trois fragments d'ADN reste encore très mal compris et nous espérons apporter des réponses à cette problématique dans un proche avenir (expériences actuellement en cours).

Bien que l'utilisation de populations hétérogènes génétiquement soit intéressante dans certains types d'expériences, le développement d'une méthode possédant la versatilité de la méthode ISA et conduisant à une population clonale semblable à celle issue de la transfection d'un clone infectieux est nécessaire.

Dans un second temps, nous avons donc tenté de réduire l'hétérogénéité induite par la méthode ISA tout d'abord par l'utilisation de polymérases de plus grande fidélité puis en développant une nouvelle méthode dénommée « clonal-ISA ». Dans les deux cas, les populations obtenues ne sont différentes ni phénotypiquement, ni génotypiquement de celles issues de la transfection d'un clone infectieux (avec une ressemblance plus forte pour la méthode « clonal-ISA »). Cette toute nouvelle méthode, qui a conduit à la synthèse de virus infectieux pour la première fois, représente donc une méthode de substitution idéale à l'utilisation d'un clone infectieux. De plus, la méthode « clonal-ISA » reste encore perfectible et à utiliser lors d'applications concrètes telles que celles relatives à l'expérimentation animale ou encore celles visant le développement de candidats vaccins.

## *Bibliographie*

1. Aubry, F., et al., *Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective*. Antiviral Res, 2015. **114**: p. 67-85.
2. Neumann, G. and Y. Kawaoka, *Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **283**: p. 43-60.
3. Kariuki Njenga, M., et al., *Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 11): p. 2754-60.
4. Powers, A.M. and C.H. Logue, *Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 9): p. 2363-77.
5. Leparc-Goffart, I., et al., *Chikungunya in the Americas*. Lancet, 2014. **383**(9916): p. 514.
6. Robinson, M.C., *An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1955. **49**(1): p. 28-32.
7. Enserink, M., *Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus*. Science, 2006. **311**(5764): p. 1085.
8. Naresh Kumar, C.V. and D.V. Sai Gopal, *Reemergence of Chikungunya virus in Indian Subcontinent*. Indian J Virol, 2010. **21**(1): p. 8-17.
9. Laras, K., et al., *Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2005. **99**(2): p. 128-41.
10. Angelini, R., et al., *An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy*. Euro Surveill, 2007. **12**(9): p. E070906 1.
11. Powers, A.M., et al., *Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 2): p. 471-9.
12. Khan, A.H., et al., *Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 12): p. 3075-84.
13. Jose, J., J.E. Snyder, and R.J. Kuhn, *A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly*. Future Microbiol, 2009. **4**(7): p. 837-56.
14. Kumar, S., et al., *Development of novel antibodies against non-structural proteins nsP1, nsP3 and nsP4 of chikungunya virus: potential use in basic research*. Arch Virol, 2015. **160**(11): p. 2749-61.
15. Schwartz, O. and M.L. Albert, *Biology and pathogenesis of chikungunya virus*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(7): p. 491-500.
16. Thiboutot, M.M., et al., *Chikungunya: a potentially emerging epidemic?* PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(4): p. e623.
17. Fourie, E.D. and J.G. Morrison, *Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever*. S Afr Med J, 1979. **56**(4): p. 130-2.
18. Thiberville, S.D., et al., *Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy*. Antiviral Res, 2013. **99**(3): p. 345-70.
19. Kaur, P. and J.J. Chu, *Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges*. Drug Discov Today, 2013. **18**(19-20): p. 969-83.
20. Parashar, D. and S. Cherian, *Antiviral perspectives for chikungunya virus*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 631642.
21. Weaver, S.C., et al., *Chikungunya virus and prospects for a vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2012. **11**(9): p. 1087-101.
22. Brandler, S., et al., *A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus*. Vaccine, 2013. **31**(36): p. 3718-25.

23. Wang, E., et al., *Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya*. *Vaccine*, 2008. **26**(39): p. 5030-9.
24. Schneider, H., *Über epidemische akute Meningitis serosa*. *Wr. Klin. Wochenschrift*, 1931. **44**: p. 350-352.
25. Chumakov, M.P. and N.A. Seitlenok, *Tick-Borne Human Encephalitis in the European Part of Ussr and Siberia*. *Science*, 1940. **92**(2386): p. 263-4.
26. Zilber, L.A., *Spring-summer tick-borne encephalitis*. *Arkhiv Biol Nauk*, 1939. **56**: p. 255-261.
27. Pogodina, V.V., et al., [*Comparative analysis of virulence of the Siberian and Far-East subtypes of the tick-born encephalitis virus*]. *Vopr Virusol*, 2004. **49**(6): p. 24-30.
28. Vaptsarov, I., et al., [*Recurrent viral meningoencephalitis in southern Bulgaria*]. *Suivr Med (Sofiiia)*, 1954. **5**(2): p. 86-103.
29. Kaariainen, L.E., E. Hirvonen, and N. Oker-blom, *Geographical distribution of biphasis tick-borne encephalitis in Finland*. *Ann Med Exp Fenn*, 1961. **39**: p. 316-328.
30. Ando, K., et al., *Studies on the viruses isolated during epidemic of Japanese B encephalitis in 1948 in Tokyo area*. *Kitasato Arch Exp Med*, 1952. **24**(3-4): p. 557-62; English transl 429-41.
31. Calisher, C.H. and E.A. Gould, *Taxonomy of the virus family Flaviviridae*. *Adv Virus Res*, 2003. **59**: p. 1-19.
32. Gritsun, T.S., P.A. Nuttall, and E.A. Gould, *Tick-borne flaviviruses*. *Adv Virus Res*, 2003. **61**: p. 317-71.
33. Gritsun, T.S., V.A. Lashkevich, and E.A. Gould, *Tick-borne encephalitis*. *Antiviral Res*, 2003. **57**(1-2): p. 129-46.
34. Charrel, R.N., et al., *Tick-borne virus diseases of human interest in Europe*. *Clin Microbiol Infect*, 2004. **10**(12): p. 1040-55.
35. Heinz, F.X. and K. Stiasny, *Flaviviruses and flavivirus vaccines*. *Vaccine*, 2012. **30**(29): p. 4301-6.
36. Lindenbach, B.D., C.L. Murray, H.-J. Thiel, C.M. Rice, *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. *Fields Virology*, 2013. **6**.
37. Nuttall, P.A. and M. Labuda, *Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface*. *Adv Virus Res*, 2003. **60**: p. 233-72.
38. Van Tongeren, H.A., *Encephalitis in Austria. IV. Excretion of virus by milk of the experimentally infected goat*. *Arch Gesamte Virusforsch*, 1955. **6**(2-3): p. 158-62.
39. O.N., *The further development of measures to improve prophylactics of tick-borne encephalitis*. The Ministry of Healthcare of URSS: Moscow, 1990.
40. Shapoval, A.N., [*Chronic forms of tick-borne encephalitis*]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 1974. **74**(2): p. 205-9.
41. Duniewicz, M. and H. Kulkova, [*Corticoids in the therapy of thick- and other type of viral meningoencephalitis*]. *MMW Munch Med Wochenschr*, 1982. **124**(3): p. 69-70.
42. Vereta, L.A., et al., [*The relationship of the therapeutic efficacy of immunoglobulin against tick-borne encephalitis to the specific activity of the preparation and the times of its administration*]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 1994. **94**(2): p. 68-70.
43. Achazi, K., et al., *RNA interference inhibits replication of tick-borne encephalitis virus in vitro*. *Antiviral Res*, 2012. **93**(1): p. 94-100.
44. Kaiser, R., *Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults*. *Wien Med Wochenschr*, 2012. **162**(11-12): p. 239-43.
45. Unger, B. and P.N. Barrett, *Tick-borne encephalitis vaccines*. *Intern Med J*, 2013. **43**(7): p. 838-9.
46. Lehrer, A.T. and M.R. Holbrook, *Tick-borne Encephalitis Vaccines*. *J Bioterror Biodef*, 2011. **2011**(Suppl 1): p. 3.

47. Baltimore, D., *Viral genetic systems*. Trans N Y Acad Sci, 1971. **33**(3): p. 327-32.
48. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
49. Gritsun, T.S. and E.A. Gould, *Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR*. Virology, 1995. **214**(2): p. 611-8.
50. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
51. Smith, L.M., et al., *The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(7): p. 2399-412.
52. Bilofsky, H.S., et al., *The GenBank genetic sequence databank*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(1): p. 1-4.
53. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
54. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei, *MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers*. Comput Appl Biosci, 1994. **10**(2): p. 189-91.
55. Racaniello, V.R. and D. Baltimore, *Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells*. Science, 1981. **214**(4523): p. 916-9.
56. Ruggli, N. and C.M. Rice, *Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications*. Adv Virus Res, 1999. **53**: p. 183-207.
57. Perrotta, A.T. and M.D. Been, *A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA*. Nature, 1991. **350**(6317): p. 434-6.
58. Rice, C.M., et al., *Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation*. New Biol, 1989. **1**(3): p. 285-96.
59. Casali, N., *Escherichia coli host strains*. Methods Mol Biol, 2003. **235**: p. 27-48.
60. Polo, S., et al., *Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5366-74.
61. Gritsun, T.S. and E.A. Gould, *Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy*. J Virol Methods, 1998. **76**(1-2): p. 109-20.
62. Monaco, A.P. and Z. Larin, *YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools*. Trends Biotechnol, 1994. **12**(7): p. 280-6.
63. Hohn, B. and J. Collins, *A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments*. Gene, 1980. **11**(3-4): p. 291-8.
64. Khromykh, A.A., et al., *Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus*. J Virol, 2001. **75**(10): p. 4633-40.
65. Antonucci, T.K., P. Wen, and W.J. Rutter, *Eukaryotic promoters drive gene expression in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 17656-9.
66. Johansen, I.E., *Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in Escherichia coli while biological activity is reestablished after transcription in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12400-5.
67. Jonsson, J.J., A. Converse, and R.S. McIvor, *An enhancer in the first intron of the human purine nucleoside phosphorylase-encoding gene*. Gene, 1994. **140**(2): p. 187-93.
68. Edmonds, J., et al., *A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate recapitulation of viral heterogeneity*. J Virol, 2013. **87**(4): p. 2367-72.
69. Siridechadilok, B., et al., *A simplified positive-sense-RNA virus construction approach that enhances analysis throughput*. J Virol, 2013. **87**(23): p. 12667-74.

70. Aubry, F., et al., *Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 11): p. 2462-7.
71. Holmes, E.C. and A. Moya, *Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses?* J Virol, 2002. **76**(1): p. 460-5.
72. Ciota, A.T., et al., *Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 3): p. 865-74.
73. Mandl, C.W., et al., *Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9601-9.
74. Duan, X., et al., *Novel binding between pre-membrane protein and vacuolar ATPase is required for efficient dengue virus secretion*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **373**(2): p. 319-24.
75. Tumban, E., et al., *Replacement of the 3' untranslated variable region of mosquito-borne dengue virus with that of tick-borne Langkat virus does not alter vector specificity*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 4): p. 841-8.
76. Charlier, N., et al., *Replication of not-known-vector flaviviruses in mosquito cells is restricted by intracellular host factors rather than by the viral envelope proteins*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 7): p. 1693-7.
77. Liu, W.J., H.B. Chen, and A.A. Khromykh, *Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7804-13.
78. Crabtree, M.B., R.M. Kinney, and B.R. Miller, *Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses*. Arch Virol, 2005. **150**(4): p. 771-86.
79. Men, R., et al., *Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 3930-7.
80. Bray, M. and C.J. Lai, *Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10342-6.
81. Monath, T.P., et al., *Recombinant, chimaeric live, attenuated vaccine (ChimeriVax) incorporating the envelope genes of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and the capsid and nonstructural genes of yellow fever (17D) virus is safe, immunogenic and protective in non-human primates*. Vaccine, 1999. **17**(15-16): p. 1869-82.
82. Qing, M., et al., *Characterization of dengue virus resistance to brequinar in cell culture*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(9): p. 3686-95.
83. Yang, C.C., et al., *A novel dengue virus inhibitor, BP13944, discovered by high-throughput screening with dengue virus replicon cells selects for resistance in the viral NS2B/NS3 protease*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(1): p. 110-9.
84. Chambers, T.J., et al., *Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3095-101.
85. Davis, W.G., et al., *Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 10172-87.
86. Lin, H.H., et al., *Dengue type four viruses with E-Glu345Lys adaptive mutation from MRC-5 cells induce low viremia but elicit potent neutralizing antibodies in rhesus monkeys*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100130.

87. Bacher, J.M., B.D. Reiss, and A.D. Ellington, *Anticipatory evolution and DNA shuffling*. *Genome Biol*, 2002. **3**(8): p. REVIEWS1021.
88. Domingo, E., et al., *Population dynamics of RNA viruses: the essential contribution of mutant spectra*. *Arch Virol Suppl*, 2005(19): p. 59-71.
89. Nougairede, A., et al., *Random codon re-encoding induces stable reduction of replicative fitness of Chikungunya virus in primate and mosquito cells*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(2): p. e1003172.
90. Takashima, I., et al., *A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus*. *J Clin Microbiol*, 1997. **35**(8): p. 1943-7.
91. LaBarre, D.D. and R.J. Lowy, *Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays*. *J Virol Methods*, 2001. **96**(2): p. 107-26.
92. Reed, L.J.a.M.H., *A simple method of estimating fifty per cent endpoint*. *American Journal of Epidemiology*, 1938. **27** (3): p. 493-497.
93. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 348-52.
94. Team, R.C., *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2013.