



**HAL**  
open science

**Etude des interactions Virus – Hôte(s) pour la  
compréhension des différences de pathogénèse, virulence  
et spectre d’hôtes de flavivirus émergents et à potentiel  
d’émergence : de l’appliqué au fondamental**

Gaëlle Gonzalez

► **To cite this version:**

Gaëlle Gonzalez. Etude des interactions Virus – Hôte(s) pour la compréhension des différences de pathogénèse, virulence et spectre d’hôtes de flavivirus émergents et à potentiel d’émergence : de l’appliqué au fondamental. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. tel-04351397

**HAL Id: tel-04351397**

**<https://anses.hal.science/tel-04351397>**

Submitted on 18 Dec 2023

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

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

## HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

*Etude des interactions Virus – Hôte(s) pour la compréhension des différences de pathogénèse, virulence et spectre d'hôtes de flavivirus émergents et à potentiel d'émergence : de l'appliqué au fondamental*

Dr Gaëlle GONZALEZ

Soutenue le 17 novembre 2023 devant le jury composé de:

- Dr Fabienne Archer, rapporteur
- Dr Nolwenn Jouvenet, rapporteur
- Pr Rémi Charrel, rapporteur
- Pr Yannick Simonin, examinateur
- Dr Stéphane Pronost, examinateur
- Dr Nolwenn M. Dheilly, examinateur
- Dr Sara Moutailler, examinateur
- Dr Stephan Zientara, examinateur

UMR Virologie ANSES-INRAE-ENVA  
14 rue Pierre et Marie Curie  
94700 Maisons-Alfort



## TABLES DES MATIERES

<b>1. Curriculum Vitae .....</b>	<b>5</b>
1.1 <i>Cursus universitaire .....</i>	5
1.2 <i>Expériences Professionnelles / Activités de recherche .....</i>	5
1.3 <i>Activités d'encadrement .....</i>	7
1.4 <i>Activités de référence .....</i>	9
1.5 <i>Activités d'expertise scientifique.....</i>	11
1.6 <i>Formations.....</i>	12
1.7 <i>Valorisation.....</i>	12
1.8 <i>Mes Modèles d'études.....</i>	17
<b>2. Travaux de thèse et post-doctorat .....</b>	<b>18</b>
2.1 <i>Thèse de doctorat en virologie et thérapie génique (2009-2011).....</i>	18
2.1.1 <i>Contexte .....</i>	18
2.1.1.1 <i>Les vecteurs viraux en thérapie génique de la mucoviscidose .....</i>	18
2.1.1.1.1 <i>Vecteurs rétroviraux .....</i>	19
2.1.1.1.2 <i>AAV.....</i>	19
2.1.1.1.3 <i>Adénovirus et vecteurs adénoviraux.....</i>	19
2.1.2 <i>Caractérisation et développement de nouveaux vecteurs adénoviraux .....</i>	20
2.1.3 <i>Développement et évaluation de l'efficacité de vecteurs de CFTR.....</i>	22
2.1.3.1 <i>Le vecteur Ad5F35 comme vecteur prometteur en thérapie génique de la mucoviscidose..</i>	22
2.1.3.2 <i>Trogocytose de microvésicules membranaires comme stratégie alternative aux vecteurs viraux</i>	23
2.1.4 <i>Identification de molécules antivirales contre le VIH.....</i>	23
2.1.5 <i>Développement d'un vecteur vaccinal contre les flavivirus.....</i>	23
2.1.6 <i>Conclusion .....</i>	24
2.2 <i>Expérience postdoctorale .....</i>	25
2.2.1 <i>Post-doctorat sur l'émergence et l'adaptation virale (2012-2016).....</i>	25
2.2.1.1 <i>Contexte .....</i>	25
2.2.1.2 <i>Caractérisation de l'adaptation des virus EIVs sur explants de trachée.....</i>	26
2.2.1.3 <i>Analyse transcriptomique de la réponse de l'hôte équin à l'infection par différents EIVs ....</i>	27
2.2.1.4 <i>Evaluation du risque zoonotique par génétique inverse.....</i>	29
2.2.1.5 <i>Epidémiologie de la grippe aviaire chez les équidés .....</i>	29
2.2.1.6 <i>Conclusion .....</i>	30
2.2.2 <i>Post-doctorat sur le screening de molécules antivirales (2016-2018) .....</i>	30
2.2.2.1 <i>Contexte .....</i>	30
2.2.2.2 <i>Développer une nouvelle approche haut-débit pour identifier des molécules antivirales efficaces à large spectre.....</i>	31
2.2.2.3 <i>Identification de molécules antivirales d'intérêt.....</i>	32
2.2.2.4 <i>Conclusion .....</i>	33
<b>3. Vers l'indépendance scientifique et technique .....</b>	<b>34</b>
3.1 <i>Equipe Zoonoses Equines et neurovirologie, groupe WN .....</i>	34
3.1.1 <i>Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LR-UE) pour les Maladies équines.....</i>	34

3.1.2	Laboratoire National de référence (LNR) encéphalites virales des équidés : encéphalite West Nile.....	35
3.1.2.1	Missions du LNR .....	35
3.1.2.2	Surveillance des flavivirus émergents en France : WNV – USUV - TBEV .....	35
3.1.2.2.1	Contexte .....	35
3.1.2.2.2	Ma contribution aux activités de surveillance de WNV en France depuis 2018 .....	36
3.1.2.2.3	Ma contribution aux activités de surveillance d’USUV depuis 2018 .....	37
A.	Surveillance d’USUV dans l’avifaune sauvage .....	37
B.	Surveillance d’USUV dans l’avifaune captive.....	37
3.1.2.2.4	Ma contribution aux activités de surveillance de TBEV en France.....	38
3.2	<i>Activités de recherche</i> .....	39
3.2.1	Déterminants moléculaires de la virulence du virus West Nile .....	39
3.2.1.1	Contexte .....	39
3.2.2	TBEV : risque de contamination par la voie alimentaire .....	44
3.2.2.1	Contexte .....	44
3.2.2.2	Systèmes d’études proposés et résultats préliminaires.....	44
3.2.2.2.1	Identification des produits laitiers à risque.....	44
3.2.2.2.2	Persistance de TBEV dans le lait.....	44
3.2.2.2.3	Fabrication de fromages contaminés et persistance de TBEV dans les fromages .....	45
3.2.2.3	Conclusion - Perspectives .....	45
<b>4.</b>	<b>Projets de recherche et perspectives pour le futur .....</b>	<b>46</b>
4.1	<i>Contexte</i> .....	46
4.2	<i>Renforcement de la surveillance nationale des virus West Nile et Usutu</i> .....	46
4.2.1	Contexte .....	46
4.2.2	Surveillance active dans l’avifaune sauvage.....	48
4.2.3	Surveillance active dans l’avifaune captive .....	49
4.2.4	Méthodes de diagnostic pour le suivi épidémiologique renforcé.....	49
4.2.4.1	Développement de méthodes de prélèvement peu invasif .....	49
4.2.4.2	Optimisation des méthodes de diagnostic moléculaires.....	50
4.2.4.3	Optimisation des méthodes de diagnostic sérologique .....	51
4.2.5	Cartographie nationale de la distribution et de la prévalence de WNV, USUV et TBEV en France dans la faune sauvage mammifère.....	52
4.3	<i>Situation exceptionnelle de circulation de West Nile et Usutu en région Nouvelle Aquitaine</i> .....	53
4.3.1	Contexte .....	53
4.3.2	Développement d’un réseau « One Health » local en Gironde.....	53
4.4	<i>Compétence des espèces aviaires prévalentes en France à WNV et USUV</i> .....	55
4.4.1	Tester la sensibilité des hôtes aviaires par culture <i>ex vivo</i> de cellules primaires et sur organoïdes.....	55
4.4.2	Pathobiologie de WNV et USUV chez des hôtes aviaires sensibles .....	56
4.4.3	Pathobiologie comparée des virus WNV et USUV chez les hôtes aviaires, équins et humains .....	57
4.4.3.1	Contexte .....	57
4.4.3.2	Méthodologie .....	58
4.4.3.2.1	Interactomique.....	58
4.4.3.2.2	Interferactomique sur différentes espèces aviaires.....	59
4.4.3.2.3	Validation des interactions.....	60
C.	Validation biochimique.....	60
D.	Validation fonctionnelle .....	60
E.	Génétique inverse .....	60
4.4.3.3	Résultats préliminaires .....	60
4.4.3.4	Conclusion .....	61

4.5	<i>Le rôle des co-infections dans les processus d'émergence ou de ré-émergence</i> .....	62
4.5.1	Impact de la co-circulation de WNV et USUV sur la compétence des moustiques.....	62
4.5.2	Impact de la co-circulation de WNV et USUV sur la sensibilité et compétence des hôtes aviaires	63
<b>5.</b>	<b>Conclusion générale.....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>65</b>

## 1. Curriculum Vitae

### 1.1 Cours universitaire

2011 - **Doctorat en sciences de la vie** – Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne.

2008 - **Master 2 professionnel** R&D Biotechnologies / ESSEP 5, Université Paris VI – Université catholique de Lyon, Lyon.

2007 - **Master 1** « Génétique fonctionnelle & Oncologie », Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne.

2006 – **Licence 3<sup>ème</sup> année** « Oncologie et Génétique Fonctionnelle », Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne.

2004 – **Brevet de Technicien Supérieur** en Analyses Biologiques au lycée La Martinière Duchère (Lyon).  
Habilitation aux prélèvements sanguins humains : certificat d'aptitude professionnelle.

### 1.2 Expériences Professionnelles / Activités de recherche

**Depuis Avril 2022 – CHEFFE DE PROJETS EN VIROLOGIE**

**Juillet 2018 à Avril 2022 - CHARGÉE DE PROJETS EN VIROLOGIE. Equipe « Zoonoses équine et Neurovirologie » (responsables : Sylvie Lecollinet 2018-2020 ; Nolwenn Dheilly depuis 2021), Unité virologie INRAE, ANSES, ENVA, Laboratoire de santé animale, ANSES, Maisons-Alfort.**

**ADJOINTE AU DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE REFERENCE DE L'UNION EUROPEENNE (LR-UE) SUR LES MALADIES EQUINES (depuis 2022)**

**RESPONSABLE du LABORATOIRE NATIONAL DE REFERENCE (LNR) WEST NILE (depuis 2021) ET DE LA THEMATIQUE WNV – ENCEPHALITES EQUINES EXOTIQUES POUR LE LRUE MALADIES EQUINES.**

#### Projets de recherche depuis 2018

- *Evolution et épidémiologie des flavivirus zoonotiques TBEV, West Nile et Usutu en France métropolitaine.*
- *Caractérisation des mécanismes moléculaires sous-tendant les différences de tropisme, de virulence et de pathogénicité des "Culex-borne" flavivirus : modèle WNV-USUV.*
- *Renforcement de la surveillance épidémiologique des flavivirus émergents en France métropolitaine.*
- *Transmission non vectorisée du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) par voie alimentaire : évaluation de la stabilité et de la persistance du virus dans le lait cru et les produits laitiers au lait cru et de la dose infectieuse minimale requise pour une transmission alimentaire chez la souris.*

#### Activités de recherche

- Conception de projets de recherche, rédaction et soumission de demandes d'allocations de recherche, rédaction et dépôt de rapports d'étape et rapports finaux
- Gestion et animation de projets de recherche
- Communication scientifique : rédaction de publications scientifiques et chapitres de livre, présentations à des conférences nationales et internationales

#### Allocations de recherche

- 2023 – 2024 : Fond d'urgence ANRS- MIE « **Circulation exceptionnelle du virus West Nile et du virus Usutu en Nouvelle Aquitaine** ». Co-coordinatrice avec Denis Malvy (infectiologue, CHU Bordeaux) et Xavier de Lamballerie (CNR Arbovirus). Budget : 50 000€.

- 2023 – 2024 : Fond d'urgence LabEx IBEID « **Situation épidémiologique du virus West Nile et du virus Usutu en Nouvelle Aquitaine** ». Co-coordinatrice avec Denis Malvy (infectiologue, CHU Bordeaux) et Xavier de Lamballerie (CNR Arbovirus). Budget : 100 000€.
- 2023 – 2028: Projet européen HORIZON-CL6-2022 - Ecology of infectious animal diseases intitulé « **Ecology of Wildlife, Livestock, huMan and Infectious Diseases in changing environments (WiliMan-ID)** ». Participante, Coordinateur: Christine Citti (INRAE). Budget : 6M€.
- 2022-2024: **RESEDAPP: Réseau de Surveillance Entomologique et Détection précoce d'Arbovirus en appui aux Politiques Publiques**. Participante ; Coordinateur: Vincent Raquin. Budget : 30000 €
- 2022-2023 : Appel à projet de transversalité entre les équipes de recherche de l'ANSES (AMI), Co-coordinatrice avec Laure Bournez, **Epi&Persit : Vers une meilleure compréhension du risque de transmission de TBEV à l'Homme par voie alimentaire en France**. Budget : 35000€.
- 2021 : Appel à projet Jeunes Chercheurs INRAE, Coordinatrice, **Caractérisation des déterminants moléculaires gouvernant le tropisme, le spectre d'hôtes et la virulence des Flavivirus en France et en Europe par une approche d'interactomique**. Budget: 10000€.

#### Activités d'enseignement

- Master 2 de Virologie, Institut Pasteur de Paris, parcours "Virologie Moléculaire et Pathogénèse" (4h, depuis 2018)
- Master 2 "Insectes Vecteurs et transmission d'agents pathogènes", Institut Pasteur de Paris (3h, 2022)
- Cours magistral pour les étudiants vétérinaires de 4<sup>ème</sup> année de l'EnvA "Les Flavivirus" (2h, 2022).
- Master 2 "Predictive and Integrative Animal Biology", module "Epidemiology and Health", Université AgroParitech –Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (21h, 2020-2022)

- **2016 - 2018 - CHARGÉE DE PROJETS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES Equipe « Zoonoses équine et Neurovirologie » (responsable : Muriel Couplier), UMR virologie INRAE, ANSES, ENVA, Laboratoire de santé animale, ANSES, Maisons-Alfort.**

#### Projets de recherche

- *Modélisation des infections virales du système nerveux central en utilisant des cellules neurales humaines dans le but de réaliser un criblage à haut débit par imagerie automatisée de molécules à effet antiviral et/ou neuroprotecteur. Modèle d'étude : le virus de l'encéphalite à tiques TBEV.*

- **2012-2016 – STAGE POST-DOCTORAL: University of Glasgow – Medical Research Council - Centre for Virus Research (CVR), Glasgow (Royaume-Uni) (responsable : Pr Pablo Murcia)**

#### Projets de recherche

- *Caractérisation des déterminants moléculaires impliqués dans les sauts de barrière d'espèce du virus Influenza: modèle équin-canin.*

#### Activités de recherche

- Gestion et exécution de projets de recherche
- Communication scientifique : rédaction de publications scientifiques et chapitres de livre, présentations à des conférences nationales et internationales

#### Allocations de recherche

- Wellcome Trust (bénéficiaire, coordinateur : Dr Pablo Murcia)
- 2009 TRAVEL Grant by the American Society for Virology afin de faciliter la participation à la conférence

#### Activité d'enseignement

- Cours magistral pour les étudiants vétérinaires de 5<sup>ème</sup> année de l'école vétérinaire de Glasgow "Les virus Influenza" (2h, 2014)

- **2009-2011 - DOCTORAT, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne (responsable : Pr Pierre BOULANGER & du Dr Saw-See HONG).**

Sujet: Transfert du Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator par gènes dérivés des adénovirus ou par trogocytose de microparticules membranaires : mécanismes moléculaires et applications à la mucoviscidose.

### Activités de recherche

- Mise en œuvre de projets de recherche et conception de plans d'expériences.
- Communication scientifique : rédaction de publications scientifiques et chapitres de livre, présentations à des conférences nationales et internationales

### Allocations de recherche

- Association « Vaincre la Mucoviscidose (VLM) », bourse nominative, budget 50 000€
- Prix du meilleur poster VLM

### Activité d'enseignement

- Travaux dirigés et pratiques de biologie cellulaire (15h) au sein de l'Institut Universitaire Technologique (IUT A) de Lyon, Génie Biologique, spécialité Agronomie.

- **2008 – INGENIEUR D'ETUDES**, *Hôpital Edouard Herriot, Département d'Immuno-Rhumatologie (Pavillon P), Lyon.*  
(Responsable : Dr Assia ELJAAFARI)

## 1.3 Activités d'encadrement

- ✓ Encadrement de **quatre étudiants en BTS** Analyses biologiques et IUT A, biotechnologie (2009, 2011 et 2022, 3 mois)
  - Garance Hohl, 2022 (ANSES, Unité de Virologie) : « BTS Bioanalyses et contrôles » « *Mise au point d'une RT-qPCR détectant les virus West Nile et USUV -  $\beta$  actine en vue de diagnostiquer les infections aux flavivirus chez les oiseaux* ».
- ✓ Encadrement de deux **étudiants vétérinaires** inscrits au programme « International Summer school, veterinary Medicine Track » en juillet 2012 et juillet 2013.
- ✓ Co-Encadrement d'une étudiante en **Thèse vétérinaire**, 2021 (ANSES, Unité Virologie, co-encadrante : Sylvie Lecollinet) : Marine Philippine Frédérique Ollivier, Université Paris-Est Créteil, « *Prévention du virus Usutu dans les parcs zoologiques français : de l'élaboration d'une lutte vectorielle à l'étude d'une vaccination croisée* ».
- ✓ Encadrement de deux étudiantes en **Licence 3** :
  - Elodie Sayetta, 2017 (ANSES, Unité de Virologie) : « Licence Sciences et Technologie Chimie, parcours chimie-Biologie », Université Paris-Est Créteil, « *Quantification du génome du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) dans le surnageant de cellules neurales infectées* »
  - Asmaa Elshandidi, 2018 (ANSES, Unité de Virologie) : « Licence Sciences et Technologie Chimie, parcours chimie-Biologie », Université Paris-Est Créteil, « *Quantification du génome du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) dans le surnageant de cellules neurales infectées traitées ou non par des molécules antivirales.* »
- ✓ Encadrement d'une étudiante en **Master 1<sup>ère</sup> année** :
  - Salome Chavey, 2021 (ANSES, Unité virologie), Master 1 « Microbiologie, parcours Master en ingénierie Biologie-santé-Environnement », Université de Lorraine, « *Développement des outils compatibles avec le système de criblage double hybride en levure dans le but d'identifier les déterminants moléculaires sous-tendant les différences de pathogénicité et virulence des virus West Nile et Usutu* ».
- ✓ Encadrement de 5 étudiants de **Master 2<sup>ème</sup> année** :
  - Joanna Morell, 2012, Alica Miranda Coburn, 2012, Joe Crispell, 2012 (Ecole vétérinaire de Glasgow)
  - Diana Ayupova, 2017 (ANSES, Unité virologie) : Master 2 « Protéomique Structurale et Fonctionnelle », Université Pierre et Marie Curie, « *Characterization of human brain cells infection by two Flaviviruses, West Nile Virus (WNV) and Japanese Encephalitis Virus (JEV)* ».
  - Fatma-Zohra Khoubai, 2018 (ANSES, Unité virologie) : Master 2 « Bactériologie : microbiote et agents pathogènes », Université Paris-Saclay – université Paris-Sud, faculté de pharmacie, « *Utilisation de*



*l'imagerie haut débit/ haut contenu pour modéliser l'infection de progéniteurs neuraux fœtaux humains par le virus West Nile dans le but de valider l'effet antiviral de certaines molécules »*

- Clément Bigeard, 2023 (ANSES, unité Virologie/ Direction départementale de la protection des personnes de Gironde) Master 2 « One Health : Managing Health of Populations », École Nationale des Services Vétérinaires-France Vétérinaire International – VetAgro-Sup, « Implémentation d'un réseau One Health en Gironde suite aux premiers cas d'infection équine au virus West Nile »
- Manon Chevrier, 2023 (ANSES, UMR Virologie) : Ecole de Biologie Industrielle, « Amélioration des outils d'investigation des encéphalites virales chez les équidés »

✓ Encadrement de **doctorants** :

- Alice Miranda Coburn (University of Glasgow, CVR) (co-encadrement avec Pablo Murcia, financement MRC, 2013-2017): *“Molecular determinants of Influenza A virus cross-species jumps”*.  
Alice a intégré le groupe du Pr. P. Murcia en tant qu'étudiante en Master lors de son année de rotation peu de temps après mon recrutement. A la fin de cette année de découverte, Alice a décidé de réaliser sa thèse d'université au sein de notre équipe et s'est particulièrement concentrée sur le mécanisme d'adaptation des virus Influenza A (IAesV) équin H3N8 au cheval en s'intéressant au virus lui-même et aux mutations acquises par le complexe de réplication. J'ai ainsi pu encadrer Alice techniquement en la formant aux différentes techniques de biologie moléculaire lui permettant de se concentrer sur le complexe de réplication des virus IAVs. Alice a défendu sa thèse en 2017, son travail a été associé à 3 publications scientifiques.
- Joanna Morell (nom d'épouse: Crispell) (University of Glasgow, CVR) (co-encadrement avec Pablo Murcia, financement Medical Research Council (MRC), 2013-May 2018): *“Investigating equine host barriers to infection with influenza A virus”*.  
Joanna a intégré le groupe du Pr. P. Murcia en tant qu'étudiante en Master lors de son année de rotation peu de temps après mon recrutement. Au cours de son stage, elle a participé activement à la mise au point du modèle de culture d'explants de trachée canine à mes côtés. Elle a été associée à la publication parue dans Journal of Virology en 2014. A la fin de cette année de découverte, Joanna a décidé de réaliser sa thèse d'université au sein de notre équipe et s'est particulièrement concentrée sur le franchissement de barrière d'espèce des virus Influenza A aviaires et leur adaptation à l'hôte mammifère, le cheval. Nous avons ensemble développé le modèle de culture d'explants de trachée équine et optimiser les conditions d'infection de ces derniers et des cellules de derme équin (ED) par les virus Influenza aviaires (AIV) et équins (EIV). Selon notre hypothèse, la réussite de l'infection et de la transmission virale au sein de cette nouvelle population d'hôtes nécessite un mésappariement des voies de signalisation cellulaire connues au profit de la réplication virale et de l'échappement aux systèmes de défenses de l'hôte, notamment la réponse immunitaire. Afin de tester cette hypothèse, Joanna a utilisé une approche transcriptomique comparative de cellules ED en présence ou non d'interféron (IFN) et infectées par deux virus équins H3N8, le premier isolé au moment de l'émergence du virus dans la population équine en 1963 et le second isolé après 40 ans d'adaptation de ce virus dans la population équine. Ce modèle d'étude offre une occasion unique d'étudier l'adaptation virale d'un virus aviaire à un hôte mammifère, d'identifier des gènes différentiellement exprimés selon les différentes conditions d'infection et explorer les mécanismes de franchissement de barrière de l'hôte à l'infection par un virus aviaire. Joanna a développé, à mes côtés, des connaissances et compétences en culture cellulaire, en virologie ainsi qu'organisationnelles. Elle a acquis une expérience dans la conception d'expériences complexes. Elle s'est également initiée à la transcriptomique auprès du Pr P. Murcia et a su relever le défi d'analyses de ces données.  
Joanna s'est rapidement impliquée dans le développement d'outils de communication au sein du CVR. Elle est à l'origine de la newsletter, la réalisation d'interviews de chercheurs du CVR même et d'intervenants invités. Elle a également participé à plusieurs événements au musée des sciences afin de faire connaître les virus aux plus jeunes.  
Joanna a défendu brillamment sa thèse en Mai 2018. Les données obtenues ont été associées à 4 publications scientifiques auxquelles j'ai également contribué. Depuis, Joanna réalise de la vulgarisation scientifique au musée des sciences à Glasgow.
- Lise Fiacre (Université des Antilles, 2020-2023) (co-encadrement avec Sylvie Lecollinet (ANSES), Nonito Pagès et Emmanuel Albina, (CIRAD)) : *“Identification des éléments génétiques du virus West Nile*

*impliqués dans la transmission vectorielle, la virulence chez l'hôte et la diversification des populations virales*”.

Lise a commencé sa thèse en co-tutelle entre l'ANSES et le CIRAD dans l'équipe « Zoonoses équine et NeuroVirologie » dirigée par Sylvie Lecollinet en octobre 2019. L'objectif général du projet de thèse est de mieux caractériser les éléments génétiques conférant au virus West Nile une meilleur fitness pour sa transmission et sa réplication dans ses divers hôtes, notamment les vecteurs moustiques. Il visera également à déterminer si le nouveau flavivirus présent depuis 2016 en Guadeloupe (sous réserve d'identification et isolement ou de disponibilité dans un autre laboratoire) infecte les mêmes espèces de moustique et si des co-infections entre West Nile et ce virus sont possibles.

J'ai co-encadré Lise sur les aspects en virologie développés à l'ANSES. Cette première partie du travail réalisé a consisté :

1/ à amplifier et titrer les virus chimères d'intérêt générés préalablement dans le groupe et à en générer de nouveaux pour couvrir l'ensemble du génome en développant une nouvelle technique de génétique inverse. 2/ A étudier et comparer la capacité répliquative (fitness) des virus d'intérêts *in vitro* sur des cellules aviaires et équine. Lors du confinement dû à la crise COVID en mars 2020, nous avons entrepris la rédaction d'une revue bibliographique sur l'ensemble des déterminants moléculaires de virulence identifiés pour le virus West Nile publiée en décembre 2021 [1].

Lise a ainsi acquis des connaissances fondamentales approfondies en virologie, en biologie moléculaire et cellulaire. Elle a acquis une diversité de compétences en laboratoire y compris une expérience dans la conception d'expériences complexes avec des contrôles appropriés. Lise est une oratrice hors-pair ; elle a acquis de grandes compétences pour communiquer des concepts complexes avec termes simples. Lise a rejoint le CIRAD de Guadeloupe en février 2021 en ayant brillamment accompli les deux objectifs décrits ci-dessus. La seconde partie de sa thèse a consisté à tester ces virus chimériques sur les vecteurs potentiels de West Nile de Guadeloupe (mesure de compétence vectorielle) et d'estimer l'efficacité de la transmission virale ainsi que la diversification des populations virales chez le vecteur. Nous avons réalisé des visio-conférences régulièrement afin d'être informés des différents aspects de sa thèse et de son bien-être en Guadeloupe.

- Laure Mathews-Martin (thèse Formations Complémentaires Par la Recherche (FCPR), 2021-2024) (co-encadrement avec Laure Bournez (ANSES) et Sylvie Perelle (ANSES): *“Vers une meilleure compréhension du risque de transmission du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) pour l'homme via la consommation de produits laitiers non pasteurisés en France”*.

Cette thèse fait suite au premier foyer humain d'encéphalite à tiques par Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC ; 44 cas) survenu suite à la consommation de fromages de chèvre au lait cru, identifié dans le département de l'Ain. Ce foyer était situé en dehors de la zone historiquement connue pour la circulation du virus dans lequel le LNR a coordonné les investigations. L'objectif est de déterminer si en France, le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) est un danger biologique émergent à prendre en compte dans un avenir proche dans la gestion des risques sanitaires de la filière des produits au lait non pasteurisé, en particulier de chèvre. Pour y répondre, deux volets du risque sont étudiés :

- un volet épidémiologie pour améliorer les connaissances sur l'aire de répartition du TBEV en France et déterminer les conditions d'exposition des ruminants dans les zones de circulation du virus.  
- un volet expérimental sur le lait pour améliorer les connaissances sur les conditions de stabilité et de virulence du virus dans les produits laitiers en fonction des modalités de conservation, des processus de fabrication et des espèces caprines et bovines.

Laure a débuté sa thèse en septembre 2021 dans l'unité SEEPIAS (Laboratoire de la faune sauvage et de la rage à Nancy) où elle s'est concentrée sur le volet épidémiologique. Elle a rejoint l'équipe ZEN en février 2023 pour élucider les conditions de persistance du virus dans les produits laitiers crus. J'encadre Laure sur le volet expérimental de sa thèse tout en étant fortement impliquée dans le premier chapitre de sa thèse. Nous réalisons des points d'étape régulièrement afin d'être informés de l'avancée de sa thèse, des difficultés rencontrées et apporter mon aide sur la réalisation technique de test sérologiques que Laure a découvert à son arrivée.

#### 1.4 Activités de référence

- Adjointe au directeur du laboratoire de référence de l'Union Européenne (LR-UE) pour les Maladies équine :

- Coordination des activités du LR-UE : planification des Essais InterLaboratoires d'Aptitude (EILA) européens et nationaux pour chacune des maladies équine
  - Communication avec la commission européenne par échanges de mails réguliers
  - Etablissement du programme de travail et du budget
  - Animation du site web et du compte Twitter
- Organisation de Workshops LR-UE Maladies équine: établissement de l'agenda, communication de l'évènement sur les réseaux sociaux et par mails, invitation d'intervenants extérieurs à l'UE, gestion des inscriptions sur le site web, organisation logistique et organisation du moment convivial.
  - Anémie infectieuse et West Nile/Encéphalites équine exotiques (15 et 16 avril 2021) par visio-conférence
  - Morve/ Mélioïdose (16 novembre 2021) par visio-conférence
  - Arthérite virale et Dourine/Surra (9 et 10 novembre 2022) sur le site de Maisons-Alfort en format hybride.
- Analyste et signataire pour les LNR West Nile, Peste Equine et Fièvre Catarrhale Ovine et LRUE sur les encéphalites équine exotiques virales à transmission vectorielle
  - Analyses de diagnostic de première et seconde intention pour environ 200 à 250 prélèvements par an
  - Contact régulier avec les partenaires institutionnels (DGAI en vue d'expertise, de certifications sanitaires dans le cas des échanges d'équidés avec les pays tiers, etc.), les syndicats professionnels, les laboratoires de référence européens, les laboratoires vétérinaires départementaux, les différents acteurs de la filière dont les vétérinaires praticiens du réseau d'épidémio-surveillance des pathologies équine (RESPE) et l'Association francophone des vétérinaires de parcs zoologiques (AFVPZ).
  - Collaboration avec l'INRAe, le CIRAD et d'autres instituts, en Europe ou à l'international
- Coordinatrice des EILA 2019 et 2023 pour les laboratoires vétérinaires départementaux (diagnostic sérologique de l'infection équine à virus West Nile, réseau de 7 laboratoires) et coordinatrice des EILA 2023 pour les laboratoires de référence nationaux de l'Union Européenne (LR-UE) (diagnostic moléculaire pour l'infection équine à virus West Nile et à encéphalites équine exotiques) :
  - Conception du plan de campagne
  - Gestion du logiciel LEILA pour les inscriptions des laboratoires du réseau et le suivi
  - Analyses de la conformité des résultats
  - Ecriture du rapport de synthèse individuel avec envoi enquête de satisfaction
  - Synthèse du rapport final de l'EILA et envoi aux laboratoires et à la DGAL
- Conception des panels d'échantillons de l'EILA pour les laboratoires de référence nationaux de l'Union Européenne (LR-UE) (*Serology of equine infections by arthropod-borne encephalitis viruses (WNV, JEV, EEEV, WEEV and VEEV) and Molecular detection (RT-PCR) of equine infections by arthropod-borne encephalitis viruses (WNV, JEV, EEEV, WEEV and VEEV)*) :
  - Préparation du panel d'échantillons souhaités
  - Suivi du plan qualité pour assurer la traçabilité de sa constitution
  - Etiquetage et conditionnement des échantillons
  - Réalisation des tests d'homogénéité et de stabilité
  - Envoi des panels aux participants
- Coordinatrice de la validation de méthode permettant le diagnostic moléculaire de l'infection par le virus de l'encéphalite à tiques en vue d'un transfert aux laboratoires vétérinaires départementaux :
  - Caractérisation de la spécificité et sensibilité de la méthode
  - Caractérisation de la Limite de Détection
  - Détermination de la spécificité et sensibilité diagnostiques
  - Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité interlaboratoire
  - Evaluation de la robustesse en vue de variations de température
- Production d'échantillons biologiques de référence : sérums et sangs, production d'ARN standards et de virus de référence.

- Participation aux EILA peste équine organisés par le LR-UE peste équine :
  - Analyses sérologique et moléculaire de panels d'échantillons
  - Envoi des résultats au LR-UE Peste équine
  - Participation à la réunion de clôture présentant les résultats des LNR
- Accréditation COFRAC (Comité français d'accréditation) pour le diagnostic moléculaire de l'infection équine par le virus West Nile validée en mai 2021 :
  - Participation à 8 audits internes et 2 audits COFRAC
- Secrétaire du comité local d'organisation du congrès international sur les maladies équines infectieuses (Deauville, 30 septembre au 4 octobre 2024)

### 1.5 Activités d'expertise scientifique

- Réviseur pour des articles scientifiques :

*Pathogens, Infectious Diseases Now, Vaccines, Microorganisms, Transbound Emerg Dis, Viruses*

- Jury du BTS Bioanalyses et contrôles : évaluation des rapports d'étudiants de 2<sup>ème</sup> année et des oraux.
- Expert scientifique externe du groupe de travail "Emerging and Vector-borne diseases" de la « Federation of European Academies of Medicine » (FEAM).
- Expert scientifique EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) pour le virus West Nile.
- Membre du Comité scientifique du Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologies équines (RESPE).
- Appui scientifique et technique auprès de la Direction générale de l'Alimentation sur l'enquête des animaux d'élevage contaminés par le virus de l'encéphalite à tiques suite à l'identification de foyers humains d'infection en France en 2020.
- Invitations à des conférences :
  - "West Nile", Webinaire sur les maladies vectorielles zoonotiques affectant les équidés; Virus de l'encéphalite japonaise et virus West Nile, Organisation mondiale de la santé animale : région Asie - Pacifique, 29 Mars 2023.
  - Arboviroses et extension des zones à risques, Pôle d'analyse des risques et menaces relatifs aux agents biologiques, chimiques et aux explosifs, Ministère de la défense, Paris, 16 Novembre 2022.
  - « Le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) : un danger imminent ? Projets de recherche pour mieux comprendre sa distribution en France et le risque de transmission à l'homme via la consommation de produits laitiers non pasteurisés. » Gaëlle Gonzalez, Sandrine Lacour et Laure Bournez. Commission sécurité des aliments du CNIEL, Paris, 27 septembre 2022.
  - « Changements globaux et émergence de maladies virales vectorielles émergentes : exemple West Nile et Usutu. » Gaëlle Gonzalez et Stephan Zientara. Séminaire du GREMLIN (Groupe de Recherche et d'études des maladies Infectieuses – Paris Est), 22 avril 2022.
  - « Investigation des cas de TBEV dans l'Ain », Gaëlle Gonzalez, Laure Bournez, Marine Dumarest, Rayane Amaral-Moraes, Sandrine Lacour, Nolwenn M. Dheilily, Cecile Beck et Sylvie Lecollinet. Réunion Arbo-France, 6 avril 2022.
  - « Zoonotic and veterinary Emerging alphaviruses », Gaëlle Gonzalez, Cécile Beck, Sylvie Lecollinet et Stephan Zientara. Webinar EVD LabNet on emerging alphaviruses, Octobre 2021.
  - « Evaluation des risques autour de l'émergence du TBEV en France » Gaëlle Gonzalez, Laure Bournez, Cecile Beck, Sandra Martin-Latit, Nolwenn M. Dheilily, Sandrine Lacour, Sara Moutailler. Réunion Comité d'Experts Spécialisés sur l'évaluation des risques biologiques (BIORISK), 14 avril 2021.
  - « Encéphalites à tiques (TBEV) – Présentation des projets de recherche envisagés par les laboratoires Anses et échanges » Gaëlle Gonzalez, Laure Bournez, Cecile Beck, Sandra Martin-Latit, Nolwenn M. Dheilily, Sandrine Lacour, Sara Moutailler. Réunion Comité d'Experts Spécialisés BIORISK et SABA, 9 février 2021.

## 1.6 Formations

2022 : Formation à l'expérimentation animale, module général « Conception et réalisation des procédures », module « rongeurs, lapins », module « ruminants, cheval, porc ».

2021 : Bioinformatique pour le traitement des données de séquençage (NGS), Management de projet.

2020 : Initiation à la Phylogénie.

2019: Formation initiale « Sauveteur Secouriste du Travail initial » (SST)

*A partir de 2019 : Maintien - Actualisation des Compétences des SST*

2018: Utilisation du logiciel LEILA

## 1.7 Valorisation

### ✓ Publications scientifiques internationales

Les étudiants pour lesquels j'ai participé à l'encadrement ont leur nom en [bleu](#).

1. J.S. Niczyporuk, W. Kozdrun; A. Czujkowska.; Y. Blanchard; T. Helle; N.M. Dheilly; **G. Gonzalez**. West Nile Virus Lineage 2 in Free-Living Corvus cornix Birds in Poland. Trop. Med. Infect. Dis. 2023, 8, 417. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080417>.
2. [L. Fiacre](#), S. Lowenski, C. Bahuon C, M. Dumarest, B. Lambrecht, M. Dridi, E. Albina, J. Richardson, S. Zientara, MA. Jiménez-Clavero, N. Pardigon, S. Lecollinet, **G. Gonzalez**. Evaluation of NS4A, NS4B, NS5 and 3'UTR Genetic Determinants of WNV Lineage 1 Virulence in Birds and Mammals. Viruses. 2023 Apr 29;15(5):1094. doi: 10.3390/v15051094. PMID: 37243180; PMCID: PMC10222181.
3. N. Johnson, C.V. Migné, **G. Gonzalez**. Tick-borne encephalitis. Curr Opin Infect Dis. 2023 Jun 1;36(3):198-202. doi: 10.1097/QCO.0000000000000924. Epub 2023 Apr 10. PMID: 37093044.
4. C. Saegerman ; M.-F. Humblet ; M. Leandri, **G. Gonzalez**, P. Heyman, H. Sprong, M. L'Hostis, S. Moutailler, S. Bonnet, N. Haddad; et al. First Expert Elicitation of Knowledge on Possible Drivers of Observed Increasing Human Cases of Tick-Borne Encephalitis in Europe. Viruses 2023, 15, 791. <https://doi.org/10.3390/v15030791>
5. A. Parfut, E. Laugel, S. Baer, **G. Gonzalez**, Y. Hansmann, MJ. Wendling, S. Fafi-Kremer, A. Velay. Tick-borne encephalitis in pediatrics: an often overlooked diagnosis. Infect Dis Now. 2023 2023 Mar;53(2):104645. doi: 10.1016/j.idnow.2023.01.005. Epub 2023 Jan 13. PMID: 36642097.
6. L.A Crivei, S. Moutailler, **G. Gonzalez**, S. Lowenski, I.C. Crivei, D. Porea, D.G. Anita, I.A. Ratoi, S. Zientara, L.E. Oslobanu, A. Tomazatos, G. Savuta, S. Lecollinet (2023). "Detection of West Nile virus lineage 2 in eastern Romania and first identification of Sindbis virus RNA in mosquitoes analysed using high-throughput microfluidic real-time PCR". Viruses. 2023; 15(1):186. <https://doi.org/10.3390/v15010186>
7. F. Laabassi, N. Dheilly, C. Beck, R. Amaral, **G. Gonzalez**, D. Gaudaire, A. Madeline, F. Lecouturier, S. Lecollinet, S. Zientara, A. Hans, JC. Valle-Casuso. Serological evidence of circulation of West Nile virus in equids in Algerian eastern drylands and its epidemiological risk factors. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2023 Jan 10;94:101947.
8. Crivei, L.A, S. Moutailler, **G. Gonzalez**, S. Lowenski, I.C. Crivei, D. Porea, D.G. Anita, I.A. Ratoi, S. Zientara, L.E. Oslobanu, A. Tomazatos, G. Savuta, S. Lecollinet (2023). "Detection of West Nile virus lineage 2 in eastern Romania and first identification of Sindbis virus RNA in mosquitoes analysed using high-throughput microfluidic real-time PCR". Viruses. 2023; 15(1):186.
9. **Gonzalez, G.**, L. Bournez, R. A. Moraes, D. Marine, C. Galon, F. Vorimore, M. Cochon, A. Nougairède, C. Hennechart-Collette and S. Perelle (2022). "A One-Health Approach to Investigating an Outbreak of Alimentary Tick-Borne Encephalitis in a Non-endemic Area in France (Ain, Eastern France): A Longitudinal Serological Study in Livestock, Detection in Ticks, and the First Tick-Borne Encephalitis Virus Isolation and Molecular Characterisation." Frontiers in microbiology 13: 863725-863725.
10. Hennechart-Collette, C., **G. Gonzalez**, L. Fourniol, A. Fraisse, C. Beck, S. Moutailler, L. Bournez, N. M. Dheilly, S. A. Lacour, S. Lecollinet, Sandra Martin-Latil and Sylvie Perelle (2022). "Method for tick-borne encephalitis virus detection in raw milk products." Food Microbiology 104: 104003.

11. Amat, J. A., V. Patton, C. Chauché, D. Goldfarb, [J. Crispell](#), Q. Gu, [A. M. Coburn](#), **G. Gonzalez**, D. Mair, L. Tong, L. Martinez-Sobrido, J.F. Marshall, F. Marchesi and P.R. Murcia (2021). "Long-term adaptation following influenza A virus host shifts results in increased within-host viral fitness due to higher replication rates, broader dissemination within the respiratory epithelium and reduced tissue damage." *PLoS pathogens* 17(12): e1010174.
12. Clé M, O. Constant, J. Barthelemy, C. Desmetz, M. F. Martin, V. Foulongne, D. Cadar, G. Savini, J. Schmidt-Chanasit, J.C. Saiz, S. Lecollinet, C. Beck, **G. Gonzalez**, L. Lapeyre, F. Gosselet, P. Van de Perre, S. Salinas and Y. Simonin. Differential neurovirulence of Usutu isolates in mice and neuronal cells. *J Neuroinflammation*. 2021 Feb 23;18(1):59.
13. Beck, C., R. Hamel, M. Dumarest, **G. Gonzalez** and S. Lecollinet (2021). Nonhuman occurrence of Zika virus infection: Implications for control. *Zika Virus Biology, Transmission, and Pathology*, Elsevier: 453-465.
14. Beck, C., I. Leparç Goffart, F. Franke, **G. Gonzalez**, M. Dumarest, S. Lowenski, Y. Blanchard, P. Lucas, X. d. Lamballerie, G. Grard, G. A. Durand, S. Zientara, J. Tapprest, G. L'Ambert, B. Durand, S. Desvaux, and S. Lecollinet (2020). "Contrasted epidemiological patterns of West Nile virus lineages 1 and 2 infections in France from 2015 to 2019." *Pathogens* 9(11): 908.
15. [Fiacre, L.](#), N. Pagès, E. Albina, J. Richardson, S. Lecollinet and **G. Gonzalez** (2020). "Molecular determinants of West Nile virus virulence and pathogenesis in vertebrate and invertebrate hosts." *International Journal of Molecular Sciences* 21(23): 9117.
16. Fares, M., M. Cochet-Bernoin, **G. Gonzalez**, C. N. Montero-Menei, O. Blanchet, A. Benchoua, C. Boissart, S. Lecollinet, J. Richardson, N. Haddad and M. Couplier (2020). "Pathological modeling of TBEV infection reveals differential innate immune responses in human neurons and astrocytes that correlate with their susceptibility to infection." *Journal of neuroinflammation* 17(1): 1-19.
17. Beck, C., I. Leparç-Goffart, D. Desoutter, E. Debergé, H. Bichet, S. Lowenski, M. Dumarest, **G. Gonzalez**, C. Migné, J. Vanhomwegen, S. Zientara, B. Durand and S. Lecollinet (2019). "Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on French Pacific Islands." *PLoS neglected tropical diseases* 13(2): e0007162.
18. Lecollinet, S., S. Pronost, M. Couplier, C. Beck, **G. Gonzalez**, A. Leblond and P. Tritz (2019). "Viral equine encephalitis, a growing threat to the horse population in Europe?" *Viruses* 12(1): 23.
19. Cheval, J., E. Muth, **G. Gonzalez**, M. Couplier, P. Beurdeley, S. Cruveiller and M. Eloit (2019). "Adventitious virus detection in cells by high-throughput sequencing of newly synthesized RNAs: unambiguous differentiation of cell infection from carryover of viral nucleic acids." *MSphere* 4(3): e00298-00219.
20. Zhu, H., B. Damdinjav, **G. Gonzalez**, L. V. Patrono, H. Ramirez-Mendoza, J. A. Amat, [J. Crispell](#), Y. A. Parr, T.-a. Hammond and E. Shiilegdamba, Y. H. Connie Leung, M. Peiris, J.F. Marshall, J. Hughes, M. Gilbert and P. R. Murcia (2019). "Absence of adaptive evolution is the main barrier against influenza emergence in horses in Asia despite frequent virus interspecies transmission from wild birds." *PLoS pathogens* 15(2): e1007531.
21. Beck, C., **G. Gonzalez**, A. Decors, K. Lemberger, S. Lowenski, M. Dumarest and S. Lecollinet (2018). "Epidemiological surveillance of Usutu virus in avifauna." *Virologie* 22(5): 261-263.
22. Chauche, C., [J. Morrell](#), **G. Gonzalez**, [A.M. Coburn](#), H. Zhu, J. Marshall and P. Murcia (2016). "Molecular dynamics of influenza A virus adaptation in horses." *Journal of Equine Veterinary Science*(39): S73.
23. Feng, K. H., **G. Gonzalez**, L. Deng, H. Yu, V. L. Tse, L. Huang, K. Huang, B. R. Wasik, B. Zhou, D. E. Wentworth, E. C. Holmes, X. Chen, A. Varki, P. R. Murcia and C. R. Parrish (2015). "Equine and canine influenza H3N8 viruses show minimal biological differences despite phylogenetic divergence." *Journal of virology* 89(13): 6860-6873.
24. **Gonzalez, G.**, J. F. Marshall, [J. Morrell](#), D. Robb, J. W. McCauley, D. R. Perez, C. R. Parrish and P. R. Murcia (2014). "Infection and pathogenesis of canine, equine, and human influenza viruses in canine tracheas." *Journal of virology* 88(16): 9208-9219.
25. Chua, A. J., C. Vituret, M. L. Tan, **G. Gonzalez**, P. Boulanger, M.-L. Ng and S.-S. Hong (2013). "A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies." *Virology journal* 10(1): 1-18.
26. **Gonzalez, G.**, C. Vituret, A. Di Pietro, M. Chanson, P. Boulanger and S.-S. Hong (2012). "Microparticle-mediated transfer of the viral receptors CAR and CD46, and the CFTR channel in a CHO cell model confers new functions to target cells." *PLoS One* 7(12): e52326.
27. **Gonzalez, G.**, P. Boulanger and S.-S. Hong (2012). CFTR Gene Transfer and Tracking the CFTR Protein in the Airway Epithelium. *Cystic Fibrosis-Renewed Hopes Through Research*, IntechOpen.

28. **Gonzalez, G.**, S. Corjon, S P. Henning, A. Grichine, L. Lindholm, P. Boulanger, P. Fender and S.-S. Hong (2011). "Cell entry and trafficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon: heparan sulfate interaction." *PLoS One* 6(5): e18205.
29. **Gonzalez, G.**, S. Dafonseca, E. Errazuriz, P. Coric, F. Souquet, S. Turcaud, P. Boulanger, S. Bouaziz and S. S. Hong (2011). "Characterization of a novel type of HIV-1 particle assembly inhibitor using a quantitative luciferase-Vpr packaging-based assay." *PLoS One* 6(11): e27234.
30. Granio, O., K. J. A. Excoffon, P. Henning, P. Melin, C. Norez, **G. Gonzalez**, P. H. Karp, M. K. Magnusson, N. Habib, L. Lindholm, F. Becq, P. Boulanger, J. Zabner and S. S. Hong (2010). "Adenovirus 5–Fiber 35 Chimeric Vector Mediates Efficient Apical Correction of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defect in Cystic Fibrosis Primary Airway Epithelia." *Human gene therapy* 21(3): 251-269.
31. Kitidee, K., S. Nangola, **G. Gonzalez**, P. Boulanger, C. Tayapiwatana and S.-S. Hong (2010). "Baculovirus display of single chain antibody (scFv) using a novel signal peptide." *BMC biotechnology* 10(1): 1-21.
32. **Gonzalez, G.**, O. Granio, K. Ashbourne-Excoffon, P. Henning, P. Melin, C. Norez, P. Karp, L. Lindholm, F. Becq and P. Boulanger (2009). "The Adenovirus chimeric vector Ad5F35/GFP-CFTR efficiently restores the CFTR deficiency in human airway epithelia via apical surface transduction." *Journal of Cystic Fibrosis*(8): S30.

✓ **Publications nationales**

1. Tritz P, G. Grandchamps-Renard, **G. Gonzalez**. Focus sur la Fièvre de West Nile / Collaboration ANSES-AVEF. Pratique scientifique, site web de l'Association vétérinaire équine française (AVEF), 27 juillet 2023.
2. Tritz, P. et **G. Gonzalez**. Deux cas confirmés d'encéphalite à tiques chez le cheval. Pratique vétérinaire équine n° 0217, Mars 2023.
3. Migné C. V., M. Dumarest, T. Mariteragi-Helle, N.M. Dheilly, S. Zientara, **G. Gonzalez**. Premier cas équin d'infection West Nile identifié dans le département du Var. Août 2022 - Site Web du RESPE.
4. Migné C. V., M. Dumarest, T. Mariteragi-Helle, N.M. Dheilly, S. Zientara, **G. Gonzalez**. Premier foyer équin de fièvre West Nile de la saison 2022 détectée en France dans le Var. Août 2022 Plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale (plateforme-esa.fr)
5. **Gonzalez, G.**, N.M. Dheilly, S. Zientara, A. Decors, S. Devaux, H. Noël, MC. Paty, S. Gutierrez, JP. Amat, S. Carles, E. Cardinale, J. Cauchard, C. Dupuy, S. Falala, G. Gerbier, V. Hénaux, R. Lancelot, MB. Peyrat, C. Trévenec (2022) Bilan de la saison 2021 de fièvre West Nile en Europe. Veille Sanitaire internationale – Plateforme ESA. [Bilan de la saison 2021 de fièvre West Nile en Europe | Plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale \(plateforme-esa.fr\)](#).
6. **Gonzalez, G.**, J-L. Cadoré, N.M. Dheilly (2022) Carnet de Santé : Tour d'horizon des maladies vectorielles chez le cheval. *Cheval Santé* 139 :56-60
7. Beck, C., **G. Gonzalez**, C. Eraud, A. Decors, S. Desvaux and S. Zientara (2018) "Bilan de la circulation du virus Usutu en France au 27 août." Plateforme ESA, Septembre 2018.
8. Migné C. V., C. Beck, **G. Gonzalez**, S. Lecollinet and S. Moutailler (2021). "Quels outils pour la surveillance des arbovirus émergents au sein de leurs hôtes mammifères et vecteurs arthropodes?" *Virologie* 25(1): 12-28.
9. Beck C., S. Lecollinet, **G. Gonzalez**, S. A. Lacour, S. Moutailler, L. Bournez (2020). Encéphalite à tiques en élevage : les produits au lait cru peuvent être source de contamination humaine. *Le Nouveau Prat Vet élevages et santé (NEVA)* N°47, Vol 12.
10. Beck C., **G. Gonzalez**, S. Desvaux, M. Dumarest, F. Franke, S. Lowenski, S. Lecollinet (2020). Le virus de la fièvre West Nile sous haute surveillance en France. *NEVA* 14 (50), Mars 2020.
11. Beck C., **G. Gonzalez**, A. Decors, K. Lemberger, S. Lowenski, M. Dumarest, S. Lecollinet (2018). Surveillance épidémiologique du virus Usutu. *Virologie* 2018;22(5): 261-63. doi:10.1684/vir.2018.0751.

✓ **Communications affichées**

1. **Mathews-Martin L.**, R. Metras, C. Caillot, J-M. Boucher, S. Lacour, R. Amaral-Moraes, M. Dumarest, T. Helle, C. Migné, F. Boue, S. Perelle, N.M. Dheilly, C. Beck, G. Gonzalez, L. Bournez. Seroprevalence and factors associated with the exposure of cattle to the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in the Northeastern part of France. Journée scientifique de l'EnvA 18-19 septembre 2023, Maisons-Alfort, France.



2. [Mathews-Martin L.](#), R. Metras, C. Caillot, J-M. Boucher, S. Lacour, R. Amaral-Moraes, M. Dumarest, T. Helle, C. Migné, F. Boue, S. Perelle, N.M. Dheilly, C. Beck, G. Gonzalez, L. Bournez. Seroprevalence and factors associated with the exposure of cattle to the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in the Northeastern part of France. Journée scientifique de l'ANSES 2-3 octobre 2023, Maisons-Alfort, France.
3. M. Dumarest, Chevrier M., C. Beck, S. Lecollinet, M. Dumarest, T. Helle, S. Zientara, S.C. Weaver, N.M. Dheilly, C.V. Migné, **G. Gonzalez**. Improvement of molecular and serological tools for the detection of Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV). ISWALD, 29 juin au 1er Juillet 2023, Lyon, France.
4. Migné C.V., M. Dumarest, T. Helle, R. Amaral-Moraes, A. Decors, P. Tritz, S. Lecollinet, S. Zientara, C. Beck, G. Jouvion, P. Arné, P. Gourlay, G. Le Loc'h, L. Hivert, N.M. Dheilly, **G. Gonzalez** (2023), Enhancement and extension of WNV and USUV surveillance in France through a national serosurvey conducted in wild captive birds and improvement of molecular diagnostic tools, Epizone 26 au 28 avril 2023, Novi-Sad, Serbie.
5. CoVetLab, T. B. Rasmussen, L. Lohse, A. S. Olesen, K. L. Mansfield, I. Parekh, N. Dheilly, **G. Gonzalez**, C. V. Migné, T. Helle, T. Lilja, J. F. Lindahl, M. Holwerda, W. H.M. van der Poel, G. M. Bron (2023). Preparedness – Aligning Japanese Encephalitis virus diagnostics in Europe, Epizone 26 au 28 avril 2023, Novi-Sad, Serbie.
6. [Chevrier M.](#), C. Beck, S. Lecollinet, M. Dumarest, T. Helle, S. Zientara, S.C. Weaver, **G. Gonzalez**, N.M. Dheilly, C.V. Migné. Améliorations des outils sérologiques d'investigation des encéphalites virales chez les équidés. Journées Francophones de Virologie 17-18 avril 2023, Paris, France.
7. Migné C.V., M. Dumarest, G. Hohl, S. Lecollinet, C. Beck, S. Zientara, **G. Gonzalez** et N.M. Dheilly. Outils de diagnostic moléculaire pour une surveillance renforcée du virus du Nil occidental et du virus Usutu. Journées Francophones de Virologie 17-18 avril 2023, Paris, France.
8. Dumarest. M, N. Ramage, C.V. Migné, T. Helle, S. Zientara, N.M. Dheilly, **G. Gonzalez**, C. Beck (2023). Validation d'une méthode de diagnostic moléculaire du Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV). Journées Francophones de Virologie 17-18 avril 2023, Paris, France.
9. Toneatti P, Amaral Moraes R, Fusade-Boyer M, Dumarest M, Migne C, Martin-Latil S, **Gonzalez G**, Dheilly NM (2022). Role of the microbiota in alimentary tick-borne encephalitis virus infection, Applied Hologenomics Conference, 13-15 Septembre 2021, Bilbao, Spain.
10. Cochet-Bernoin, M., F. Piumi, K. Gorna, **G. Gonzalez**, A. Danckaert, N. Aulner, H. Munier-Lehmann, S. Zientara, F. X. Donadeu and A. Benchoua (2021). Identification de molécules antivirales contre le virus West Nile par une approche combinant l'imagerie cellulaire et les cellules neurales équines dérivées de cellules souches pluripotentes induites. Journées Francophones de Virologie, Avril 2021.
11. Cochet-Bernoin, M., F. Piumi, K. Gorna, **G. Gonzalez**, A. Danckaert, N. Aulner, H. Munier-Lehmann, S. Zientara, X. Donadeu and A. Benchoua (2021). Identification of antiviral molecules against West Nile virus by an approach combining cell imaging and equine neural cells derived from induced-pluripotent stem cells. Journées Scientifiques et Doctorales de l'Anses (JSDA) 2021.
12. Couplier, M. and **G. Gonzalez** (2018). Identification de molécules antivirales à large spectre actives contre le virus de l'encéphalite à tiques par criblage à haut contenu de cellules neurales humaines dérivées de progéniteurs foetaux. Journées Francophones de Virologie.
13. **Gonzalez G.**, M. Cochet, M. Fares, N. Aulner, A. Danckaert et M. Couplier (2018), Développement d'une méthode de criblage à haut débit – par imagerie automatisée en utilisant des cellules neurales humaines dérivées de progéniteurs foetaux – pour l'identification de molécules antivirales contre le virus de l'encéphalite à tiques, Journée Francophone de virologie 2018, Paris, France.
14. **Gonzalez G.**, J.F. Marshall, [J. Morrell](#), [A. .M. Coburn](#), C. Chauché, K. Feng, C. R. Parrish and P. R. Murcia. (2013), An ex-vivo Dog Tracheal Organ culture System for the Study of Canine Influenza Emergence, International Symposium of Neglected Influenza Viruses, Dublin, Royaume-Uni, Février 2013.
15. **Gonzalez G.**, J.F. Marshall, [J. Morrell](#), [A. .M. Coburn](#), C. Chauché, K. Feng, C. R. Parrish and P. R. Murcia. (2012), An ex-vivo Dog Tracheal Organ culture System for the Study of Canine Influenza Emergence, Scottish Universities Life Sciences Alliance, Edinburg, Royaume-Uni, Juin 2012.
16. **Gonzalez G.**, C. Vituret, O. Granio, P. Boulanger et S.S. Hong (2010), Molecular mechanisms of negative interference of Ad5 vectors with the CFTR chloride channel function, Colloque des jeunes chercheurs de l'association Vaincre La Mucviscose, Paris, Mars 2010. Prix du meilleur poster 2010.



✓ **Communications orales**

*Les communications invitées sont en italique.*

1. « Détermination de l'exposition des bovins au virus de l'encéphalite à tiques dans la région endémique d'Alsace Lorraine en France ». [Laure Mathews-Martin](#), Raphaëlle Metras, C. Caillot, J-M. Boucher, Sandrine Lacour, Rayane Amaral-Moraes, Marine Dumarest, Teheipuaura Helle, Camille Victoire Migné, Frank Boue, Sylvie Perelle, Nolwenn M. Dheilly, Cécile Beck, **Gaëlle Gonzalez\***, Laure Bournez\*.
2. « *Situation épidémiologique de WNV et USUV en France et en Europe en 2023* ». **Gaëlle Gonzalez**, Groupe de travail ANSES « Vecteurs » (18 septembre 2023) et Comité d'experts localisés « Santé et Bien-être des animaux », ANSES Maisons-Alfort.
3. « La conquête de l'Ouest par le virus West Nile, flavivirus émergent en France. » **Gaëlle Gonzalez**, Camille Victoire Migné, Marine Dumarest, Teheipuaura Helle, Pierre Tritz, Christel Marcillaud-Pitel, Stephan Zientara et Nolwenn M Dheilly. Journées sciences et innovations équine, IFCE, Saumur, 1<sup>er</sup> et 2 juin 2023.
4. "Tick-Borne Encephalitis Virus-infected human neural/glial cells identify antiviral drugs". Noémie Berry, **Gaëlle Gonzalez**, Anne Huard De Verneuil, Valentine Chaillot, Mazigh Farès, Marielle Cochet, François Puimi, Kamila Gorna, Aïcha Dembélé, Peggy Suzanne, Odile Blanchet, Noémie, Aurine, Théo La Rosa, Patrick Dallemagne, Nathalie Aulner, Bertrand Pain, Anne Danckaert, Muriel Couplier. Journées Francophones de Virologie 17-18 avril 2023, Paris, France.
5. « La conquête de l'Ouest par les virus West Nile et Usutu, deux flavivirus émergents en France et en Europe ». **Gaëlle Gonzalez**, Camille V. Migné, Marine Dumarest, Teheipuaura Helle, Pierre Tritz, Anouk Decors, Stéphanie Desvaux, Cécile Beck, Sylvie Lecollinet et Nolwenn Dheilly. Journées Francophones de Virologie 17-18 avril 2023, Paris, France.
6. "Webinar on Vector borne Zoonoses affecting equines: Japanese Encephalitis and West Nile fever", "West Nile Virus", **Gaëlle Gonzalez**, The WOA Regional Representation for Asia and the Pacific, 29 Mars 2023.
7. « *Le virus West Nile* ». Réunion Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), pôle maladies infectieuses émergentes. Sylvie Lecollinet et **Gaëlle Gonzalez**, 3 février 2023, visioconférence.
8. « *Situation épidémiologique de WNV en France et en Europe* ». **Gaëlle Gonzalez** et Nolwenn M Dheilly. Réunion ArboFrance, 18 janvier 2023, visioconférence.
9. "Genetic determinants of the virulence of mediterranean WNV isolates". [L. Fiacre](#), S. Lowenski, C. Bahuon, M. Bayet, M. Dridi, E. Albina, N. Pages, B. Lambrecht, N. Pardigon, S. Lecollinet, **G. Gonzalez** (2022). Joint International Tropical Medicine Meeting, 7-9 Décembre 2022, Bangkok, Thaïlande.
10. "Dynamics of WNV infection in Culex mosquitoes". Pature N, [L. Fiacre](#), C. Hermant, O. Gros, E. Albina, **G. Gonzalez**, N. Pages, S. Lecollinet (2022). Joint International Tropical Medicine Meeting, 7-9 Décembre 2022, Bangkok, Thaïlande.
11. *Arboviroses et extension des zones à risques, Pôle d'analyse des risques et des menaces relatifs aux agents biologiques, chimiques et aux explosifs, Ministère de la défense, Paris, 16 Novembre 2022.*
12. « Towards the development of an active surveillance system of WNV and USUV in France ». **Gaëlle Gonzalez**, Marine Dumarest, Rayane Amaral-Moraes, Camille V. Migné, Anouk Decors, Pierre Tritz, Cécile Beck, Stephan Zientara, Sylvie Lecollinet, and Nolwenn M Dheilly. Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Séville (Espagne), 23 au 26 octobre 2022.
13. « Développement de méthodes de diagnostic pour une surveillance renforcée des virus West Nile et Usutu en France ». **Gaëlle Gonzalez**, Camille V. Migné, Marine Dumarest, Teheipuaura Helle et Nolwenn M Dheilly. Rencontres Nationales de Santé Publique Vétérinaire, Bourges, 13 – 14 Octobre 2022.
14. Updates on two zoonotic vector-borne diseases in Europe: West Nile and Usutu – Re-emergence of Bluetongue serotype 8. **Gaëlle Gonzalez** and Stephan Zientara. Association Vétérinaire Equine Française (AVEF), Reims, 6 octobre 2022.
15. « Le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) : un danger imminent ? Projets de recherche pour mieux comprendre sa distribution en France et le risque de transmission à l'homme via la consommation de produits laitiers non pasteurisés. » Gaëlle Gonzalez, Sandrine Lacour et Laure Bournez. Commission sécurité des aliments du CNIEL, Paris, 27 septembre 2022.

16. « *Changements globaux et émergence de maladies virales vectorielles émergentes : exemple West Nile et Usutu.* » **Gaëlle Gonzalez** et Stephan Zientara. Séminaire du GREMLIN (Groupe de Recherche et d'études des maladies Infectieuses – Paris Est), 22 avril 2022.
17. « *Investigation des cas de TBEV dans l'Ain* », **Gaëlle Gonzalez**, Laure Bournez, Marine Dumarest, Rayane Amaral-Moraes, Sandrine Lacour, Nolwenn M. Dheilily, Cecile Beck et Sylvie Lecollinet. Réunion Arbo-France, 6 avril 2022.
18. « *Zoonotic and veterinary Emerging alphaviruses* », **Gaëlle Gonzalez**, Cécile Beck, Sylvie Lecollinet et Stephan Zientara. Webinar EVD LabNet on emerging alphaviruses, Octobre 2021.
19. « Premiers cas humains d'infection à TBEV en France suite à la consommation de fromage de chèvre au lait cru ». **Gaëlle Gonzalez**, Laure Bournez, Cecile Beck, Marine Dumarest, Sandra Martin-Latit, Catherine Hennechart-Collette, Rayane Amaral Moraes, Sandrine Lacour, Fabien Vorimore, Sara Moutailler, Sylvie Lecollinet. Journées Francophones de Virologie, 26-27 avril 2021.
20. « Deux épizooties à virus West Nile et Usutu touchent la France en 2018 », **Gaëlle Gonzalez**, Marine Dumarest, Steeve Lowenski, Cécile Beck, Stéphan Zientara et Sylvie Lecollinet. Journées Scientifiques et Doctorales de l'Anses (JSDA), Septembre 2020.
21. « Pathological modeling of TBEV infection using human neuronal/glial co-cultures derived from foetal neural progenitor cells and high-throughput screening for anti-viral drugs ». **Gaëlle Gonzalez**, Marielle Cochet, Mazigh Fares, Nathalie Aulner, Anne Danckaert et Muriel Couplier. International Meeting on Arboviruses and their Vectors, Septembre 2019.
22. « High content screening/imaging of differentiated human primary neural cells identifies drug candidates that inhibits TBEV infection ». **Gaëlle Gonzalez**, Marielle Cochet, Mazigh Fares, Nathalie Aulner, Anne Danckaert et Muriel Couplier. European Seminar in Virology, 2018.
23. « Utilisation de l'imagerie à haut contenu/ haut débit pour identifier des molécules antivirales », **Gaëlle Gonzalez**, Marielle Cochet, Mazigh Fares, Nathalie Aulner, Anne Danckaert et Muriel Couplier. Maisons-Alfort, France, Novembre 2017.
24. « An experimental approach to understand the role of evolution on viral emergence ». **Gaëlle Gonzalez**, John F. Marshall, [Joanna Morrell](#), [Alice .M. Coburn](#), Caroline Chauché, Kurtis Feng, Colin. R. Parrish and Pablo. R. Murcia. American Society for Virology, London Ontario, Canada, Juillet 2015.
25. « Replication of human influenza viruses in dog tracheas: implications for viral emergence ». **Gaëlle Gonzalez**, John F. Marshall, [Joanna Morrell](#), Colin. R. Parrish and Pablo. R. Murcia. Society of General Microbiology, Liverpool, Royaume-Uni, Avril 2014.
26. « An ex-vivo Dog Tracheal Organ culture System for the Study of Canine Influenza Emergence ». **Gaëlle Gonzalez**, John F. Marshall, [Joanna Morrell](#), Colin. R. Parrish and Pablo. R. Murcia. Society of General Microbiology, Manchester, Royaume-Uni, Mars 2013.
27. « Transfert intercellulaire du CFTR via des microparticules membranaires ». **Gaëlle Gonzalez**, Cyrielle Vituret, Ophélie Granio, Pierre Boulanger et Saw-See Hong. Colloque des jeunes chercheurs de Vaincre La Mucoviscidose, Paris, Mars 2011.
28. « The Adenovirus chimeric vector Ad5F35-GFP-CFTR efficiently restores the CFTR deficiency in human airway epithelia via apical surface transduction ». **Gaëlle Gonzalez**, Cyrielle Vituret, Ophélie Granio, Pierre Boulanger et Saw-See Hong. Congrès Européen sur la Mucoviscidose, Brest 10 – 13 Juin 2009.
29. « Vecteur adéno-viral efficace pour le transfert du gène CFTR par voie apicale dans les cellules respiratoires humaines ». **Gaëlle Gonzalez**, Cyrielle Vituret, Ophélie Granio, Pierre Boulanger et Saw-See Hong. Colloque des jeunes chercheurs de Vaincre La Mucoviscidose, Paris, Mars 2009.

## 1.8 Mes Modèles d'études

Je me suis rapidement passionnée pour les interactions moléculaires entre les virus et les hôtes infectés. Mes travaux ont porté jusqu'à présent sur la compréhension des mécanismes moléculaires et évolutifs qui sous-tendent le changement d'hôte et l'émergence virale.

Je me suis particulièrement intéressée à des virus multi-hôtes circulant initialement dans les communautés d'oiseaux sauvages, ayant franchi la barrière d'espèce, évolué et s'étant adapté à un nouvel hôte. Mes trois principaux sujets d'études correspondent aux virus Influenza équin (EIV) et canin (CIV) et aux flavivirus West Nile (WNV) et Usutu (USUV). Je m'intéresse également au virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) et à son mode de transmission par la voie alimentaire.

Je me suis toujours passionnée par le développement et l'emploi de nouvelles technologies qui nous permettent d'appréhender des questions jusqu'alors peu abordables tant sur la thérapie génique et l'identification de molécules antivirales. Ces défis méthodologiques ont également rythmé et rythmeront ma carrière.

## 2. Travaux de thèse et post-doctorat

### 2.1 Thèse de doctorat en virologie et thérapie génique (2009-2011)

#### 2.1.1 Contexte

J'ai réalisé mon doctorat au sein de l'UMR 754 « Infections virales et pathologie comparée », à la faculté Claude Bernard Lyon 1 sous la direction du Pr Pierre Boulanger et du Dr Saw-See Hong. Pour réaliser ces travaux, j'ai bénéficié d'une allocation de recherche par l'Association "Vaincre la Mucoviscidose" pendant 3 ans. Ma thèse est intitulée : « *Transfert du CFTR par gènes dérivés des adénovirus ou par trogocytose de microparticules membranaires : mécanismes moléculaires et applications à la mucoviscidose* ».

La mucoviscidose est une maladie génétique due à des mutations du gène *cftr* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), conduisant à une altération de la fonction de canal à ions chlorures de la glycoprotéine transmembranaire CFTR associée à une atteinte pulmonaire sévère. A ce jour, environ 2 000 mutations ont été répertoriées dans ce gène [2]. Cette maladie monogénique est la plus fréquente des maladies génétiques dans les populations caucasiennes, affectant 85 000 individus à travers le monde dont environ 7000 en France. Le dépistage néonatal de la maladie ainsi que l'amélioration des traitements symptomatiques ont permis d'augmenter l'espérance de vie des patients qui est, aujourd'hui, d'environ 35 ans. Ces traitements restent cependant lourds et contraignants altérant considérablement leur qualité de vie. Il est donc indispensable de développer des traitements plus efficaces traitant non pas uniquement la cause de la maladie mais l'origine de celle-ci, c'est-à-dire l'atteinte génétique.

Deux types de thérapies sont actuellement envisagées : la thérapie génique et la thérapie protéique.

Une connaissance plus approfondie de la protéine CFTR, de son fonctionnement et de ses partenaires moléculaires a ouvert la voie aux thérapies protéiques. Cependant, ces traitements étant spécifiques de certaines mutations, ils bénéficient uniquement à moins de 50% des patients atteints de la mucoviscidose [3, 4].

La thérapie génique est, quant à elle, indépendante du génotype du patient et permettrait donc de traiter l'ensemble des malades. En 1990, une étude menée *in vitro* sur des cellules épithéliales porteuses du gène *cftr* muté ont permis de rétablir l'expression de la protéine CFTR et de démontrer l'intérêt d'une telle stratégie [5].

La thérapie génique correspond donc à une approche thérapeutique permettant de délivrer aux cellules cibles un gène « sain » capable de suppléer le gène « altéré ». Aujourd'hui, les approches sont assez diversifiées et reposent sur des stratégies correctives telles que l'édition génomique (CRISPR/Cas9) ou la modification de l'ARN, des vecteurs intégratifs ou non-intégratifs et différentes modalités de thérapies géniques *ex-vivo*, *in-vivo*.

Dans le cas de la mucoviscidose, l'objectif est de délivrer au sein de l'épithélium respiratoire le gène *cftr* fonctionnel compensant le gène défectueux à l'origine de la maladie. Il s'agit donc d'une thérapie génique somatique pour laquelle la durée d'expression du transgène est à prendre en compte. Celle-ci dépend de la stabilité du transgène lui-même mais également de la durée de vie des cellules traitées, l'épithélium respiratoire se renouvelant tous les 40 jours. L'acheminement du gène sain dans les cellules cibles nécessite l'utilisation de vecteurs viraux ou synthétiques permettant une expression durable du transgène sans engendrer de toxicité ou de réponse immunitaire de la part de l'hôte. Ces vecteurs ont été utilisés comme agents de transfert de gènes notamment dans le cadre d'essais cliniques de thérapie génique appliquée à la mucoviscidose.

#### 2.1.1.1 Les vecteurs viraux en thérapie génique de la mucoviscidose

Les vecteurs viraux sont impliqués dans plus de 75% des essais cliniques de thérapie génique de nos jours.

Les chercheurs ont utilisé les propriétés exceptionnelles des virus qualifiés de « cheval de Troie » pour délivrer le contenu génétique d'intérêt dans les cellules cibles.

En thérapie génique, ces virus sont dits recombinants et sont dépourvus des séquences nécessaires à leur répllication et leur virulence. Différents types de virus sont utilisés comme vecteurs viraux en thérapie génique

de la mucoviscidose : les vecteurs adénoviraux, les vecteurs AAV (Adeno-Associated Parvovirus) et les vecteurs rétroviraux.

#### 2.1.1.1.1 Vecteurs rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux utilisés communément en thérapie génique dérivent du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou de virus apparentés d'autres espèces.

Ces vecteurs présentent plusieurs avantages. Il s'agit de vecteurs intégratifs permettant une durée d'expression du transgène à long terme et de façon stable sans induire de forte réponse immunitaire de l'hôte. De plus, il est possible d'insérer dans leur génome des transgènes de grande taille (environ 8 kb). Des travaux datés de 2002, ont montré qu'il était possible d'obtenir une expression spécifique et stable du transgène en fonction d'un type cellulaire donné en utilisant les séquences régulatrices appropriées.

L'utilisation de vecteurs rétroviraux présente également des inconvénients. Les vecteurs dérivés des rétrovirus infectent uniquement des cellules en division contrairement aux vecteurs lentiviraux capables de transduire à la fois des cellules quiescentes et des cellules en division. La production de ces vecteurs est difficile (environ 10<sup>8</sup> pfu/mL). Un inconvénient majeur correspond à l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule. Bien qu'elle constitue un atout majeur pour la pérennisation et la transmission de l'information génétique cette dernière constitue un danger. En effet, l'insertion est aléatoire et peut engendrer des mutations affectant l'état physiologique du patient.

#### 2.1.1.1.2 AAV

Les virus associés à l'adénovirus (AAV) sont des virus naturellement déficients pour la réplication qui n'ont jamais été associés à une maladie chez l'Homme. Il s'agit de petit virus à ADN (parvovirus) capables de transduire des cellules quiescentes. Les AAV offrent des avantages potentiels par rapport aux adénovirus. En effet, ils s'intègrent dans le génome de la cellule et permettraient donc une expression plus longue du transgène. Ces virus sont peu immunogènes. Néanmoins, ils sont difficiles à cultiver et peuvent transporter des transgènes de petites tailles (inférieure à 4.8 kb). L'ADNc CFTR représentant quasiment la taille maximale d'insertion (4443 pb), ceci pose un problème pour le choix du promoteur.

Les AAV reconnaissent deux récepteurs cellulaires. D'une part, les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) exprimés à la membrane basolatérale des épithéliums respiratoires et d'autre part, les acides sialiques également abondants sur l'épithélium respiratoire. L'AAV de sérotype 6 s'est révélé le plus efficace dans la transduction d'épithélium respiratoire [6]. Des essais cliniques de phase I et II ont été réalisés avec différents sérotypes d'AAV [7, 8]. Aucune réponse inflammatoire et aucun phénomène de toxicité ont été mis en évidence suite à ces essais. Aucun bénéfice clinique n'a été cependant obtenu pour les patients.

#### 2.1.1.1.3 Adénovirus et vecteurs adénoviraux

Les vecteurs adénoviraux de première génération ont été les premiers vecteurs de transfert de gène utilisés dans la lutte contre la mucoviscidose [9]; [10]. Ces vecteurs présentent plusieurs avantages. Le virus apparenté, l'Adénovirus, est un virus non intégratif qui n'interfère donc pas avec l'intégrité du génome cellulaire. Il est possible d'insérer des transgènes d'une taille comprise entre 5 et 8 kpb. Ces vecteurs sont produits à haut titre et sont facilement manipulables. Leur tropisme très large leur permet d'infecter une grande diversité de cellules. Bien que décriés par la communauté scientifique, ces vecteurs sont jusqu'à présent les vecteurs les plus efficaces pour le transfert de gène dans le poumon humain. Des réactions inflammatoires et immunitaires importantes rendent cependant difficiles voire impossibles toutes ré-administrations pourtant indispensables compte tenu de la chronicité de la maladie.

Bien qu'une cinquantaine de sérotypes d'adénovirus, répartis dans sept sous-groupes, aient été identifiés, la majorité des vecteurs adénoviraux utilisés en thérapie génique sont dérivés de deux adénovirus humains de sous-groupe C, les adénovirus type 2 et 5 (Ad2 et Ad5). Cependant, leur efficacité après administration par voie intraveineuse reste limitée. La biodistribution de l'Ad5 chez l'animal ne corrèle pas directement avec l'expression du récepteur principal CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor). La toxicité induite par les vecteurs reste un obstacle important à une thérapie systémique sûre et à haute dose avec des vecteurs Ad. Plusieurs études ont examiné l'implication du facteur X de coagulation (FX) dans la détermination du tropisme et de l'immunogénicité d'Ad5 *in vivo*.

Mes travaux de thèse ont concerné le développement d'approches thérapeutiques pour le traitement de cette maladie. Mes objectifs étaient de :

- caractériser et développer un nouveau vecteur adénoviral de première génération présentant une efficacité de transduction d'épithélium respiratoire améliorée
- développer et évaluer l'efficacité de transduction de vecteurs de CFTR

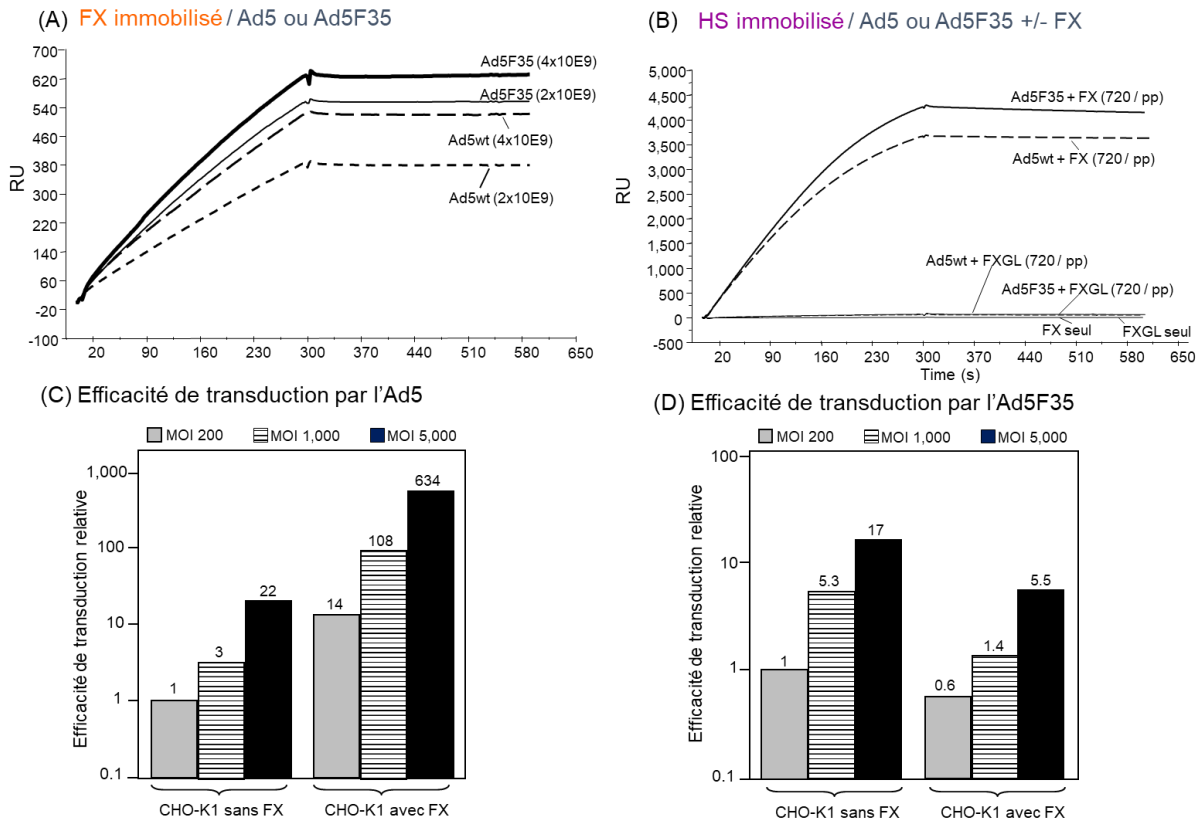
J'ai également collaboré à des travaux de recherche sur l'identification de molécules antivirales contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH) et sur le développement de stratégie vaccinale contre des flavivirus, ce qui m'a permis d'acquérir de l'expérience sur des virus très différents.

### **2.1.2 Caractérisation et développement de nouveaux vecteurs adénoviraux**

La première partie de ma thèse avait pour objectif la caractérisation et le développement d'un vecteur adénoviral présentant une efficacité de transduction d'épithélium respiratoire humain améliorée en comparaison au vecteur adénoviral de sérotype 5 (Ad5), le plus utilisé au cours des essais cliniques de la mucoviscidose.

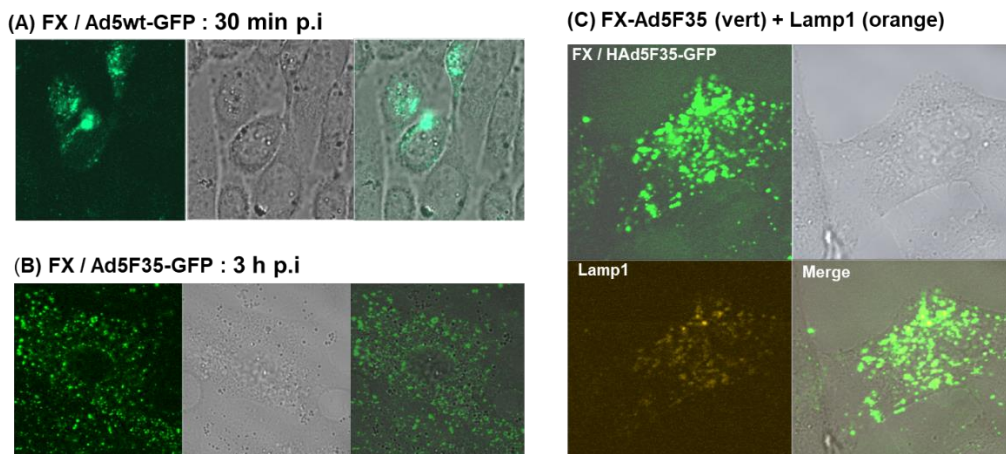
Nous disposions au laboratoire de deux vecteurs adénoviraux, le premier correspondant à l'Ad5 et le second correspondant au vecteur adénoviral chimérique exprimant la fibre du sérotype 35 sur une capsid de sérotype 5 (Ad5F35). Il est important de noter que l'Ad5 présente un tropisme naturel pour le foie et une transduction efficace des hépatocytes et cellules de Kupffer. L'injection par voie intraveineuse de vecteurs Ad5 résulte donc en une absorption majoritaire des particules virales par le foie. Ces particules ne pourront donc pas atteindre leurs cellules ou tissus cibles. Plusieurs études ont montré que l'accumulation des particules virales dans le foie était due à l'interaction entre le vecteur Ad5, via sa protéine hexon au facteur X de coagulation (FX). Le complexe Ad5-FX se fixe alors aux héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) présentes en forte proportion sur les cellules de Kupffer [11, 12]. Il a été démontré que les vecteurs du sérotype 35 ainsi que le vecteur chimérique Ad5F35 ont une transduction hépatique nettement inférieure par rapport aux vecteurs Ad5 [13]. Ces observations suggéraient l'existence de facteurs supplémentaires impliqués dans l'absorption des particules d'Ad5 par le foie. Nos objectifs étaient de déterminer le rôle des autres protéines majoritaires de capsid (la base de penton et la fibre) dans la voie d'entrée du complexe FX-Ad5 et FX-Ad5F35 ainsi que dans la transduction du transgène et de comparer l'entrée et le transit intracellulaire de l'Ad5 et l'Ad5F35 en présence ou non de facteur X de coagulation.

Nous avons tout d'abord émis l'hypothèse que l'Ad5F35 présentait une interaction diminuée au FX en comparaison à l'Ad5 pouvant expliquer son faible tropisme hépatique. La démarche expérimentale a consisté, *in vitro*, à comparer la fixation de l'Ad5 et du vecteur chimérique Ad5F35 aux héparanes sulfates en présence ou non de FX par résonance plasmonique de surface (SPR). Les deux vecteurs se fixaient cependant tous deux de façon forte au FX (Figure 1). Cette interaction était indispensable à la fixation de ces derniers aux HS. Nous avons alors comparé l'efficacité de transduction des cellules CHO-K1, cellules exprimant les HSPG mais dépourvues des récepteurs spécifiques à l'Ad5 (CAR) ou à l'Ad5F35 (CD46), par l'Ad5F35 et l'Ad5 en présence de FX. Nous avons démontré que FX augmente de façon dose-dépendante l'efficacité de transduction des cellules CHO-K1 (HSPG +) par l'Ad5 mais qu'aucune amélioration de l'efficacité de transduction des cellules est obtenue avec l'Ad5F35 en présence de FX. Ce résultat se révéla paradoxal. En effet, les vecteurs Ad5wt et Ad5F35 possèdent les mêmes protéines d'hexon (de sérotype 5) et se fixent au FX. Le complexe FX-Ad5F35 interagit avec les HSPG avec une meilleure affinité que l'Ad5.



**Figure 1 :** La fixation de l'Ad5F35 au FX via sa protéine hexon n'est pas impliquée dans la transduction cellulaire. Analyse par résonance plasmonique de surface (SPR) de la fixation du vecteur chimérique Ad5F35 et de l'Ad5 à la surface de FX immobilisé (A) et d'HS immobilisés (B) en présence de FX. Comparaison de l'efficacité de transduction et du niveau d'expression du transgène GFP entre les vecteurs adénoviraux Ad5 (C), Ad5F35 (D) à différentes MOI (200, 1000, et 5000) en présence ou non de FX.

Nous avons alors décortiqué les différentes étapes du cycle de réplication des deux vecteurs et avons mis en évidence que le trafic intracellulaire de l'Ad5F35-FX est altéré avec une accumulation des particules dans le compartiment endosomal tardif entraînant un retard du transport de l'Ad5F35 au noyau, les particules étant éliminées par exocytose (Figure 2). La protéine fibre 35 s'est révélée déterminante dans l'internalisation et le transit intracellulaire du vecteur chimérique. Nous avons ainsi pu conclure que la fibre est la protéine de capsidie majoritairement impliquée dans l'internalisation et le transit intracellulaire de l'Ad5F35 en dépit de la forte interaction entre le FX et la protéine hexon [14]. Le vecteur Ad5F35 a été sélectionné pour la suite de ma thèse afin de développer un vecteur adénoviral capable de transduire les épithéliums respiratoires par le pôle apical.





**Figure 2:** Transduction de cellules CHO-K1 par l'Ad5 (A) et l'Ad5F35 (B, C) en présence ou non de FX. L'observation a été réalisée respectivement 30 min post-infection (A) et 3h post-infection (B, C). Les cellules CHO-K1 ont été transduites avec un vecteur baculoviral exprimant le marqueur des endosomes tardifs, lamp1 couplé à la rhodamine (C, signal orange, 24 heures avant l'infection adénovirale). Les vecteurs adénoviraux sont marqués à l'Alexa 488.

### 2.1.3 Développement et évaluation de l'efficacité de vecteurs de CFTR

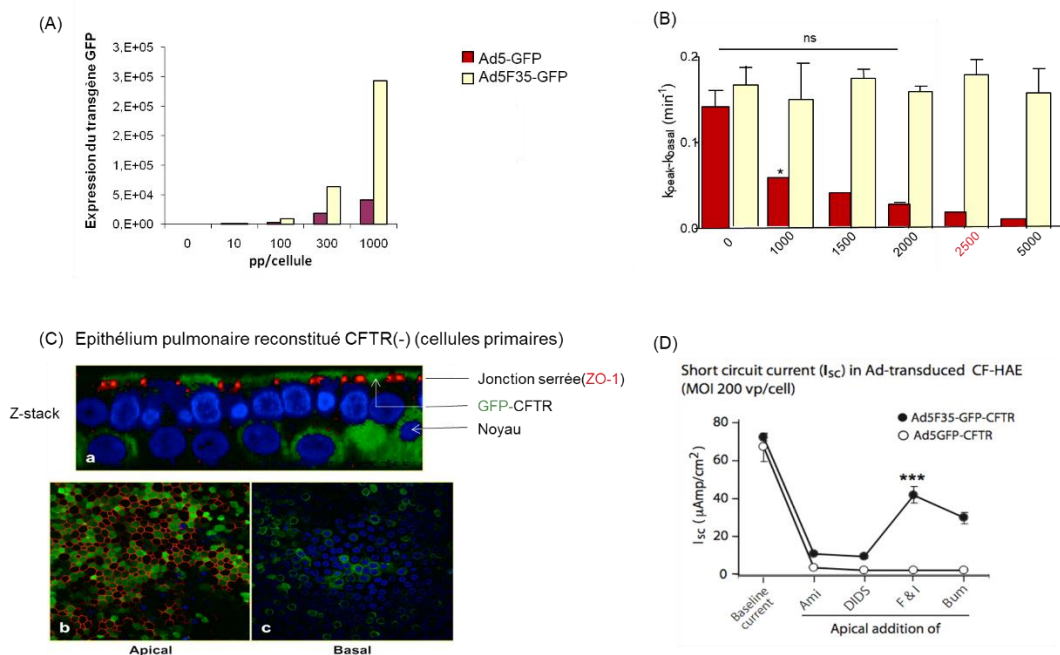
Dans les deux autres chapitres de ma thèse, j'ai testé et évalué l'efficacité de deux approches différentes de transfert du gène *cftr*, de son ARNm et/ou de protéine CFTR à l'aide respectivement de vecteurs adénoviraux et de vésicules extracellulaires (ARNm ou protéines CFTR). Notre objectif était double. Nous souhaitions proposer un vecteur adénoviral capable de transduire les épithéliums respiratoires par le pôle apical et proposer une stratégie alternative à l'utilisation de vecteurs viraux ou synthétiques : l'utilisation de vésicules extracellulaires dérivées de membranes cellulaires sécrétées dans le milieu extracellulaire.

#### 2.1.3.1 Le vecteur Ad5F35 comme vecteur prometteur en thérapie génique de la mucoviscidose

Cette partie de ma thèse a été réalisée à l'aide de la protéine CFTR exprimant en N-terminal la protéine fluorescente GFP. L'objectif principal était de caractériser et comparer les vecteurs Ad5-GFP-CFTR et Ad5F35-GFP-CFTR en termes d'efficacité de transduction et de restauration de l'activité canal à ions chlorures du CFTR au sein d'épithéliums pulmonaires reconstitués au vu des résultats obtenus en 2.1.2. De plus, un phénomène de toxicité cellulaire, caractérisé par l'inhibition de l'activité canal à chlorure du CFTR, après transduction à hautes doses virales d'Ad5-GFP-CFTR sur les lignées cellulaires pulmonaires avait été mis en évidence précédemment au laboratoire [15].

Notre démarche expérimentale a été, tout d'abord, de déterminer la cause de cet effet négatif sur l'activité canal à chlorure du CFTR puis nous avons adapté le vecteur chimérique Ad5F35-GFP développé au laboratoire dans l'optique d'une application en thérapie génique de la mucoviscidose.

Le vecteur Ad5/F35 exprimant la protéine de fusion GFP-CFTR s'est révélé (i) être dépourvu de cytotoxicité, (ii) transduire efficacement les cellules épithéliales pulmonaires par voie apicale, et (iii) restaurer l'activité de canal à chlorures dans les cellules CFTR (-) (Figure 4). Il constitue donc un vecteur de transfert du gène CFTR potentiellement utilisable en thérapie génique de la mucoviscidose [15].



**Figure 4 :** Le vecteur Ad5F35-GFP-CFTR transduit efficacement la lignée cellulaire CF-KM4 (A) et les épithéliums reconstitués de patients atteints de mucoviscidose via le pôle apical (C). Une restauration de l'activité CFTR a été obtenue sur les deux modèles cellulaires *in vitro* (B, D). Les CF-HAE ont été transduits par le pôle apical, avec l'Ad5F35-GFP-CFTR à MOI 200 (C) puis fixés et observés 3 jours après l'infection. Des coupes en x-y montrent le pôle apical des cellules (b) et des coupes en x-z ont

été réalisées dans les préparations (a). Les protéines GFP-CFTR sont détectables par leur signal de fluorescence vert, les noyaux ont été marqués au DAPI et les jonctions serrées apicales ont été marquées par un anticorps anti-ZO-1 révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 568. L'activité CFTR a été évaluée par test de mesure du courant transépithélial dû au transport d'ions chlorures en chambre d'Ussing à 72h post-infection. Les épithéliums ont été transduits avec l'Ad5F35-GFP-CFTR à une dose virale de 200 pp/cellule. (D) Représentation schématique des résultats de test d'efflux d'iode obtenu après transduction de 3 CF-HAE par l'Ad5F35-GFP-CFTR. (\*\*\*)  $P < 0,001$

#### 2.1.3.2 Trogocytose de microvésicules membranaires comme stratégie alternative aux vecteurs viraux

Dans ce dernier chapitre, nous avons exploré une stratégie alternative de transfert de la protéine CFTR par trogocytose. Nous avons émis l'hypothèse que le canal CFTR pouvait être véhiculé par des microvésicules ou microparticules membranaires (MP) émanant de la membrane cellulaire et libérées dans le milieu de culture. Ces vésicules extracellulaires (VE) suscitent un intérêt croissant lié à leur capacité à transférer du contenu biologique entre cellules. Les VE, émises dans l'espace extracellulaire, circulent via les différents fluides de l'organisme et modulent localement ou à distance les réponses des cellules avec lesquelles elles ont interagi. Les VE bousculent la vision traditionnelle de la communication intercellulaire et représentent ainsi un mode de communication alternatif et versatile, qui ouvre la porte à de nouveaux concepts et opportunités tant biologiques que thérapeutiques [16]. En utilisant un système d'expression stable de la protéine CFTR étiquetée par la protéine fluorescente GFP (GFP-CFTR) dans des cellules donneuses, nous avons pu démontrer que les MP sont capables de prendre en charge et délivrer la protéine GFP-CFTR à des cellules réceptrices. Mais ce transfert n'est assuré que par une population réduite de MP ( $\leq 8\%$ ), et la durée de vie du GFP-CFTR n'est que transitoire ( $\leq 24$ h). En fait, la majorité des MP transfèrent des molécules d'ARN messager ou polysomal GFP-CFTR. La protéine GFP-CFTR néosynthétisée à partir de ces ARNm est exprimée plus tardivement ( $> 48$ h) mais de façon prolongée ( $\geq 10$  jours). Les MP constituent donc un nouveau type de vecteurs de transfert non génique du CFTR qui pourraient être employés en thérapie de la mucoviscidose [17].

#### 2.1.4 Identification de molécules antivirales contre le VIH

Au cours de mon doctorat, j'ai également eu l'opportunité de m'impliquer dans différents projets de recherche. Un premier projet de recherche portait sur l'identification de molécules antivirales efficaces contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Il a été mené sous l'encadrement d'une étudiante en thèse de l'équipe, Dr Sandrine Da Fonseca. Le caractère mutagène du VIH-1 responsable des résistances aux antiviraux, demande un développement régulier de molécules antivirales. Une nouvelle classe de molécules inhibitrices a été découverte : les inhibiteurs de maturation. Le composé 'lead' de ces nouveaux antiviraux est le DSB (3-O-(3', 3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid ou Bevirimat<sup>TM</sup>). Le DSB empêche le dernier clivage effectué à la jonction CA-SP1 par la protéase virale sur le précurseur polyprotéique Pr55Gag empêchant ainsi la maturation des virions après leur bourgeonnement et relargage. L'objectif de la thèse était de caractériser le mode de fonctionnement du DSB en dehors de son effet sur le processus de maturation de Gag par la protéase virale. Mon travail s'est inscrit dans la caractérisation de l'inhibiteur PA-457 de l'assemblage des protéines Gag et Vpr du VIH-1 à l'aide du système VLP (Virus like particule). Nous avons démontré que le dérivé ethylo-diaminé du composé PA-457 présente un nouvel effet antiviral caractérisé par un assemblage aberrant des VLP. Cet inhibiteur favorise la formation et la persistance de trimères du précurseur de la protéine Gag, Pr55Gag empêchant ainsi un assemblage correct des particules VLP. Notre étude a démontré le rôle primordial de la chaîne secondaire de l'acide bétulinique situé en position 28 du composé. Nos résultats ont montré que le DSB s'associe au substrat Gag et a un effet délétère sur son auto-assemblage. Sa cible sur la jonction CA-SP1 en fait un excellent modèle pour la génération d'une famille de nouvelles molécules anti-HIV basées sur l'interaction directe Gag-DSB [18].

#### 2.1.5 Développement d'un vecteur vaccinal contre les flavivirus

J'ai été également associé à un second projet de recherche sur le développement d'une nouvelle stratégie vaccinale de pseudotypage de VLP contre les flavivirus (ré)émergents West Nile et Dengue.

Les virus West Nile et Dengue appartiennent à la famille *Flaviviridae*, genre *Flavivirus* qui regroupent de nombreux agents pathogènes d'importance en santé humaine et animale transmis par des arthropodes (moustiques, tiques, etc.). Ces dernières années, ils ont été responsables de certaines des épidémies modernes les plus notoires. Nous avons également assisté à une expansion de leur distribution géographique. La



vaccination est l'une des stratégies les plus efficaces pour lutter contre les infections à flavivirus. Il est essentiel de mettre au point des vaccins efficaces, peu-couteux, dont la production est facile et rentable pour une utilisation à grande échelle. Les vaccins à base de pseudo-particules virales (VLP) peuvent répondre à ces critères. En effet, ils induisent des réponses immunitaires efficaces, et peuvent être facilement fabriqués avec un bon rapport coût-qualité à grande échelle [19].

Parmi les déterminants viraux essentiels à l'infection par les flavivirus, la protéine d'enveloppe E est la protéine la plus antigénique. Elle induit chez l'hôte la production d'anticorps dirigés contre chacun de ses trois domaines (DI, DII et DIII) et principalement contre les DII et DIII. Alors que le DII est bien conservé au sein des flavivirus, le DIII présente une séquence spécifique pour chaque flavivirus et induit des anticorps fortement neutralisants qui pourraient être utilisés dans le développement de VLP.

Les VLP sont dépourvues de matériel génétique et présentent des structures multi-protéiques imitant les virions natifs. Elles ont la capacité de susciter de fortes réponses immunitaires humorales et cellulaires, ainsi qu'une protection, servant ainsi d'excellentes plateformes pour le développement de vaccins efficaces.

Notre objectif était de développer une plateforme vaccinale contre WNV et DENV par pseudotypage de VLP dont la technologie serait applicable à divers agents pathogènes viraux et microbiens.

Nous disposions de la technologie permettant de produire des VLP rétrovirales à base de protéines du rétrovirus VIH-1. Il s'agit de particules à enveloppe membranaire constituées d'un squelette de polyprotéine virale Gag (ou précurseur de Gag ; Pr), enveloppé d'une enveloppe dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte. Le précurseur Gag du VIH-1 (Pr55Gag) s'assemble spontanément en VLP, qui bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique des cellules d'insecte exprimant Gag. Ces structures non infectieuses sont similaires aux virions immatures.

Nous disposions également de la glycoprotéine membranaire humaine chimérique CD16-RlgE. La molécule de surface CD16 est un récepteur au fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) et le RlgE correspond à la chaîne polypeptidique gamma du récepteur IgE-Fc de haute affinité. La coexpression de CD16-RlgE et du précurseur polyprotéique Pr55Gag du VIH-1 (Pr55GagHIV) dans des cellules d'insecte a entraîné l'incorporation de la glycoprotéine CD16-RlgE dans l'enveloppe des VLP, un phénomène connu sous le nom de pseudotypage.

Tirant parti de cette propriété, nous avons remplacé l'ectodomaine CD16 de CD16-RlgE par le domaine III (DIII) de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la dengue de sérotype 1 (DENV1) ou du virus West Nile Kunjin (WNV Kun). Les deux protéines chimériques résultantes, DIII-DENV1-RlgE et DIII-WNVKun-RlgE, ont été adressées à la membrane plasmique, exposées à la surface de cellules humaines et d'insectes, et incorporées dans des VLP extracellulaires lorsqu'elles ont été coexprimées avec Pr55GagHIV dans des cellules d'insectes. Ces VLP pseudotypées par le DIII de WNV et DENV1 ont induit une faible réponse immunitaire neutralisante chez la souris. Cette étude a démontré que la plateforme de VLP rétrovirale basée sur la protéine chimérique CD16-RlgE pourrait être développée comme vecteur vaccinal contre différents flavivirus et autres pathogènes viraux [20, 21].

### 2.1.6 Conclusion

Au cours de mon doctorat, j'ai pu apprécier et développer l'utilisation de vecteurs viraux comme agents de thérapie génique. J'ai également été initiée à la recherche fondamentale et à l'utilisation de méthodes alternatives pour le transfert de matériel génétique (ARNm, protéines) qui s'avèrent être un moyen efficace pour le partage d'informations entre cellules au sein d'un même organisme ou entre des organismes différents suite à l'isolement de ces vésicules externes. J'ai contribué à la parution de 8 articles scientifiques parmi lesquels je suis première auteur pour cinq d'entre eux.

Depuis, une thèse a été menée à bien sur le transfert du CFTR sur cellules humaines. Le modèle que j'ai mis au point sur cellules d'hamster a été utilisé brillamment sur lignée cellulaire de poumon A549 et sur cellules humaines dépourvues du CFTR [22]. L'équipe dirigée par Pierre Boulanger et Saw-See Hong s'est par la suite concentrée sur la recherche de molécules antivirales efficaces contre le VIH et l'étude de leurs mécanismes.

Pour ma part, après m'être focalisée sur le développement de méthodes thérapeutiques pour lutter contre les infections virales, j'ai souhaité mieux comprendre les virus eux-mêmes et travailler dans une équipe caractérisant les interactions hôte-virus, l'évolution de ces virus et leur adaptation à un nouvel hôte pouvant conduire à une émergence ou réémergence. Afin de parfaire mon anglais et de découvrir le fonctionnement du monde de la recherche dans un autre pays européen, j'ai opté pour un post-doctorat dans un centre de recherche renommé, au Royaume-Uni, en Ecosse.

## 2.2 Expérience postdoctorale

### 2.2.1 Post-doctorat sur l'émergence et l'adaptation virale (2012-2016)

#### 2.2.1.1 Contexte

Lors d'un post-doctorat à Glasgow (Royaume-Uni), au « Centre for Virus Research » au sein du groupe de recherche nouvellement établi, du Pr Pablo Murcia, j'ai étudié les mécanismes moléculaires et évolutifs sous-tendant le changement d'hôte et l'émergence virale des virus Influenza A.

Le franchissement de la barrière d'espèces est au centre du concept d'émergence d'agents infectieux. Cette étape incontournable pour tout virus s'établit sur quatre niveaux [23, 24]:

- l'exposition plus ou moins intense du nouvel hôte receveur au virus directement ou à l'hôte réservoir donneur. Celui-ci est déterminé par la distribution et l'écologie des hôtes donneurs et receveurs et la voie de transmission de l'agent pathogène.
- l'infection de l'hôte receveur initial conditionnée par le franchissement des barrières de l'hôte au niveau de l'organisme et de la cellule.
- la multiplication virale au niveau des tissus cibles et le contournement des mécanismes de défenses immunitaires innées et spécifiques de l'hôte.
- l'adaptation virale permettant une propagation efficace du virus au sein de la population du nouvel hôte.

Chacune de ces étapes requiert des interactions intimes entre des protéines virales et des protéines de l'hôte permettant l'adaptation requise pour permettre le franchissement de l'étape considérée.

Les virus Influenza A (IAV) évoluent en permanence en raison d'un taux de mutations élevées et du réassortiment des segments génétiques. Ils donnent parfois naissance à de nouveaux variants à l'origine de pandémies et d'épizooties conséquentes avec des niveaux de morbidité et de mortalité importants. Au cours du siècle dernier, un certain nombre de virus ont émergé chez l'Homme et d'autres hôtes mammifères suite au transfert de virus complets ou de segments de gènes viraux zoonotiques. Actuellement, il est difficile d'une part, de prévoir et anticiper l'émergence de nouveaux virus IAV présentant un potentiel pandémique et d'autre part d'identifier les espèces animales qui contribueront à l'apparition de ces variants.

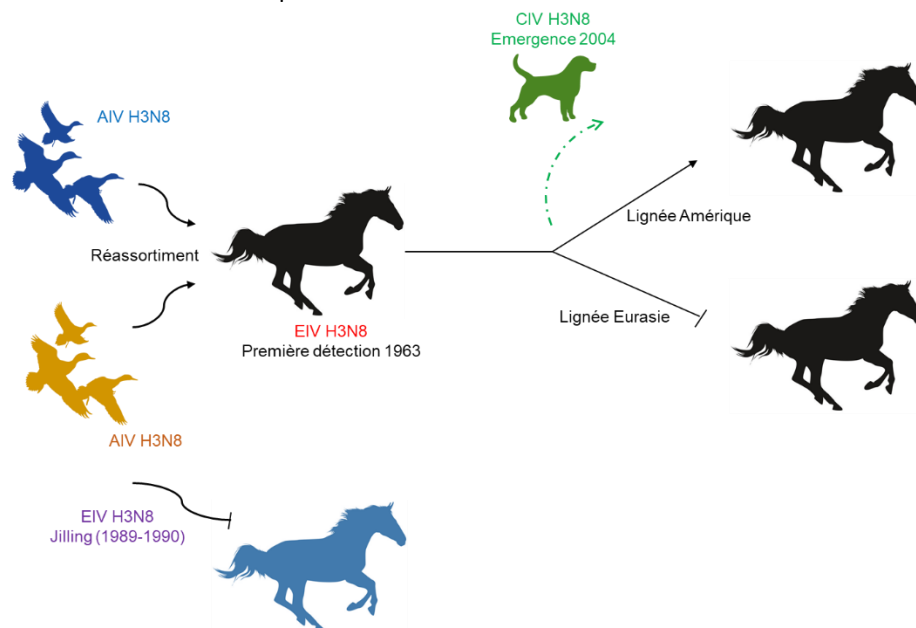
Une illustration de cette problématique est le virus pandémique H1N1 de 2009 (H1N1pdm09) qui a émergé chez le porc après une série de réassortiments complexes entre des virus de la grippe porcine porteurs de segments génétiques d'origine humaine, aviaire et porcine [25]. Le virus H1N1pdm09 a également modifié la notion selon laquelle une souche pandémique devait être d'un sous-type différent de celles qui circulent chez l'Homme. Le virus H1N1pdm09 était différent sur le plan antigénique et a ainsi échappé à la réponse immunitaire initiée par les virus H1N1 saisonniers précédemment en circulation. Sur la base de cette observation, les futures souches de virus IAV pandémiques pourraient donc être de sous-types différents ou identiques à ceux qui circulent chez l'Homme. Le fait qu'aucun virus de la grippe humaine n'ait été identifié avant son émergence souligne la nécessité de trouver de nouvelles approches pour prévoir, prévenir et/ou contenir la propagation de nouveaux virus à potentiel pandémique.

Le changement d'hôtes des virus IAVs est un mécanisme complexe qui implique des événements de transmission uni ou bidirectionnels. Les virus IAVs contiennent huit brins d'ARN négatifs codant pour huit protéines structurales et deux protéines non structurales. Ils sont divisés en sous-types sur la base de différences sérologiques et génétiques existant respectivement entre les protéines de surface et les gènes correspondants. Jusqu'à ce jour, quinze sous-types d'Hémagglutinines (HA) et neuf sous-groupes de Neuraminidases (NA) ont été identifiés. Chez les oiseaux aquatiques, toutes les combinaisons possibles de sous-type HA et de sous-groupe NA ont été observées. Le spectre d'hôtes de ces virus peut varier, ce qui peut ou non être associé à des événements de réassortiment. Cela peut être illustré par les infections humaines qui suggèrent une extension des gammes d'hôtes des virus H5N1 [26], H9N2 [27], H7N9 [28] et H10N8 [29] en Asie du Sud-Est ; l'émergence de virus Influenza porcins portant des segments de gènes provenant de souches de virus grippaux humains [25] (et vice versa) ; et l'émergence chez les équidés du virus H3N8, qui après plus de 40 années de circulation dans la population équine a émergé et s'est établi dans la population canine [30].

Les mécanismes de franchissement de barrière d'espèces et de sensibilité différentielles des hôtes à l'infection par les virus Influenza sont peu connus. La réponse immunitaire innée, la répartition des isoformes d'acides

sialiques  $\alpha 2,3$  ou  $\alpha 2,6$  (récepteurs d'entrée de la majorité des virus sur les cellules du tractus respiratoire) et les spécificités d'hôte des polyméras ont été identifiés comme facteurs modulant la pathogénicité des virus.

Au cours de ce post-doctorat, je me suis particulièrement intéressée au virus influenza équin (EIV) H3N8. Ces virus, originaires de l'avifaune aquatique, ont émergé dans la population équine dans les années 1960 et ont accumulé un certain nombre de mutations ponctuelles améliorant leur adaptation au tractus respiratoire canin avant d'émerger et s'établir chez le chien en 2004 (Figure 5). Ce modèle m'a offert une occasion unique d'étudier les déterminants moléculaires viraux responsables de ce franchissement de barrière d'espèces, de caractériser la dynamique d'infection des virus EIVs au tractus respiratoire canin et de mettre en lumière les mutations clés responsables de ce saut de barrière d'espèces.



**Figure 5 :** Chronologie de l'évolution des virus influenza équins (EIVs) depuis la première détection du virus en 1963 à Miami (Etats-Unis). EIV H3N8 s'est établi dans la population canine en 2004 et circule actuellement.

### 2.2.1.2 Caractérisation de l'adaptation des virus EIVs sur explants de trachée

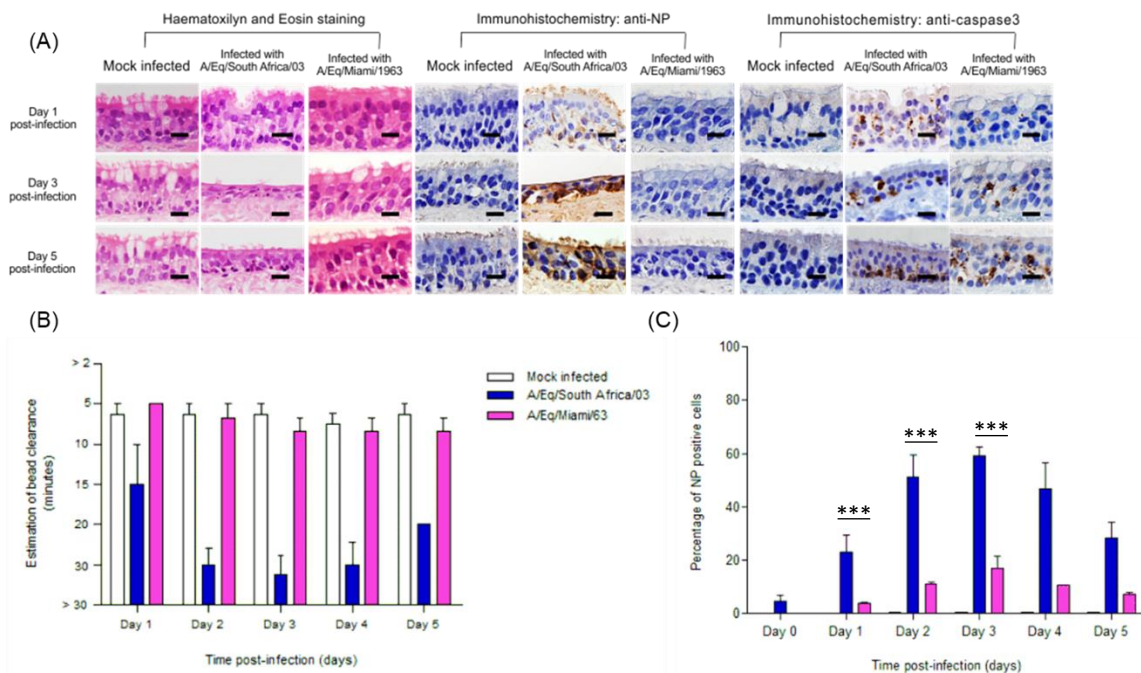
Afin d'élucider les mécanismes qui contrôlent le spectre d'hôtes, le tropisme et la virulence des virus IAVs, il était indispensable de caractériser la dynamique d'infection des cellules du tractus respiratoire par ces virus. Nous avons émis l'hypothèse que les virus équins se sont adaptés au fil des années au tractus respiratoire canin avant de pouvoir s'établir de façon permanente dans la population canine. Afin de répondre à cette hypothèse, j'ai tout d'abord développé un système de culture *ex-vivo* d'explants de trachées de chien de race Beagle en interface air liquide (Figure 6).



**Figure 6 :** Développement du modèle *ex-vivo* d'explants de trachées de chien (Beagle). Les trachées ont été collectées quelques minutes après euthanasie de l'animal et immergées dans du milieu de culture DMEM maintenu à une température de 30°C minimum. Après six lavages successifs dans ces mêmes conditions, le tissu fibreux recouvrant la trachée est éliminé. La trachée est alors ouverte et découpée en carré de 1cm x 1cm suivant les anneaux cartilages à l'aide d'un scalpel à usage unique en veillant à humidifier régulièrement l'épithélium la constituant. Les anneaux sont disposés un à un sur un papier filtre en haut d'un plug d'agarose 1% immergé dans du milieu de culture DMEM.

Ce modèle pertinent nous a permis d'étudier la dynamique d'infection des cellules superficielles du tractus respiratoire par EIVs et CIVs au plus proche de l'infection *in vivo*. En effet, la morphologie et la structure

tridimensionnelle de cet organe sont conservées ce qui permet d'étudier les interactions virus-hôte. Les explants peuvent être maintenus en culture pendant 7 jours. La viabilité de ces derniers était évaluée quotidiennement par contrôle des battements ciliaires au pôle apical. Après 24h de culture, ils ont été infectés par différents EIVs et CIVs. Des études histologiques (observations microscopiques des dommages dus à l'infection, identification des cellules cibles de l'infection par immunomarquage et apoptose) et virologiques (étude de la réplication virale) ont été par la suite menées afin de comparer la dynamique d'infection du tractus respiratoire canin par les virus EIVs isolés en 1963 et 2003 à celle du virus CIV isolé en 2008. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un profil d'infection atténué des explants de trachées par les virus EIVs isolés en 1963 en comparaison aux résultats obtenus par le virus EIV isolé en 2003 présentant un phénotype d'infection similaire à celui du virus CIV [31](Figure 7).

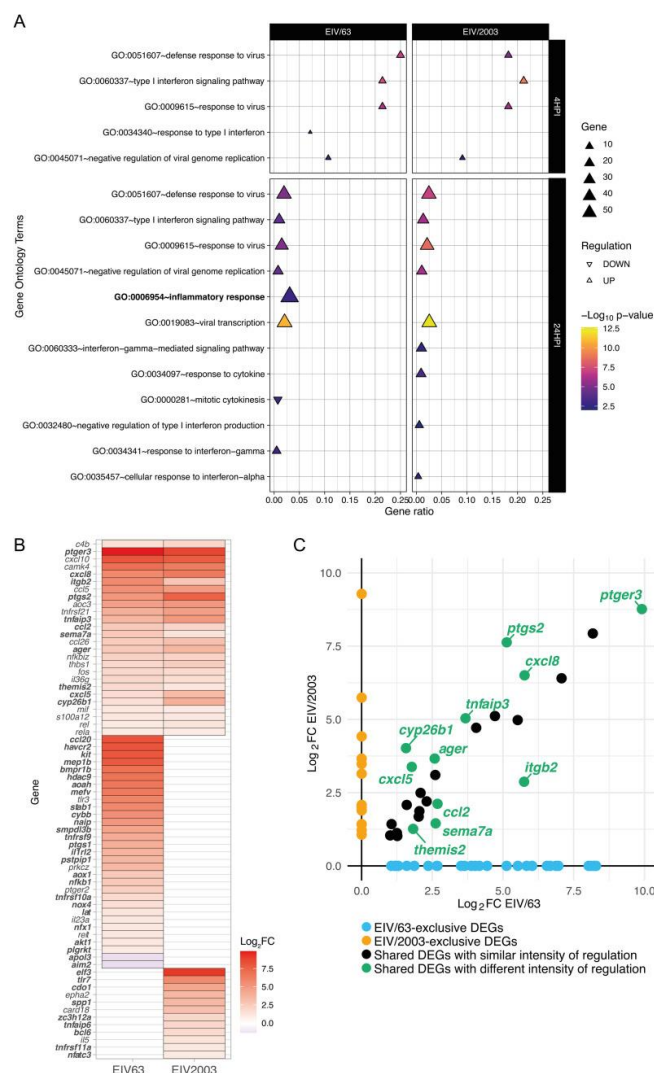


**Figure 7 :** L'infection du tractus respiratoire canin par le premier virus Influenza équin (EIV) isolé en 1963 (A/eq/Miami/63) présente un phénotype d'infection atténué par rapport au virus EIV isolé en 2003 (A/eq/South Africa/03). (A) Caractéristiques histologiques de trachées de chiens infectées par A/equine/South Africa/2003 (EIV/03) et A/equine/Miami/1963 (EIV/Miami/63) et de témoins non infectés à 1, 3 et 5 jours post-infection. Les lésions sont représentées dans des sections colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les cellules infectées ont été détectées par coloration immunohistochimique de la protéine virale NP. Les cellules positives sont colorées en brun. Les cellules apoptotiques ont été détectées par coloration immunohistochimique de la caspase 3. Les cellules positives sont colorées en brun. Les barres horizontales noires représentent 50 µm. (B) Représentation graphique des résultats des essais de clairance des billes dans les explants infectés et témoins. Les barres verticales représentent les temps moyens (± SEM) pour éliminer les billes dans trois expériences indépendantes. (C) La souche précoce présente une efficacité de réplication plus faible que EIV/03. Cinétique de croissance de EIV/03 et EIV/Miami/63 dans des explants trachéaux. Les barres verticales représentent les titres moyens (± SEM) de trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les virus testés sont indiquées par des astérisques (\*\*\*, P < 0,001).

### 2.2.1.3 Analyse transcriptomique de la réponse de l'hôte équin à l'infection par différents EIVs

Dans le but de comprendre comment les virus IAVs évoluent pour maximiser leur capacité d'adaptation à un nouvel hôte, il est indispensable de combiner des approches expérimentales et évolutives reliant le génotype de l'agent pathogène au phénotype de l'infection. Le phénotype de l'infection est influencé par l'hôte lui-même, la capacité répliquative du virus dans les tissus cibles, sa pathogénicité et sa transmission. Le développement de technologies de séquençage haut-débit associées aux analyses phylogénétiques ont généré un vaste ensemble de connaissances sur l'évolution génomique des virus et leur impact sur l'émergence virale [32]. Cependant, le rôle de l'évolution sur les interactions virus-hôte et comment celle-ci participe à l'établissement de nouveaux virus endémiques n'est pas entièrement élucidée. Les virus EIVs H3N8 constitue un modèle idéal pour étudier l'adaptation à long terme d'un virus Influenza d'origine aviaire responsable d'une épidémie chez les chevaux depuis près de 60 ans [33, 34]. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'impact de l'adaptation à long

terme sur l'aptitude du virus à se multiplier et infecter un nouvel hôte. Nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation de mutations dans l'ensemble du génome des EIV H3N8, conséquence de l'évolution continue chez les chevaux, a entraîné des changements dans les interactions virus-hôte qui auraient un impact sur la pathobiologie du virus. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons combiné des techniques de virologie classique, de transcriptomique et d'analyses d'images pour quantifier et comparer les phénotypes d'infection *in vitro* et *ex vivo* de deux virus EIVs : A/equine/Uruguay/63 (EIV/63) et A/equine/Ohio/2003 (EIV/2003). Les virus sélectionnés représentent respectivement le virus le plus anciennement isolé et un virus contemporain de cette lignée monophylétique d'origine aviaire, séparés par 40 ans d'évolution continue chez un hôte mammifère. Nous avons montré que EIV/2003 présente une résistance accrue à l'interféron, une réplication virale renforcée et une propagation intercellulaire plus efficace dans les cellules et les tissus. Les analyses transcriptomiques ont révélé des réponses spécifiques à chaque virus, affectant principalement l'immunité et l'inflammation de l'hôte (Figure 8). Des analyses d'images d'explants respiratoires équins infectés ont révélé qu'en dépit d'une réplication plus importante et d'une propagation sur de plus grandes surfaces de l'épithélium respiratoire, le virus EIV/2003 a induit des lésions plus modérées que le virus EIV/63, ce qui suggère que l'adaptation a conduit à une pathogénicité tissulaire réduite. Nos résultats révèlent des liens jusqu'alors inconnus entre le génotype du virus et la réponse de l'hôte à l'infection, permettant de mieux comprendre la relation entre l'évolution du virus et sa capacité d'adaptation [35].



**Figure 8** : Comparaison des termes gene ontology (GO) associés à la réponse de l'hôte à l'infection dans les cellules de dermes équins infectées par EIV/63 ou EIV/2003. Ceux surexprimés sont représentés par des triangles alors que ceux sous exprimés sont représentés par des triangles inversés. La taille de chaque triangle représente le nombre de DEG correspondant à chaque GO terme, tandis que le ratio du total des gènes impliqués dans chaque catégorie est affiché sur l'axe des abscisses. Les triangles sont colorés selon un gradient bleu-magenta-jaune représentant la signification de l'enrichissement (-Log<sub>10</sub> p-value). Les termes GO associés à l'inflammation sont indiqués en gras. (B) L'intensité de la régulation à 24 hpi des DEG significatifs impliqués dans la réponse inflammatoire *GO:0006954* est présentée dans une carte thermique, suivant une

échelle de couleurs bleu-blanc-rouge. La sous-régulation est mise en évidence par des nuances de bleu, tandis que la surrégulation utilise des nuances de rouge. Les DEG significatifs parmi les infectomes sont indiqués par des noms en gras. (C) Comparaison par paires de l'intensité de la régulation (Log2FC) et de la distribution des DEG impliqués dans *GO:0006954 Réponse inflammatoire* à 24 hpi. Les DEGs uniquement associés à EIV/63 ou EIV/2003 sont affichés en cyan, ou en orange, respectivement, tandis que les DEGs communs sont colorés en noir (non significatif) ou émeraude (significatif). Les données présentées ici résument trois expériences indépendantes.

#### 2.2.1.4 *Evaluation du risque zoonotique par génétique inverse*

En parallèles de ces travaux, j'ai également développé différents systèmes de génétique inverse : virus équins A(H3N8), virus humains A(H1N1), virus canin A(H3N8). Leurs capacités répliquatives ont été évaluées par cinétiques d'infection sur cellules MDCK avec quantification du génome total par RT-qPCR temps réel et de l'infectiosité des particules virales par TCID50. Nous avons alors caractérisé la dynamique d'infection des explants par ces virus reconstitués ainsi que par les virus chimériques A/canine/New York/23/2009 portant les segments HA et NA du virus ma-Ca/04/09 (H1N1, mouse-adapted, A/California/04/2009) et inversement (ma-Ca/04/09 portant les segments HA et NA de CIV A/canine/New York/23/2009).

Nous avons ainsi démontré que le système respiratoire superficielle du chien est permissif et sensible à l'infection par des virus CIV présentant les glycoprotéines d'enveloppe HA et NA du virus influenza humain. Nous avons également montré que de nombreux virus humains peuvent infecter les trachées des chiens et que le réassortiment avec CIV donne naissance à des virus viables.

Au cours de cette première étude, nous avons commencé à élucider les schémas d'infection des virus Influenza de type A qui circulent chez les chiens ou auxquels les chiens sont couramment exposés. Nous avons montré que l'émergence des CIV était probablement due à un moteur adaptatif, car ces virus distincts sur le plan évolutif présentent des phénotypes d'infection distincts. Enfin, nous avons montré que l'hémagglutinine et la neuraminidase des virus Influenza canins agissent comme des facteurs de virulence. L'espèce canine pourrait donc être considérée comme un réservoir de virus à potentiel pandémique et épizootique [31].

L'alignement des isolats de IAV/H3N8 prélevés sur des chiens a montré que tous les segments contenaient des mutations spécifiques du CIV qui n'ont pas été observées chez les virus équins ou qui ne l'ont été qu'à des fréquences très faibles. Le segment HA présentait le plus grand nombre de mutations, tandis que M1 en présentait le moins. L'analyse phylogénétique de 400 séquences HA de EIV et CIV a clairement montré que les séquences CIV formaient un seul groupe monophylétique distinct de EIV. Nous avons émis l'hypothèse que ces mutations joueraient un rôle dans le changement d'hôte et l'adaptation des virus.

Nous avons examiné les séquences protéiques de toutes les séquences CIV disponibles déposées dans GenBank (NCBI) et avons généré des virus chimériques EIV (A/equine/NY/61191/2003) avec CIV HA et NA et le virus réciproque, CIV (A/canine/NY/dog23/2009) avec EIV HA et NA. La dynamique d'infection de plusieurs lignées cellulaires ainsi que d'explants de trachées canines et équines par les virus parentaux et chimériques ont été réalisées. EIV et CIV ainsi que les virus chimériques n'ont pas montré de différences d'infectiosité des différentes lignées cellulaires testées et des explants. Les virus EIV ont cependant engendré plus de dommages macroscopiques à l'épithélium des trachées équines que CIVs. Cette étude a démontré que malgré les 6 années d'évolution continue chez le chien qui séparent les deux virus testés dans cette étude, et l'accumulation de mutations dans tous les segments génomiques de telle sorte que EIV et CIV sont clairement distincts sur le plan phylogénétique, les différences biologiques entre eux semblaient minimales [36].

En étudiant la pathogenèse des virus de la grippe canine, équine et humaine dans les voies respiratoires du chien, nous avons obtenu des informations importantes sur le rôle de l'évolution dans l'émergence virale. Bien que EIV ait circulé dans de nombreuses régions du monde depuis son apparition en 1963, CIV ne s'est pas propagé de manière durable au-delà de l'Amérique du Nord, où il s'est maintenu principalement dans les grands refuges pour animaux. L'émergence des virus de la grippe canine H3N8 et H3N2 a modifié l'écologie des virus Influenza, entraînant une exposition accrue de l'Homme à des virus déjà adaptés aux mammifères.

#### 2.2.1.5 *Epidémiologie de la grippe aviaire chez les équidés*

Pour mieux comprendre comment les IAVs circulent dans la nature, nous avons séquencé plus de vingt virus de la grippe aviaire collectés d'oiseaux sauvages en Mongolie. Nous avons montré que ces virus sont partiellement apparentés à un virus qui a causé une épizootie de grippe équine en 1989, qu'ils peuvent infecter et se répliquer dans les voies respiratoires du cheval sans provoquer de lésions tissulaires, et que, sur la base de preuves



sérologiques, les chevaux de Mongolie ont été régulièrement exposés à ces virus dans une large zone géographique sans provoquer d'épidémies cliniquement évidentes [37]. Nous avons conclu que les infections équine par des virus aviaires capables de se répliquer chez le cheval sont plus fréquentes qu'on ne le pensait à l'origine et que l'incapacité à acquérir des changements génétiques clés est dans ce cas le principal obstacle à l'émergence de la maladie.

#### 2.2.1.6 Conclusion

Au cours de ce post-doctorat, j'ai pu débiter des travaux de recherche, sous la supervision du Pr Pablo R. Murcia, sur l'émergence virale et être initiée au concept « One health ». J'ai ainsi pu étudier les liens étroits entre santé animale, santé humaine et les écosystèmes au travers de la circulation des virus IAVs chez les animaux, le risque zoonotique de ces derniers, leur évolution génétique constante et leur adaptation à un nouvel hôte.

J'ai ainsi pu compléter ma formation en virologie avec la manipulation de virus IAVs, en biologie moléculaire avec la mise en place du système de génétique inverse toujours employé actuellement dans l'équipe et en biologie cellulaire avec le maintien en culture d'explants de trachées canines, équine et humaines.

Etant la première scientifique à rejoindre ce nouveau groupe de recherche, j'ai eu l'opportunité de participer au recrutement et à l'encadrement de ses deux premières étudiantes en thèse. J'ai également participé à la mise en place technique du laboratoire.

Cette première expérience professionnelle a conforté mon choix d'évoluer en virologie, en santé animale sur la compréhension des mécanismes moléculaires déployés par les virus aboutissant à l'émergence ou la réémergence virale. Je reste passionnée par ces formes de vie intracellulaires obligatoires et leur évolution !

Cette première initiation à l'approche « One health » a également renforcé mon envie de m'épanouir sur une thématique de recherche fondamentale au service des activités de terrain. Ce choix m'orientait naturellement vers des instituts de recherche type INRAe (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement) ou ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) à mon retour en France.

Je souhaitais mettre en application mes compétences acquises au cours de ma thèse et de ce post-doctorat sur une thématique de recherche permettant de combiner l'identification d'approches thérapeutiques innovantes et l'étude des mécanismes moléculaires conduisant à l'adaptation virale.

Vivement intéressée par les virus zoonotiques transmis par les arthropodes, le projet de post-doctorat proposé par Muriel Couplier répondait parfaitement à mes attentes et me permettait de continuer ma formation en biologie cellulaire sur un modèle de cellules complexes que sont les cellules du système nerveux central avec pour objectif à long terme de travailler sur les organoïdes cérébraux.

## 2.2.2 Post-doctorat sur le screening de molécules antivirales (2016-2018)

Je suis rentrée en France en 2016 et ai eu l'opportunité de rejoindre l'unité de virologie ANSES-EnvA-INRAe dans l'équipe ZEN « Zoonoses équine et neurovirologie », sous la direction de Muriel Couplier, afin de développer le projet de recherche financé par le LabEx IBeid sur le virus de l'encéphalite à tiques, TBEV. Mon projet était intitulé : « Modélisation des infections virales du système nerveux central en utilisant des cellules neurales humaines dans le but de réaliser un criblage à haut débit par imagerie automatisée de molécules à effet antiviral et/ou neuroprotecteur. Modèle d'étude : le virus de l'encéphalite à tiques TBEV. »

### 2.2.2.1 Contexte

Les virus neurotropes constituent un véritable problème de santé publique comme illustré dernièrement par l'épidémie du virus ZIKA [38]. Selon Olival et Daszak (2005) [39], 39 % des maladies émergentes infectieuses d'origine virale induisent de sévères symptômes neurologiques, incluant des encéphalites. Ce chiffre atteint 49 % si l'on considère les virus induisant des maladies neurologiques de façon rare ou occasionnelle. Ces maladies conduisent à des pertes neuronales importantes chez les patients infectés et peuvent être responsables d'encéphalites aiguës potentiellement fatales mais aussi de séquelles neurologiques plus ou moins invalidantes constituant un fardeau important pour les systèmes de santé et les patients.

Les virus neurotropes d'importance en santé humaine appartiennent à plusieurs familles virales dont la famille *Flaviviridae* (genre *Flavivirus*) et *Togavirida* (genre *Alphavirus*), deux familles de virus à ARN simple brin de polarité positive, transmis par des arthropodes.

Le genre *Flavivirus* comporte plus d'une cinquantaine de virus classifiés en groupes distincts en fonction du type d'arthropodes (les moustiques et les tiques principalement) les transmettant. Certains d'entre eux sont zoonotiques et suscitent un fort intérêt en santé animale et en santé humaine tels que le virus West Nile (WNV) et TBEV [40]. Le virus West Nile est maintenu selon un cycle enzootique oiseaux-moustiques-oiseaux. L'Homme et le cheval sont des hôtes accidentels, culs de sac épidémiologiques qui ne transmettent pas le virus. L'infection chez ces mammifères sensibles est difficile à identifier cliniquement : elle passe le plus souvent inaperçue ou est responsable d'une « grippe estivale », bien que des formes nerveuses sévères, se caractérisant par des signes d'encéphalite et/ou de méningite, soient identifiées dans environ 1 infection sur 10. Bien que peu présent en France, WNV est responsable de plus de 20 000 formes neuroinvasives et de 2000 décès chez l'Homme depuis son émergence aux Etats-Unis en 1999. Chez le cheval, plus de 3800 cas d'infection ont été reportés par l'USDA depuis 2007. Le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) est lui un arbovirus vectorisé par les tiques du genre *Ixodes*. Ce virus circule naturellement entre les tiques et les rongeurs forestiers de type mulots et campagnols. L'Homme peut s'infecter en forêt suite à la piqûre de tiques infectées et lors d'ingestion de produits laitiers crus contaminés. Il provoque chez l'Homme un syndrome pseudo-grippal dans 20 à 30% des cas dont 30% peuvent évoluer en encéphalite ou en méningoencéphalite avec des séquelles neurologiques à plus ou moins long terme. Le taux de mortalité est compris entre 0.5 et 3%. Au cours des dix-neuf dernières années, 51 519 cas confirmés d'encéphalites à tiques ont été signalés à l'ECDC.

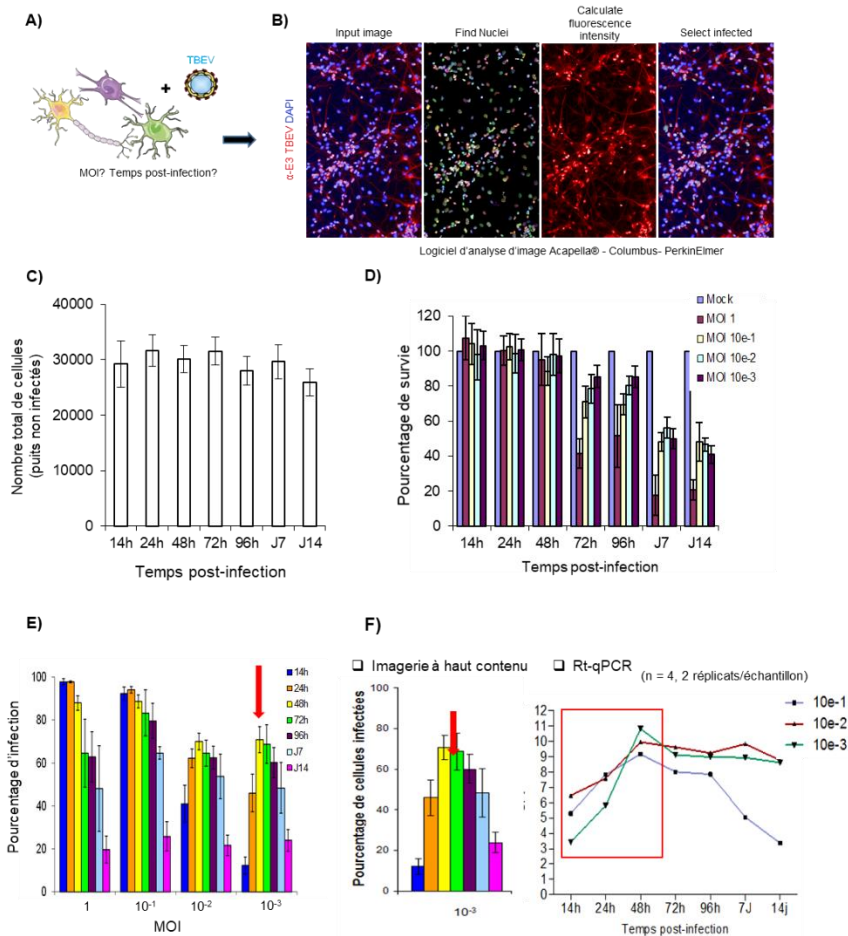
A l'heure actuelle, la prévention contre ces virus repose pour beaucoup sur le contrôle des populations de vecteurs. Des vaccins ne sont malheureusement pas toujours disponibles et il n'y a pas de traitements antiviraux efficaces à ce jour. Devant ce constat, il est important de mettre au point de nouvelles technologies permettant d'identifier rapidement de nouvelles thérapeutiques efficaces contre ces virus.

#### 2.2.2.2 Développer une nouvelle approche haut-débit pour identifier des molécules antivirales efficaces à large spectre.

Les techniques de criblage haut-débit associées à la compréhension des mécanismes moléculaires de la réplication virale et aux avancées majeures en informatique ont permis d'accélérer grandement la découverte de nouvelles molécules antivirales. Une cinquantaine de molécules sont désormais disponibles. Cependant, l'apparition de virus résistants aux antiviraux et de virus à forts potentiels pathogènes nécessitent de renouveler de façon continue cet arsenal thérapeutique y compris contre des maladies négligées (telle que le VIH ou les hépatites) voire oubliées car jugées peu rentable pour l'industrie pharmaceutique. Actuellement aucun traitement antiviral est disponible contre les maladies infectieuses émergentes vectorisées. Il est également indispensable de disposer de modèles *in vitro* et expérimentaux adaptés permettant de tester l'efficacité de ces molécules avant leur administration chez l'Homme.

Notre objectif consistait à développer un système de criblage à haut débit/ haut contenu pour l'identification de molécules bloquant la réplication de TBEV. Ce système est basé sur deux technologies innovantes. La première correspond à l'utilisation de cellules neurales humaines différenciées à partir de progéniteurs fœtaux. La culture mixte de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes ainsi obtenue constitue un modèle d'étude *in vitro* pertinent au plus proche de la physiopathologie des infections du système nerveux central et que nous pensons plus prédictif d'une efficacité antivirale *in vivo*. La seconde technologie est l'imagerie cellulaire à haut débit/haut contenu permettant de cribler des molécules pour leur activité antivirale et cytotoxique. L'imagerie automatisée a tout d'abord permis de miniaturiser la culture de cellules neurales humaines et de quantifier de façon rapide et standardisée le nombre de cellules infectées par le virus TBEV à différentes MOI (MOI 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) au cours d'une cinétique allant de 14h à 14 jours post-infection. Nous avons ainsi déterminé les conditions optimales d'infection des cellules en vue de réaliser un premier crible de molécules antivirales. Nous souhaitons nous positionner à un temps précoce de l'infection, en phase active de réplication virale et à un maximum de cellules infectées. Ces conditions ont été obtenues à la MOI  $10^{-3}$  à 48h post-infection (Figure 9).

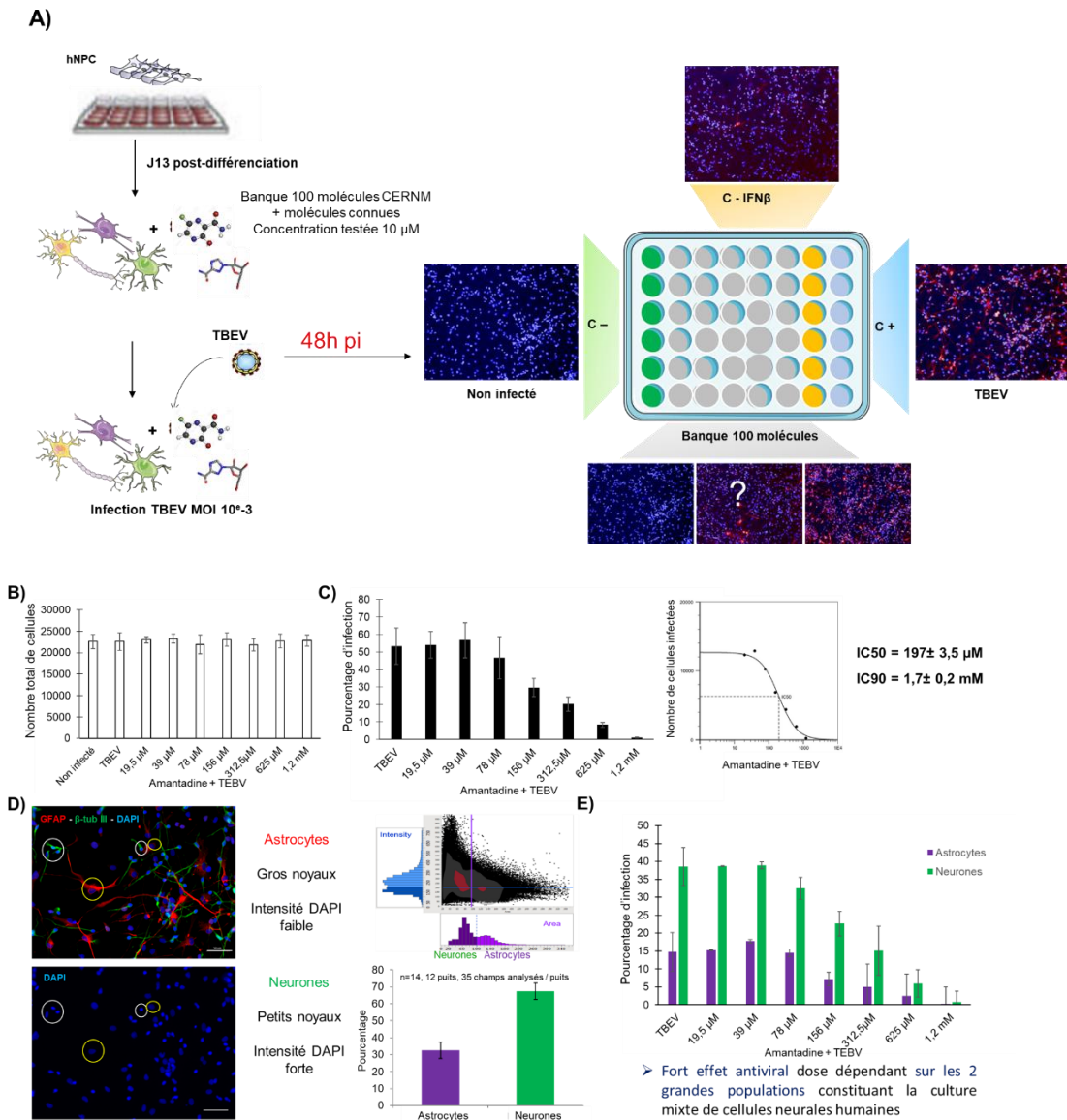




**Figure 9 :** Conditions optimales d'infection de cellules neurales différenciées par le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV). (A) Des cellules progénitrices neurales humaines ont été différenciées pendant 13 jours en une culture mixte de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Les cellules neurales différenciées ont été infectées à différentes MOI (MOI 1 à 10<sup>-3</sup>) pendant différents temps post-infection (14h à 14 jours). (B) Sur chacune des images (Input image), les cellules individuelles sont sélectionnées (Find nuclei). L'intensité de la coloration spécifique du TBEV est calculée (calculate fluorescence intensity) et les cellules dont la valeur est supérieure au seuil défini sont sélectionnées comme infectées par TBEV (select infected cells). Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu) et le virus avec un anticorps spécifique E3-TBEV (rouge). Deux paramètres ont été quantifiés: le nombre total de cellules et le nombre de cellules infectées. Ces résultats ont été comparés à la quantification du génome total de TBEV dans le surnageant des cellules infectées par RT-qPCR. Les données présentées ici résument trois expériences indépendantes.

### 2.2.2.3 Identification de molécules antivirales d'intérêt

Nous avons par la suite identifié une molécule capable d'inhiber l'infection des cellules neurales humaines par TBEV. Il s'agit de l'interféron- $\beta$  utilisé 2 heures en pré-traitement et présent au cours de l'infection. Un premier criblage, sur une centaine de molécules, soit issues de la chimiothèque nationale (CERMN, Caen) et représentatives de différentes familles chimiques, soit déjà connues pour leur activité antivirale sur d'autres flavivirus, a été réalisé et a démontré la faisabilité et la puissance de notre approche. Ces premiers résultats permettront d'identifier de potentielles molécules ayant une activité modulatrice de la réplication de TBEV. Grâce à l'imagerie haut contenu, nous avons également développé une méthode pour discriminer, principalement sur le marquage DAPI des noyaux, les trois populations cellulaires constituant la culture mixte de cellules neurales humaines. Cette méthode simple, rapide et peu coûteuse permettra d'identifier les populations bénéficiant de l'effet antiviral des molécules identifiées. Nous avons ainsi développé une méthode de criblage basée sur de l'imagerie haut débit/haut contenu en utilisant des cellules neurales humaines dérivées de progéniteurs neurales fœtaux qui permet d'identifier rapidement, de façon peu coûteuse et hautement prédictive d'un effet thérapeutique *in vivo*, des molécules antivirales contre le virus TBEV (Figure 10).



**Figure 10 :** L'amantadine inhibe de façon dose dépendante l'infection des cellules neurales différenciées par TBEV. (A) Définition des conditions optimales de réalisation de criblage haut débit de banques de molécules antivirales. Les molécules sont ajoutées à une concentration de 10μM 2h avant infection par TBEV à MOI 10<sup>-3</sup>. L'IFNβ est utilisé comme molécule témoin inhibant l'infection des cellules neurales différenciées par TBEV. (B, C) La quantification du nombre total de cellules et du pourcentage de cellules infectées est réalisée 48h post-infection. L'index de sélectivité est ensuite calculé pour chaque molécule d'intérêt. (D, E) Quantification différentielle des neurones et des astrocytes infectés par imagerie cellulaire haut contenu.

#### 2.2.2.4 Conclusion

J'ai ainsi eu l'opportunité de mettre au point un système de criblage à haut débit/ haut contenu des cellules neurales humaines différenciées infectées par TBEV. Ce système a permis non seulement d'identifier et quantifier les populations de neurones et astrocytes humains mais également de tester et identifier de nouvelles molécules qui inhibent l'infection par TBEV des cellules du cerveau humain. Ce projet « prototype » est depuis utilisé en routine dans le groupe du Dr Couplier et initiait le développement de nombreux modèles d'infection des cellules neurales humaines et équine par des virus neurotropes zoonotiques (homme et/ou cheval: ZIKV, WNV, EEEV, HEV1), le criblage de molécules antivirales à large spectre pour le traitement des encéphalites humaines et équine et l'identification des facteurs cellulaires favorisant ou restreignant la réplication des flavivirus.

### 3. Vers l'indépendance scientifique et technique

#### 3.1 Equipe Zoonoses Equines et neurovirologie, groupe WN

En juin 2018 j'ai été recrutée à l'ANSES en tant que chargée de projet, au sein de l'Unité virologie du Laboratoire de Santé animale dans l'équipe « Zoonoses Equines et Neurovirologie » co-dirigée par Sylvie Lecollinet (ANSES) et Muriel Couplier (INRAE). Cette co-direction s'appuyait sur une ambition commune d'apporter deux regards différents et complémentaires (de neurologue pour Muriel Couplier et de virologue pour Sylvie Lecollinet) sur les infections virales à tropisme neurologique. Le groupe dirigé par Sylvie Lecollinet (remplacé par Nolwenn Dheilly de mars 2021 à septembre 2023 puis par moi-même) porte des mandats nationaux en tant que laboratoire national de référence (LNR) pour l'encéphalite des équidés West Nile et d'autres flavivirus émergents neurotropes. L'unité virologie est le siège depuis le 1er juillet 2008 du laboratoire européen de référence (LR-UE) des maladies équines (hors peste équine), dirigé par Stéphan Zientara et nommé en application du règlement N° 180/2008 de la Commission Européenne du 28 février 2008 ; mandat renouvelé en octobre 2021 pour une durée indéterminée. Le LR-UE Maladies équines compte 7 mandats : anémie infectieuse des équidés, artérite virale équine, West Nile et encéphalites virales exotiques (encéphalite japonaise et encéphalites équines de l'Est, de l'Ouest et du Venezuela) en virologie ; morve et métrite contagieuse équine en bactériologie ; dourine/surra en parasitologie. Depuis juillet 2008, le groupe ANSES de l'équipe ZEN est responsable des activités West Nile et encéphalites équines exotiques.

##### 3.1.1 Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LR-UE) pour les Maladies équines

L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA) estime que 60 % des maladies infectieuses et 75 % des maladies émergentes décrites chez l'Homme sont d'origine animale. Les maladies à transmission vectorielles sont responsables de plus de 17 % des maladies infectieuses émergentes ou ré-émergentes ces dernières décennies. Elles sont de plus en plus régulièrement décrites chez l'animal et l'Homme en France et plus largement en Europe cette dernière décennie ; ainsi récemment, les premiers cas autochtones d'infection humaine par le virus Zika, faisant suite à la pique de moustiques tigres (*Aedes albopictus*) infectés localement dans le département du Var, ont été signalés en France [41]. Les changements environnementaux ont un impact considérable sur l'émergence ou la réémergence des maladies infectieuses [42]. Les maladies infectieuses émergentes, en particulier les maladies à transmission vectorielle, sont étroitement liées aux modifications des processus écologiques impactés par les facteurs anthropiques [43]. Il est donc primordial de prêter attention à la menace constante des virus zoonotiques à transmission vectorielle qui pourraient être les prochains à émerger sur la scène mondiale. Parmi eux, les flavivirus transmis par les moustiques, tels que les virus de la dengue, Zika et le virus West Nile, sont déjà responsables de millions d'infections et de centaines de milliers de décès chaque année. Grâce à des cycles de (ré)émergence, leur distribution géographique continue de s'étendre, ce qui représente une menace pour la santé publique et vétérinaire mondiale [44].

La France est confrontée à plusieurs maladies vectorielles pouvant affecter la filière équine et au risque d'émergence et d'introduction de maladies vectorielles exotiques. Nous pouvons distinguer celles transmises par les tiques de celles transmises par les moustiques, moucheron ou autres vecteurs hématophages. Ces maladies sont responsables de symptômes généraux chez le cheval tels que de l'hyperthermie, de l'anémie (piroplasme, anaplasme, anémie infectieuse des équidés, Surra) et une défaillance de plusieurs organes ou systèmes (peste équine, maladie de Lyme). Elles peuvent être également associées à des symptômes neurologiques sévères de type encéphalites et méningo-encéphalites (West Nile, Encéphalites équines de l'Est /Ouest / Venezuela, encéphalite japonaise).

Parmi celles-ci, les 11 maladies équines comprises dans le mandat figurent sur la liste des maladies réglementées établies sur la base des dispositions du règlement d'exécution (UE) 2018/1882 (loi de santé animale) entré en vigueur le 21 avril 2021. Les maladies sont classées en catégorie. La catégorie A regroupe des maladies exotiques à éradiquer si introduites (maladies soumises à plan d'intervention sanitaire d'urgence). Les maladies de catégorie B sont des maladies à éradication obligatoire alors que celles de catégorie C sont des maladies soumises à éradication facultative. La catégorie D rassemble des maladies soumises à des restrictions aux échanges en vue

d'en empêcher la propagation en cas d'entrée dans l'Union ou de mouvements entre les États membres. Les maladies de catégorie E sont soumises à une surveillance obligatoire.

### **3.1.2 Laboratoire National de référence (LNR) encéphalites virales des équidés : encéphalite West Nile**

#### *3.1.2.1 Missions du LNR*

Le LNR West Nile exerce une mission de santé publique vétérinaire au travers de son mandat national sur la fièvre West Nile. Il exerce une importante activité de recherche, de référence, d'expertise et d'épidémiologie-surveillance.

Il assure donc le diagnostic des émergences via un système de surveillance impliquant la gestion d'un réseau de sept laboratoires vétérinaires départementaux. Il fournit également une expertise et des conseils pour aider à la décision publique et politique et va proposer des projets de recherche en soutien aux activités de référence. Nous développons activement des outils de diagnostic innovants et multiplexes permettant une identification rapide des agents pathogènes.

#### *3.1.2.2 Surveillance des flavivirus émergents en France : WNV – USUV - TBEV*

##### *3.1.2.2.1 Contexte*

La surveillance des zoonoses vise à détecter à la fois l'émergence et la ré-émergence d'agents pathogènes connus, leur aire de répartition géographique et/ou du spectre d'hôtes et/ou de vecteurs. Parmi les flavivirus responsables de certaines des épidémies modernes les plus notoires, la présence des virus West Nile (WNV), Usutu (USUV) et TBEV en France métropolitaine, et dans le reste de l'Europe représente un risque sérieux.

Le dispositif français de surveillance de WNV a été mis en place à partir de 2000 et implique de nombreux acteurs de la santé publique (Santé publique France, Agence régionale de santé (ARS), directions départementales de l'emploi, du travail, des solidarités et de la protection des populations (DDetsPP)) et vétérinaire (Direction générale de l'alimentation (DGAI) et services vétérinaires départementaux, l'ANSES en tant que laboratoire de référence, les laboratoires départementaux d'analyses vétérinaires (LDAV), l'Office Français de la Biodiversité (OFB), le Réseau d'Epidémiologie-Surveillance des Pathologies Equines (RESPE) et l'Entente Inter-Départementale (EID)).

L'anticipation des crises, exercice périlleux pour lequel il n'existe pas de marqueur fiable d'épizooties WNV, repose en France sur une surveillance événementielle intégrée à tous les échelons de la chaîne de transmission. Le dispositif de surveillance repose donc sur les quatre compartiments épidémiologiques suivant :

- humain : une surveillance accrue des cas humains d'encéphalites dans les centres hospitaliers des départements du pourtour méditerranéen (les Bouches-du-Rhône (13), le Gard (30), le Var (83), les Alpes-Maritimes (06), l'Hérault (34), l'Aude (11)) est entreprise de juin à octobre.
- équin : une surveillance clinique des cas d'encéphalites équinées accompagnée d'une déclaration obligatoire des cas suspect d'infection équine par les vétérinaires sanitaires auprès des DDetsPP.
- aviaire : une surveillance passive de la circulation de WNV dans l'avifaune, basée sur un suivi des mortalités massives et/ou surmortalités, est entreprise au cours de la saison de transmission (de juin à octobre) dans les départements à risque. Celle-ci repose sur la recherche du génome de WNV dans l'encéphale, le foie et la rate de cadavres d'oiseaux sauvages collectés principalement par l'OFB et son réseau SAGIR (réseau de surveillance épidémiologique des oiseaux et des mammifères sauvages terrestres en France).
- entomologique : la surveillance entomologique consiste en la recherche de WNV dans les moustiques capturés aux alentours des foyers équinés et/ou humains et en l'inventaire des espèces de moustiques identifiées.

Ce dispositif permet de maintenir une vigilance sur l'ensemble du territoire métropolitain (via le volet équin), tout en accentuant la pression de surveillance dans les départements à risque lors de la saison de transmission. En Europe, une déclinaison du système de surveillance comprenant les 4 volets présentés ci-dessus est appliquée avec une surveillance clinique des cas d'infection humaine et équine assurée par l'ensemble des états membres.

Le virus Usutu fait l'objet d'une surveillance renforcée en France par l'OFB (via le réseau SAGIR) et l'ANSES (via le LNR West Nile) [45]. Ce virus est responsable de mortalité massive dans l'avifaune, principalement de merles noirs (*Turdus merula*) et de chouettes hébergées dans les parcs zoologiques [46-48]. Tout comme WNV, il est maintenu selon un cycle de transmission oiseaux-moustiques (*Culex spp.*)-oiseaux. Une dizaine d'espèces

mammifères dont l'Homme peuvent être infectés par ce virus mais sont considérées comme cul-de-sac épidémiologiques [47].

Il est donc indispensable de réaliser le diagnostic différentiel d'infection entre USUV et WNV sur les sérums ou les cadavres d'oiseaux sauvages ou captifs collectés mais également chez l'Homme pour lequel 104 cas d'infections neurologiques en Europe ont été recensés depuis sa première mise en évidence en Autriche en 2001.

Actuellement, la surveillance événementielle des cas suspects d'infection par WNV et USUV comprend (i) une analyse sérologique des chevaux cliniquement symptomatiques ou des oiseaux captifs manifestant des signes neurologiques et (ii) une détection moléculaire des deux virus dans des organes cibles de l'infection par RT-qPCR.

Le virus TBEV est l'arbovirus le plus fréquent en Europe. Le sous-type circulant en Europe induit des méningo-encéphalites chez l'Homme pouvant entraîner des séquelles graves à long terme et conduire à la mort dans 0,5 à 3% des cas. En Europe de l'Ouest, le virus circule naturellement entre la tique *Ixodes ricinus* et les micro-mammifères. La plupart des pays européens constatent une tendance à une augmentation du nombre de cas humains depuis les années 2000 [49]. La surveillance événementielle de TBEV est assurée en France par le Centre National de Recherche (CNR) des Arbovirus et s'effectue principalement par un suivi clinique des cas humains d'encéphalites dans les départements d'Alsace (région endémique connue de circulation de TBEV en France), de Savoie et Haute-Savoie. Celle-ci peut également se faire suite à des demandes directes de personnes ayant été piquées par une tique et développant des symptômes. L'encéphalite à tiques est devenue une maladie à déclaration obligatoire en France depuis juin 2021. TBEV infecte également les ruminants et la faune sauvage (chevreuils, sangliers, etc.) [50]. L'absence de symptômes cliniques chez ces espèces empêche une surveillance événementielle en santé animale. Seules des enquêtes sérologiques ponctuelles basées sur des analyses individuelles ou une détection du génome de TBEV dans des prélèvements de lait ou sanguins s'inscrivant dans des programmes de recherche sont mises en œuvre dans plusieurs pays européens [51] [52, 53] [54] [55].

#### 3.1.2.2.2 Ma contribution aux activités de surveillance de WNV en France depuis 2018

Le virus West Nile est un flavivirus transmis par des moustiques communs, appartenant au genre *Culex* ; il est responsable d'une pathologie ancienne en France, puisque déjà décrite chez l'Homme et le cheval dans la région de la Camargue dès les années 1960 [56]. Cette maladie figure parmi les maladies notifiées à l'OMSA et est catégorisée comme maladies de classe E selon la loi de santé animale. L'infection chez ces mammifères sensibles est difficile à identifier cliniquement : elle passe le plus souvent inaperçue ou est responsable d'une « grippe estivale », bien que des formes nerveuses sévères, se caractérisant par des signes d'encéphalite et/ou de méningite, soient identifiées dans environ 1 infection sur 140 chez l'Homme et dix fois plus fréquemment chez les équidés [57]. L'épidémiologie de l'infection par le virus West Nile a beaucoup évolué ces dernières années en Europe. Le virus a en effet réémergé à la fin des années 90 en Europe de l'Ouest (Italie, France) et de l'Est (Roumanie) puis de nouveau en 2008 dans quatre pays européens (Italie, Hongrie, Roumanie et Autriche), avant de diffuser dans la région. Chaque année entre 2009 et 2022 de nouveaux territoires européens ont ainsi été trouvés infectés, dont l'Italie, la Grèce et plus largement la région des Balkans avec une endémisation du virus en Europe. Une circulation record du virus West Nile a été enregistrée en France et dans toute l'Europe pendant la saison de transmission (été et automne) 2018, avec une saison d'infection plus précoce (premiers signes cliniques chez l'Homme rapportés dès fin mai), une large zone de diffusion de l'agent infectieux et une pression d'infection élevée. Ce sont au total 1503 cas confirmés d'infection qui ont été rapportés chez l'Homme dans 11 pays de l'Union Européenne (avec près de 92% des cas provenant d'Italie, de Grèce, de Roumanie et de Hongrie), soit plus que le nombre cumulé des 7 années antérieures ; auxquels s'ajoutent 285 cas équins, principalement en Italie (149), Hongrie (191), Grèce (15) et France (13) [58] [59]. De plus, cette forte activité s'est accompagnée d'une extension remarquable de l'aire de répartition du virus, puisque des cas équins et avifaune ont été pour la première fois identifiés en 2018 en Europe du Nord (Allemagne, région de Berlin). En France, des formes neuro-invasives d'infection à virus West Nile ont été à nouveau identifiées chez l'Homme en 2018, alors qu'elles étaient rarement rapportées sur le pourtour méditerranéen (Camargue, 1962-65 ; Var, 2003) : 13 cas d'infections neurologiques chez des équidés, 4 cas dans l'avifaune et 27 cas humains ont été identifiés dans plusieurs départements du pourtour méditerranéen (Alpes-Maritimes, Corse, Bouches-du-Rhône et Gard).

Pour la première fois depuis la mise en place de la surveillance intégrée du virus West Nile en France, la circulation du virus a pu être objectivée chez des oiseaux sauvages, quatre rapaces trouvés morts dans les Alpes-Maritimes et en Corse, grâce au réseau SAGIR et au LNR, alertant sur un possible changement de paradigme dans la circulation du virus West Nile sur le territoire métropolitain. En effet, chez ces oiseaux, a été identifiée une nouvelle souche pathogène de lignée 2, jamais encore décrite en France puisque les souches historiques isolées en Camargue jusqu'en 2015 appartenaient à la lignée 1 [59]. Aucune circulation de WNV dans l'avifaune n'a été mise en évidence ces quatre dernières années.

Depuis 2018, la circulation de WNV en France dans la population équine est moins intense. En effet, des cas ont été rapportés dans les Bouches-du-Rhône, dans le Gard, en Corse en 2019 (8 cas), 2020 (5 cas), 2021 (2 cas) et 2022 (6 cas). Des cas équins d'infection ont également été notifiés dans le Var en 2021 (1 cas) et en 2022 (4 cas) avec un début d'apparition des symptômes établi entre mi-août (en 2020 et 2022), fin août (en 2019) et fin septembre (en 2018).

L'année 2022 a été marquée par la mise en évidence de 3 cas d'infections équines à WNV dans le Sud-Ouest de la France en Gironde (33). L'aire de distribution du virus s'est donc étendue bousculant nos certitudes sur la répartition du virus en France métropolitaine et soulignant ainsi la nécessité de renforcer notre système de prévention et de surveillance sur l'entièreté du territoire.

L'année 2023 s'illustre (en date du 4 septembre 2023) par la survenus de cas humains d'infection aiguë à WNV en Gironde, en Charente Maritime (12 cas WNV et 4 cas USUV) ainsi qu'en région Provence-Alpes-Côte d'Azur (4 cas WNV). Un grand nombre de cas équins et des cas de mortalité aviaire ont également été diagnostiqués par le LNR West Nile.

Afin d'assurer un diagnostic optimisé et différentiel par rapport à USUV, l'équipe du LNR a développé une méthode de détection des génomes viraux de WNV ou USUV couplé au gène de ménage  $\beta$ -Actine par deux RT-qPCR duplex indépendantes.

La méthode de détection de WNV par RT-qPCR en temps réel en une seule étape et en duplex sur ARN viral simple brin extrait à partir d'organes et de sang équins ou aviaires a fait l'objet d'une accréditation par le COFRAC en mai 2021. Des ARN standards homogènes et quantifiables ont été synthétisés *in vitro*, après amplification de la région génomique d'intérêt sous contrôle du promoteur du bactériophage T7 et transcription *in vitro*. Ces analyses sont utilisées quotidiennement pour nos activités de diagnostic.

### 3.1.2.2.3 Ma contribution aux activités de surveillance d'USUV depuis 2018

D'autres flavivirus moins connus, qui ne sont pas aussi pathogènes pour l'Homme, émergent et provoquent des épidémies importantes chez des hôtes vulnérables. Le virus Usutu (USUV), étroitement lié au WNV sur le plan génétique et antigénique, est l'un de ces agents pathogènes : très répandu en Europe, il est responsable d'événements de mortalité massive chez les oiseaux sauvages et captifs [60]. Considéré comme émergent en Europe, ce virus a été détecté en France pour la première fois en 2015 [45] dans le Rhône et le Haut-Rhin par l'OFB (via son réseau SAGIR) et le LNR WNV. Depuis, chaque année USUV a été mis en évidence en France dans l'avifaune.

#### A. Surveillance d'USUV dans l'avifaune sauvage

En collaboration avec le réseau SAGIR (OFB), nous réalisons, toute l'année, sur l'ensemble du territoire métropolitain, une surveillance événementielle de toute mortalité aviaire considérée comme suspecte d'un point de vue clinique : oiseau présentant des troubles nerveux ou indices indiquant de tels troubles (mortalité en bord de route d'oiseaux hyper vigilants), mortalité anormale de turdidés et d'oiseaux des jardins, mortalité individuelle violente de chouettes, hiboux et corvidés. Une analyse systématique Usutu est demandée sur les cadavres de grands tétras et autres galliformes de montagne. La présence de génome USUV est recherchée par RT-qPCR spécifique dans le foie, la rate et l'encéphale de ces individus. En 2018, USUV a été détecté dans l'avifaune sauvage française dans 46 départements en France infectant principalement les merles (*Turdus merula*) et les chouettes laponnes (*Strix nebulosa*). Une augmentation du nombre cas d'oiseaux infectés a également été rapportée dans les pays limitrophes (Allemagne, Belgique, Suisse) et aux Pays-Bas. [60-63]

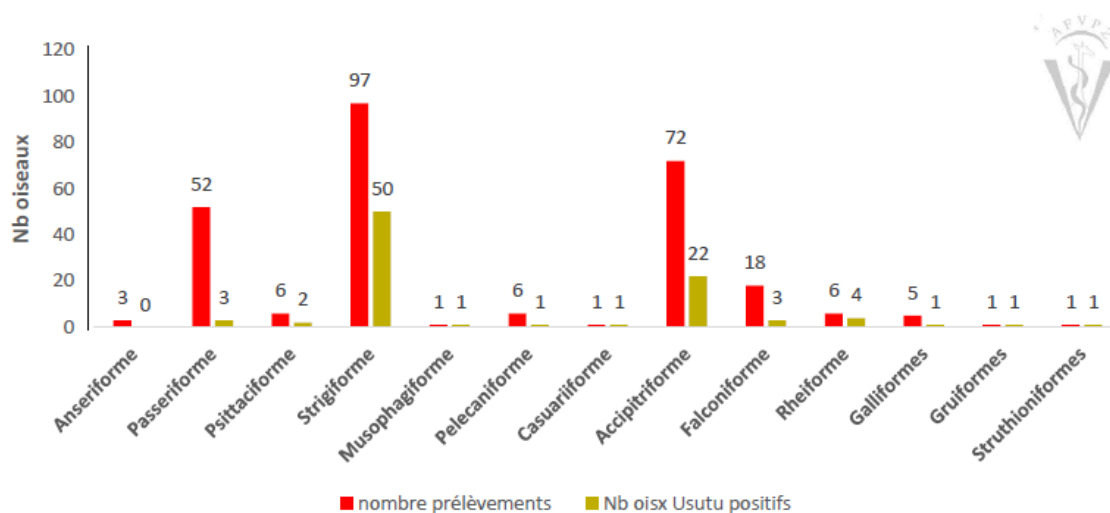
#### B. Surveillance d'USUV dans l'avifaune captive

Cette surveillance fait suite aux enquêtes sérologiques établies dans les zoos et mises en place depuis 2018 avec l'AFVPZ.

L'épizootie d'USUV survenue en France en 2018 ainsi que la détection de WNV lignée 2 dans l'avifaune sauvage a initié une collaboration fructueuse avec les parcs zoologiques français via l'association AFVPZ. Dans le cadre d'une thèse vétérinaire, nous avons entrepris une enquête sérologique biannuelle du suivi des espèces aviaires impactées par l'épizootie de 2018 et plus largement des espèces d'oiseaux constituant les parcs. Des campagnes de prélèvements étaient réalisées en amont de saisons de transmissions (mai-juin) puis en fin d'année – janvier de l'année suivante correspondant à une fin de saison de transmission.

Notre objectif était d'étudier la fréquence d'infection des différentes familles aviaires par USUV et d'étendre le spectre d'espèces sentinelles de l'infection par WNV et/ou USUV.

En 2019, l'enquête sérologique a démontré un taux de séroprévalence plus élevé chez les strigiformes et les accipitriformes. Nos analyses de diagnostic montrent une diminution du nombre d'oiseaux infectés par USUV depuis 2018. Nous émettons l'hypothèse qu'une immunité de groupe des populations d'oiseaux ayant survécus à l'épizootie de 2018 s'est mise en place. La durée de celle-ci reste cependant inconnue.



		Nb prélevés	Nb positifs	%
Accipitriformes	Aigle	32	5	16
	Vautour	40	17	43
Strigiformes	Chouettes	73	37	51
	Hiboux et grand duc	24	13	54

**Figure 11** : Enquête de séroprévalence du virus Usutu réalisée dans douze parcs zoologiques français. Des séroneutralisations spécifiques à USUV ont été réalisées sur 269 échantillons de sérums prélevés sur l'avifaune captive constituant la volière des parcs zoologiques. Un total de 90 échantillons positifs à USUV a été mis en évidence, la majorité appartenant à l'ordre Strigiforme et Accipitriforme.

#### 3.1.2.2.4 Ma contribution aux activités de surveillance de TBEV en France

La distribution géographique de TBEV en France est à ce jour très mal connue [64]. Sa répartition est cependant plus large que ne le laisse supposer la surveillance événementielle qui recense les cas humains de TBE.

En collaboration avec le LNR West Nile, Laure Bournez (Unité SEEPIAS, Nancy) a mené une enquête de séroprévalence dans 16 départements entre 2009 et 2014 sur des chevreuils et des sangliers. Sur les 758 sérums de chevreuil et 1014 sérums de sanglier analysés (20 à 200 échantillons / département / espèce), trois



départements étaient positifs vis-à-vis de TBEV (la Marne, la Savoie et le Jura) avec une séroprévalence de 0.6% (IC 95% [0,1-2,2] ) et 2.9% (IC 95% [1,2-5,9]) respectivement pour ces espèces [65].

Un autre point important est de déterminer le risque d'exposition des ruminants au virus TBEV en France. Pour ce faire, nous travaillons en collaboration avec Laure Bournez sur le projet transversalité ANSES « AMI FLAVI-EST » et déterminons l'exposition des bovins vis-vis de TBEV dans la région Alsace – Lorraine. La séroprévalence des bovins est estimée dans 120 zones de 10x10km, choisies aléatoirement dans la zone d'étude. Les analyses sérologiques ont été réalisées et ont porté sur 9821 sérums collectés pendant les campagnes de prophylaxie 2017-2018 (Alsace, Meurthe-et- Moselle) et 2018-2019 (Vosges, Moselle) avec 80 à 100 sérums par unité spatiale. Les sérums ont été analysés par ELISA (kit ID Screen® de West Nile Competition, ID Vet, Montpellier, France) qui détectent tous les flavivirus. Les positifs ou douteux ont ensuite été analysés par séroneutralisation (SNT) pour détecter les anticorps spécifiques TBEV.

L'identification des facteurs associés à la distribution de la séroprévalence du virus TBE chez les bovins par l'utilisation de modèles statistiques et la prédiction d'environnement favorable du virus TBE en France sous forme de cartes à l'aide de modèles de niche seront réalisés en collaboration avec Laure Mathews-Martin (étudiante en thèse FCPR), Laure Bournez et Raphaëlle Metras.

Des enquêtes sérologiques complémentaires en région Auvergne Rhône-Alpes et Grand-Est (départements non investigués dans le projet FLAVI-EST) seront mises en place dans le cadre de la thèse afin de mieux comprendre la distribution du virus dans ces zones à risque plus élevé et de comparer ces résultats aux données prédites par le modèle. Les données de séroprévalence chez les bovins dans les régions Grand-Est et Auvergne-Rhône-Alpes permettront également d'estimer l'exposition des bovins au virus.

En avril 2020, le LNR WNV a mené des investigations selon l'approche « One Health », dans le troupeau de chèvres incriminé suite au premier cluster de cas humains d'encéphalite à tiques lié à la consommation de fromages de chèvre non pasteurisés dans le département de l'Ain, zone dans laquelle la circulation de TBEV n'était pas décrite. Cette approche consistait en (i) la détection du virus dans le fromage et les produits laitiers, (ii) des tests sérologiques sur tous les animaux de la ferme suspecte et des fermes environnantes, (iii) une analyse du paysage et la localisation des zones boisées, (iv) la collecte de tiques et de petits mammifères pour la détection du virus et l'estimation du risque enzootique, et (v) l'isolement du virus et le séquençage du génome. Nous avons pu confirmer l'origine alimentaire de l'épidémie de TBE et assister en temps réel à la séroconversion des individus récemment exposés et à l'excrétion du virus dans le lait de chèvre. En outre, nous avons identifié une zone de concentration boisée où et autour de laquelle il existe un risque d'exposition au TBEV. Nous avons fourni le premier isolat TBEV transmissible par la voie alimentaire en France, obtenu la séquence complète de son génome et constaté qu'il appartient au sous-type européen du virus.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in microbiology* [66] en avril 2022 et l'obtention du financement d'un projet transversalité ANSES en tant que co-porteur de projet (budget : 35000€) et d'une thèse FCPR sur le risque de transmission à l'Homme par la voie alimentaire suite à l'ingestion de produits laitiers contaminés. Les données obtenues sont présentées dans la partie 3.2.2.

## 3.2 Activités de recherche

### 3.2.1 Déterminants moléculaires de la virulence du virus West Nile

#### 3.2.1.1 Contexte

Les flavivirus ont conservé un potentiel évolutif permettant l'adaptation de ces derniers à ses multiples hôtes. L'émergence de variants potentiellement plus pathogènes et plus transmissibles à une population d'hôtes représentent un risque majeur en santé humaine et vétérinaire. La virulence d'un agent pathogène correspond à sa capacité à pénétrer dans un organisme, à se multiplier et se disséminer au niveau des tissus cibles. La majorité des virus à ARN présentent un taux de mutation élevé dû à un manque de propriété de relecture et de correction de leur polymérase ARN dépendant entraînant ainsi une évolution rapide de ces virus suite à l'accumulation de mutations.



Aux États-Unis, la dissémination de WNV en 1999 a été spectaculaire, provoquant une épidémie de grande ampleur avec un grand nombre de cas neurologiques avérés chez l'Homme, les chevaux et les oiseaux [67]. La mortalité massive dans l'avifaune est devenue la principale signature de l'émergence du WNV sur le continent américain. En Europe, la plupart des oiseaux infectés par WNV subissent une infection subclinique et ne développent pas de symptômes cliniques. L'intense propagation de WNV sur le continent américain et l'apparition de souches européennes et méditerranéennes différenciées pathogènes pour l'avifaune et l'hôte mammifère serait la conséquence d'acquisition de mutations favorisant la pathogénicité et la virulence de ces dernières, telle que la N3 T249P [68]. Peu d'études ont été entreprises afin de comprendre et expliquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la différence de pathogénicité objectivée entre des souches WNV isolées sur le pourtour méditerranéen (telle que WNV-Israël 1998) et en Europe (WNV Italie 2008, souche 229892, GENBANK : FJ483549). Il est désormais indispensable d'identifier les déterminants moléculaires impliqués dans la pathobiologie des souches WNV dans l'objectif de proposer de nouvelles méthodologies pour prévenir l'émergence de souche pathogène en Europe et la propagation de ces dernières chez les multiples hôtes de WNV.

Dès mon arrivée dans l'équipe, je me suis donc intéressée aux facteurs moléculaires de virulence de WNV lignée 1 chez les hôtes vertébrés (oiseaux et rongeurs).

J'ai tout d'abord poursuivi le projet initié par S. Lecollinet et S. Lowenski sur la caractérisation des déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile spécifiques des hôtes aviaires et/ou mammifères.

La caractérisation de la virulence des souches européennes de WNV pourrait initier un début d'explication sur la situation épidémiologique contrastée entre l'Europe et le continent Nord-Américain. Des travaux semblent indiquer que des souches européennes de WNV lignée 1 seraient moins pathogènes pour l'hôte aviaire [69] mais aussi virulentes que la souche nord-américaine chez un hôte mammifère modèle, la souris [70] [71].

Plusieurs virus chimériques ont été générés au laboratoire par échanges de fragments génomiques entre les souches WNV lignée 1 Israël 98 et Italie 08 à partir du clone infectieux Israël 1998 synthétisé préalablement [72] (Figure 12). La propriété biologique de chacun des virus chimériques a été évaluée *in vitro* dans des lignées cellulaires vertébrés (cellules Véro) et dans des modèles *in vivo* (souris BALB/c et poussins de 1 jour en partenariat avec le Sciensano, Belgique) en comparaison à celles des virus parentaux.

Ce projet correspond au début de la thèse de Lise Fiacre et a donné lieu à un article scientifique publié dans *Viruses* en Avril 2023 [73].



**Figure 12** : Représentation schématique des chimères WNV-Is98-NS4A/NS4B/5'NS5 et WNV IS98-NS5/3'UTR synthétisées à partir des virus parentaux WNV-IS98 et WNV-It08. Les fragments bleus et orange proviennent respectivement des génomes Is98 et It08. Les mutations non synonymes sont représentées par des étoiles roses. Les enzymes de restriction impliquées dans la stratégie de clonage sont mentionnées (Spel, SaclI).

Ces premiers résultats ont permis d'objectiver le rôle majeur de trois régions moléculaires à savoir NS3 249, NS4A/B et NS5, impliquées dans la virulence de WNV et son échappement au système immunitaire selon l'hôte considéré et d'identifier 9 mutations non-étudiées pouvant expliquer la différence de virulence observées entre les souches.

Ces résultats encourageants ont initié une collaboration entre notre équipe et l'équipe d'Emmanuel Albina et Nonito Pagès (CIRAD Guadeloupe) qui étudie la compétence vectorielle de colonies de vecteurs moustiques spécifiques de Guadeloupe. Le virus West Nile est endémique en Guadeloupe depuis 2002 et des traces sérologiques de circulation ont été identifiées régulièrement chez le cheval, des poules sentinelles et plus récemment chez l'Homme. Les deux groupes étaient particulièrement intéressés par l'identification des déterminants moléculaires viraux modulant la compétence vectorielle des moustiques de Guadeloupe vis-à-vis de WNV.

Le projet de thèse de Lise Fiacre que j'ai co-encadrée a ainsi vu le jour.

Nous avons tout d'abord rédigé une revue bibliographique sur l'ensemble des déterminants moléculaires viraux connus de la virulence de WNV, en fonction des hôtes invertébrés (moustiques) ou vertébrés (mammifères et oiseaux). Ce portfolio a ainsi mis en évidence les différences et les similitudes constatées entre les hôtes et les modèles de souches de WNV utilisées, afin de fournir une base de travail quant à la prédiction et l'anticipation de la réémergence du virus et de son risque d'extension en Europe.

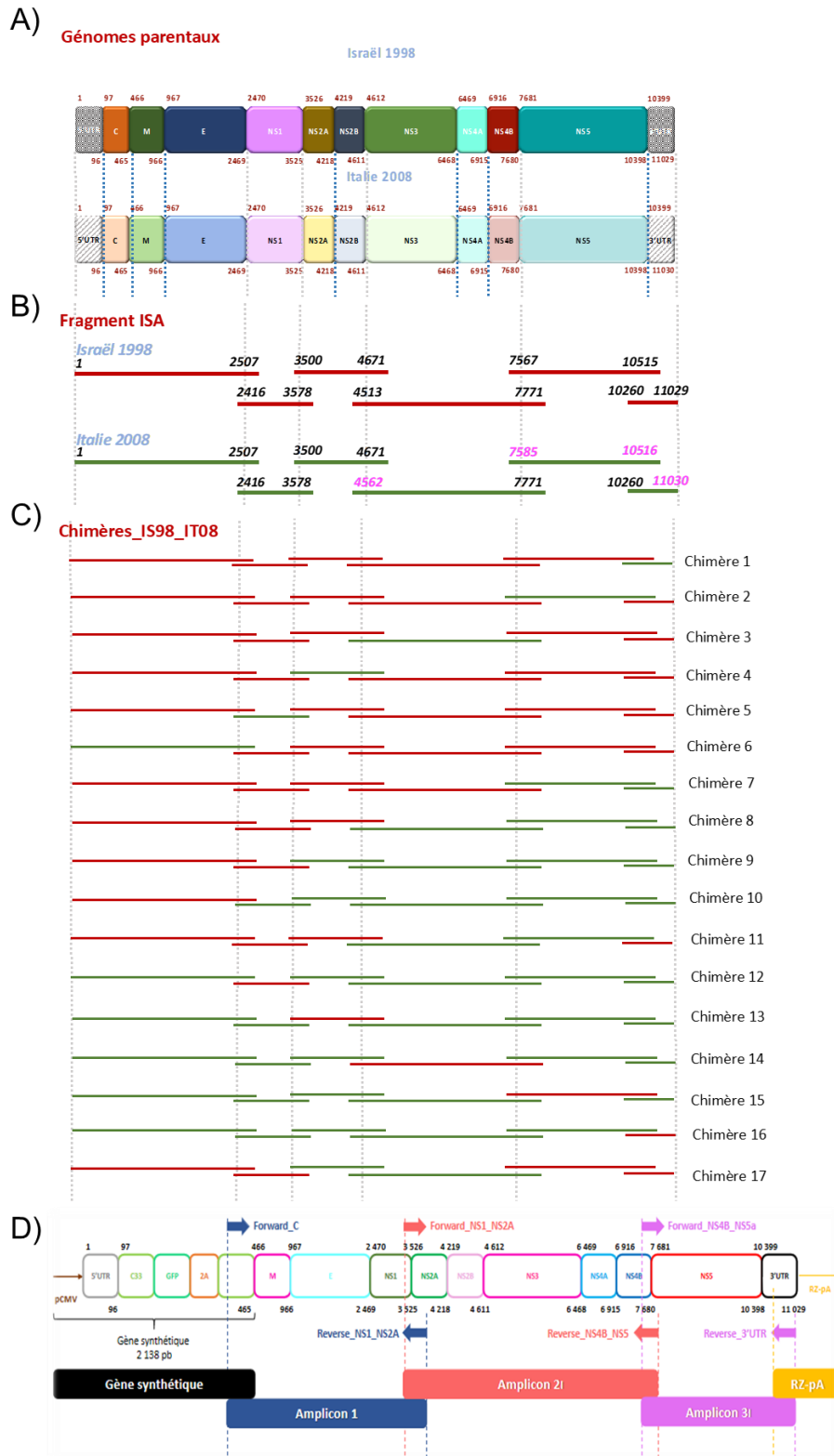
Nous nous sommes alors lancées dans la synthèse de virus chimériques entre les deux souches WNV lignée 1 citées précédemment (Israël 1998 et Italie 2008) selon les mutations et domaines viraux d'intérêt identifiés dans la revue. Pour ceci, nous avons utilisé la méthode innovante ISA « Infectious Subgenomic amplicon » [74]. Elle consiste en l'amplification par PCR du génome viral en six fragments d'ADNc de taille maximale de 4 kb, chacun des fragments se chevauchant sur une zone d'environ 70 à 100 pb. Le premier et le dernier fragment sont respectivement flanqués en 5' par le promoteur du cytomégalo virus 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 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 dans la cellule, ce qui facilite la procédure et raccourcit grandement sa durée.

Lise a ainsi généré 15 virus chimériques infectieux et a caractérisé la capacité répliquative de ces derniers dans des cellules Véro et cellules CCL141 (lignée cellulaire embryonnaire de canard). Elle a également produit deux virus chimériques WNV-Is98 capables d'exprimer la GFP ou mCherry à des niveaux élevés dès 8h post-infection dans des cellules Véro (Figure 13). Ces deux virus WNV-marqués constituent des outils intéressants pour suivre l'infection des cellules en temps réel et pourront être utilisés lors d'infections simples *in vivo* sur moustiques du genre *Culex* dans le cadre de la thèse de Lise mais également lors d'infections multiples successives ou simultanées sur modèles souris et oiseaux.

Perspectives : 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 sur les virus à ARN à potentiel zoonotique. Ils permettent d'étudier de nombreuses caractéristiques virales comme la pathogénèse, les interactions virus/hôte ou encore le rôle de certaines protéines virales. Ces systèmes jouent également un rôle non négligeable dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et dans la mise en évidence de phénomènes de résistance.

La technique ISA sera appliquée à différentes lignées d'USUV et permettra de générer des virus chimères entre les virus WNV et/ou USUV et ainsi identifier les déterminants moléculaires viraux de spécificité d'infection d'hôte tout en mettant en lumière les zones prédictibles impliquées dans le franchissement de barrière d'espèces, la virulence de certaines souches pour un hôte donné.



**Figure 13 : Représentation schématique de la stratégie de clonage « Infectious Subgénomique Amplicon » et des virus chimériques synthétisés entre les virus parentaux WNV-Is98 (représenté en rouge) et WNV-It08 (représenté en vert). La technique ISA a été employée au cours de la thèse de L. Fiacre. Des amplicons chevauchant ont été synthétisés (B) et permutés selon les conditions décrites en (C). Un virus WNVIs98-eGFP a également été produit (D).**

### 3.2.2 TBEV : risque de contamination par la voie alimentaire

#### 3.2.2.1 Contexte

Bien que ce virus soit principalement transmis par piqûres de tiques infectées du genre *Ixodes*, l'importance de la transmission de TBEV par la voie alimentaire n'est pas connue. Au total, 1% des cas de TBE seraient contractés suite à la consommation de lait non pasteurisé ou de produits laitiers dérivés crus provenant d'animaux d'élevage infectés [75] [49]. Les ruminants (chèvres, vaches et brebis) infectés suite à une piqûre de tique infectée sont asymptomatiques et ne peuvent pas transmettre le virus à d'autres tiques du fait d'une virémie courte et faible (4 à 5 jours). Ils peuvent cependant l'excréter dans le lait dès le deuxième jour après l'infection et suivant les individus pendant au moins 23 jours [76] avec une charge virale maximale dans les premiers jours suivant l'infection [77] [78]. En Europe, ce sont surtout les produits laitiers non pasteurisés (lait cru et fromages frais) de chèvre qui sont impliqués dans les cas de contamination alimentaire par TBEV même si des cas liés à la consommation de produits laitiers de brebis et de vache ont également été décrits [78]. Peu de données sont disponibles sur l'excrétion du virus par les différentes espèces de ruminants (quantité, durée et différence entre espèces) et sur la persistance et l'infectiosité du virus dans les différents produits laitiers. Des premières études ont montré que la durée de persistance du virus infectieux dans le lait cru de brebis et de chèvre dépendait du titre viral initial et diminuait avec l'augmentation des températures de conservation et en fonction de la teneur en sel [77, 79]. Mais aucune n'a étudié l'effet de la composition du produit (taux de matières grasses, protéines, etc.) qui varie en fonction de l'espèce de ruminant, de la période et du produit laitier considéré.

Ce risque de transmission par la voie alimentaire du TBEV dépend donc notamment de l'excrétion du virus dans le lait par les ruminants en France (exposition des ruminants au virus et excrétion virale dans le lait), de la persistance du virus dans le lait et les différents produits laitiers dérivés, des pratiques de transformation et de consommation alimentaire de lait cru et produits laitiers non pasteurisés. L'objectif général de ce projet est de mieux comprendre le risque de transmission du virus de l'encéphalite à tiques pour l'Homme via la consommation de produits laitiers non pasteurisés en France en s'intéressant à deux composantes de ce risque : (i) l'exposition des ruminants vis-à-vis de TBEV en France et (ii) l'identification des produits laitiers à risque, dans lesquels le virus TBE peut persister suffisamment longtemps pour être transmis à l'être humain par la voie alimentaire. Cette question est d'autant plus importante que la France est le premier pays producteur et consommateur de fromages de chèvre dans le monde (dont environ 35 fromages AOP au lait cru) et que la consommation de produits au lait cru est de plus en plus plébiscitée par les consommateurs comme signe de qualité nutritionnelle et gustative des produits.

#### 3.2.2.2 Systèmes d'études proposés et résultats préliminaires

##### 3.2.2.2.1 Identification des produits laitiers à risque

L'objectif est d'évaluer la persistance du virus dans le lait et les produits laitiers en fonction des processus de fabrication et des modalités de conservation mais également de déterminer si des différences de persistance du virus existent selon l'origine du lait (caprins / bovins). Une méthode d'isolement et de quantification du TBEV dans les fromages (RT-qPCR TBEV) a été développée par l'unité Virus Entérique du Laboratoire de Sécurité des Aliments et l'équipe ZEN de l'UMR Virologie du LSA de l'ANSES [80].

##### 3.2.2.2.2 Persistance de TBEV dans le lait

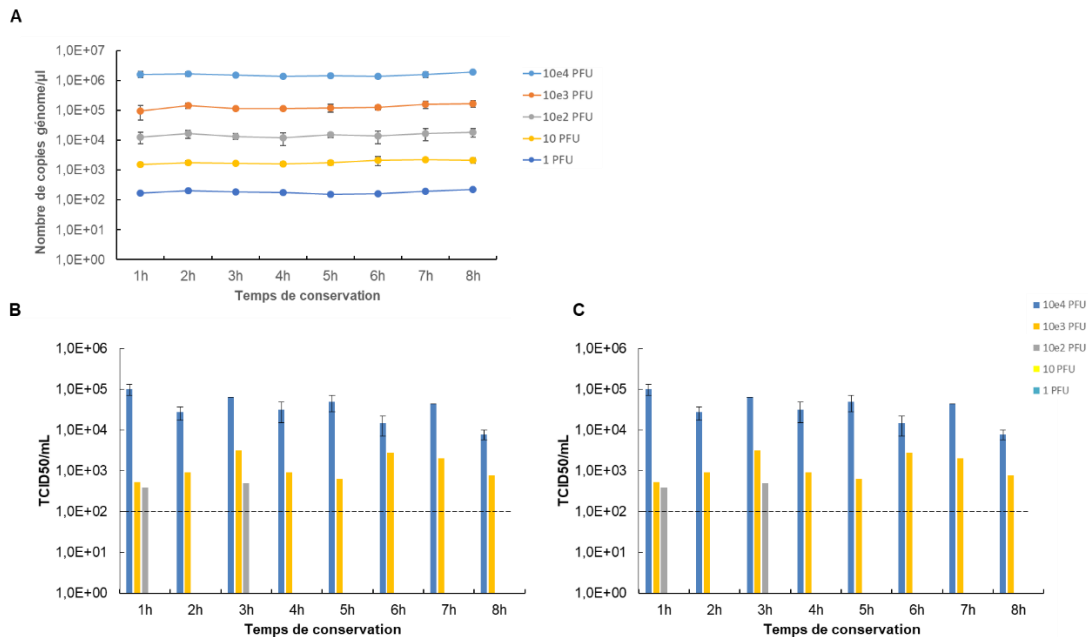
Les laits crus de chèvre ont été artificiellement contaminés avec des doses croissantes comprises entre 1 et  $10^5$  PFU de la souche TBEV isolée dans l'Ain en 2020. La stabilité du virus dans le lait cru et l'influence de la durée de conservation (de 1h à 8h post-contamination avec collecte de lait toutes les heures puis à 12h, 24h, 48h et 72h post-contamination) ont été testées à différentes températures (4°C, 22°C et 37°C) correspondant à la température de conservation réfrigérée, à la température ambiante et à la température du corps humain. La quantification des génomes viraux totaux et des particules infectieuses a été réalisée par RT-qPCR spécifique de TBEV et TCID50 respectivement.

Le génome viral TBEV est stable au cours des temps précoces analysés dans les laits conservés à 4°C, 22°C et 37°C (Figure 14A). L'infectiosité du virus est quantifiable pour des titres supérieurs à  $10^2$  TCID50/mL. Nous observons un maintien du titre en particules infectieuses pour les doses de virus  $10^5$  et  $10^4$  PFU lorsque le lait est conservé

à 4°C et 22°C. Pour les doses les plus faibles, nous observons une diminution du titre en particules infectieuses lorsque la température augmente (Figure 14B, C).

L'analyse de l'infectiosité de TBEV dans les laits conservés à 37°C n'a pas été possible pour le moment. Une destruction du tapis cellulaire a été obtenue. Nous émettons l'hypothèse qu'une cytotoxicité pourrait résulter du lait chauffé, congelé puis décongelé pour analyse. Une optimisation de la technique de culture cellulaire est nécessaire. L'analyse des échantillons collectés aux temps tardifs est en cours de réalisation. Nous réaliserons également une nouvelle analyse de la quantité de génomes totaux suite à un traitement des échantillons à la RNase, dans le but d'éliminer les ARN libres dans les laits et ainsi obtenir une quantification des ARN génomiques de particules virales complètes infectieuses ou non.

La persistance de TBEV dans le lait cru de vache sera également analysée comme décrit dans ce paragraphe.



**Figure 14 : Stabilité du virus TBEV dans le lait cru de chèvre.** (A) Le génome viral total est stable au cours des huit premières heures de conservation de lait à 4°C, 22°C et 37°C. L'infectiosité de TBEV est stable dans les laits dopés aux doses  $10^4$  et  $10^3$  PFU conservés à 4°C (B) et 22°C (C). La ligne pointillée indique la limite de lecture du TCID50 après laquelle aucun effet cytopathique est visible. Les données présentées ici résument deux expériences indépendantes.

### 3.2.2.3 Fabrication de fromages contaminés et persistance de TBEV dans les fromages

Des fromages au lait cru de chèvre et au lait cru de vache de type faisselle, fromages frais et affinés pendant une et deux semaines seront fabriqués après contamination artificielle de lait cru et validés dans le laboratoire P3 Icube Zoonose. La méthode de quantification des virus infectieux à partir d'une matrice fromage sera alors mise au point. La persistance du virus dans les différents types de fromage et dans le lactosérum sera alors testée par TCID50 sur des cultures de cellules Vero. La limite de détection des virus infectieux dans les fromages sera ensuite déterminée en fabriquant de nouveaux fromages avec des concentrations de virus décroissantes. La quantité de virus infectieux sera également évaluée dans le lactosérum, phase liquide du lait au moment de la formation du caillé. Des mesures de pH, d'activité de l'eau et de concentration en sel seront réalisées sur chacun des fromages fabriqués. Cette partie du projet sera réalisée sous l'encadrement de Sandrine Lacour.

Ces études ont fait l'objet d'un financement AMI 2022 Epi&Persist (Co-Coordinatrice avec Laure Bournez, budget 35 000€).

### 3.2.2.3 Conclusion - Perspectives

Je souhaiterais par la suite déterminer la dose minimale infectieuse par la voie orale correspondant à une troisième composante du risque de transmission par la voie alimentaire. A ce jour, l'infection par la voie alimentaire de modèle murin n'a été que peu concluante, mais les doses de virus utilisées étaient limitées et

mériteraient d'être investiguées plus amplement. Nous développerons un modèle d'infection *in vivo* de TBEV par la voie alimentaire pour caractériser les facteurs pouvant influencer la pathogénicité de TBEV suite à cette infection. Nous étudierons l'impact de la dose inoculée ainsi que le rôle du lait sur l'immunopathogénicité de TBEV. Différentes doses de TBEV seront inoculées en *per os* ( $10^6$  à  $10^2$ ) et le développement des signes cliniques et des anticorps, la virémie et le poids des souris seront suivis. Cette étude est couplée à un projet complémentaire mené par Nolwenn Dheilly sur la caractérisation de la voie d'infection de TBEV suite à l'ingestion de produits laitiers contaminés et le rôle du microbiote dans la modulation de la pathogénicité du virus. Deux hypothèses seront testées : (i) les dommages causés au tractus gastro-intestinal par TBEV et la translocation des bactéries intestinales qui en résulte provoquent un déficit immunitaire responsable d'une pathogénicité accrue du virus et (ii) TBEV interagit physiquement avec des microbes dans le lait ou dans l'intestin de l'hôte qui modulent sa pathogénicité. Ce projet a été financé par l'INRAE (budget : 10 000€) et la saisine « APAFIS #36094: Mise au point d'un modèle d'infection *in vivo* du virus de l'encéphalite à tiques par la voie alimentaire et rôle du microbiote intestinal » a été acceptée par le Comité d'éthique d'expérimentation animale du site de Maisons-Alfort en novembre 2022.

## 4. Projets de recherche et perspectives pour le futur

### 4.1 Contexte

Le groupe « Zoonoses équine et Neurovirologie » offre un environnement idéal pour poursuivre mes recherches en épidémiologie par le développement de programmes de surveillances nationaux pour suivre la distribution géographique de WNV, USUV et de tous flavivirus émergents dans l'avifaune et chez les équidés et en virologie fondamentale par l'étude des interactions moléculaires hôte(s)-virus transmis par les arthropodes (principalement moustiques) et plus particulièrement les mécanismes moléculaires sous-tendant les différences de tropisme, de virulence et de pathogénicité des "*Culex-borne*" flavivirus en fonction de l'hôte vertébré considéré. Un dernier volet d'étude correspond aux co-infections WNV et USUV dans l'avifaune. Les co-infections peuvent être insignifiantes, préjudiciables ou même bénéfiques, et ces résultats peuvent se produire par le biais de multiples niveaux d'interaction, notamment la modulation de la réponse de l'hôte, l'altération des performances des tests de diagnostic et les interactions entre médicaments pendant le traitement.

L'avifaune joue un rôle prédominant dans l'épidémiologie des maladies émergentes, l'amplification, la transmission et la dispersion d'agents pathogènes à potentiel zoonotique. Certains oiseaux sauvages ont la particularité de pouvoir se déplacer rapidement sur de longues distances. Les zones humides situées le long des routes migratoires permettent la concentration de nombreuses espèces aviaires, favorisant ainsi la transmission intra- et inter-espèces et jouant un rôle important dans la dispersion virale locale et à longue distance [81, 82]. Il est maintenant nécessaire d'examiner comment les oiseaux contribuent à l'évolution de WNV et USUV dans le cadre d'infection simple ou multiple, et d'identifier les relations moléculaires conservées et différentielles qui existe entre ces virus et les différentes espèces aviaires plus ou moins sensibles à l'infection par WNV et USUV [83].

La compétence des espèces aviaires européennes sensibles à l'infection par WNV et/ou USUV sera également évaluée.

Une comparaison de la pathobiologie de ces deux virus chez l'hôte équin, aviaire et humain sera entreprise par un approche protéomique et transcriptomique. Nous identifierons ainsi les protéines virales qui contribuent aux différences de pathogénicité de WNV et USUV chez leurs différents hôtes ainsi que les protéines différentiellement ciblées par celles-ci, nous utiliserons une combinaison d'approches interactomiques et transcriptomiques.

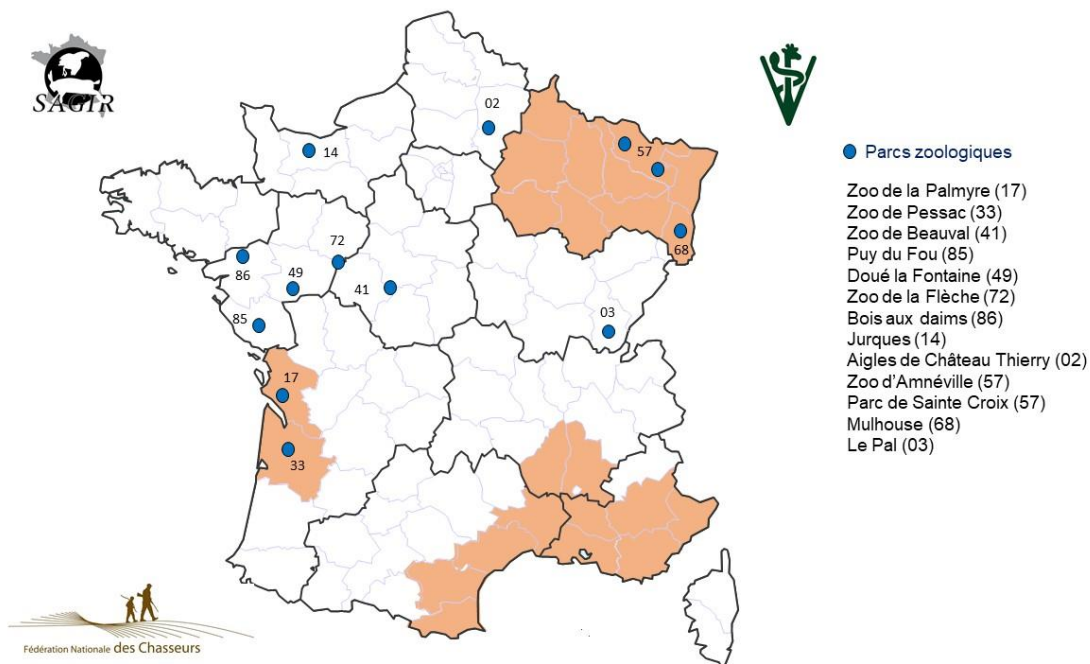
### 4.2 Renforcement de la surveillance nationale des virus West Nile et Usutu

#### 4.2.1 Contexte

Le système de surveillance français de WNV et USUV consiste en une surveillance événementielle des cas de mortalité dans l'avifaune sauvage en collaboration avec le réseau SAGIR et sur des enquêtes de séroprévalence réalisées dans les douze parcs zoologiques membres de l'AFVPZ ayant accepté de collaborer à la suite des épizooties WNV/USUV en France en 2018.



L'efficacité de ce type de surveillance repose sur la sensibilisation et la motivation des acteurs de terrain que sont les découvreurs/collecteurs du réseau SAGIR et les vétérinaires des parcs zoologiques ainsi que sur l'étendue de la zone géographique considérée. Les données obtenues par le LNR sur la circulation de WNV et USUV en France métropolitaine ne sont donc pas le reflet exact de la situation de terrain. En effet, celles-ci correspondent à la distribution de WNV et USUV lors des saisons de transmission (de juin à novembre) obtenus par détection moléculaires des génomes viraux sur le foie, la rate et l'encéphale d'oiseaux sauvages collectés dans les départements du pourtour méditerranéen et du Nord-Est de la France (Figure 15). Les corvidés, turdidés, laridés, accipitridés, colombidés, galliformes et passériformes seront les espèces prioritairement envoyées au LNR.



**Figure 15 : Carte de la surveillance événementielle des cas de mortalité dans l'avifaune en France métropolitaine.** Les départements colorés en orange sont ceux pour lesquels un renforcement de la collecte des carcasses d'oiseaux sauvages est établi lors de la saison de transmission de WNV et USUV (de juin à novembre 2022). Les points bleus indiquent les parcs zoologiques (membres de l'AFVPZ - Association Francophone des Vétérinaires de Parc Zoologique) participant aux enquêtes de séroprévalence WNV-USUV en lien avec le LNR West Nile.

La co-circulation de ces deux flavivirus en Europe est fréquente, non seulement en termes de distribution géographique mais également en termes de prévalence au sein de différentes espèces aviaires et de moustiques *Culex* spp. Il a été démontré que 34 espèces aviaires appartenant à 11 ordres sont sensibles à l'infection par WNV et USUV [84-86]. Les moustiques *Culex pipiens* ont été identifiés comme vecteurs principaux des deux virus en Europe et se nourrissent préférentiellement sur les pies et les merles [87]. Par conséquent, les cycles de transmission de WNV et USUV se chevauchent considérablement dans de nombreux pays européens. La co-infection WNV-USUV dans l'avifaune reste cependant rare. L'Allemagne a reporté pour la première fois en 2021 la co-infection de 6 individus appartenant à l'ordre Passeriformes (2), Strigiformes (2), Charadriiformes et Anseriformes [88].

Notre objectif à court terme est de renforcer, étendre et rendre plus flexible le système de surveillance intégré éprouvé en utilisant l'avifaune française (les oiseaux sauvages et captifs) et la faune sauvage comme sentinelles afin de cartographier la distribution et la prévalence des flavivirus (ré)émergents et ainsi adapter nos stratégies de surveillance en fonction du contexte épidémiologique local et temporel.

Notre objectif à long terme est de disposer d'un système de surveillance actif nous permettant d'objectiver une circulation précoce de WNV et USUV dans l'avifaune afin d'alerter les composantes de la surveillance humaine et équine avant l'apparition des premiers cas d'infection et ainsi prendre les mesures de préventions et de lutte adaptées.

Pour cela, nous prévoyons d'une part, d'étendre le réseau des parcs zoologiques avec lequel nous travaillons à l'ensemble du territoire et d'autre part de réaliser des enquêtes sérologiques et une recherche systématique des génomes viraux d'intérêt dans le foie, l'encéphale et la rate d'hôtes aviaires perpétuant le cycle de transmission de WNV et USUV. La circulation des deux virus sur le territoire est objectivée lorsque des cas symptomatiques et/ou des cas de mortalité sont diagnostiqués. Nous émettons l'hypothèse que ces deux virus peuvent circuler chez des espèces d'oiseaux asymptomatiques et abondantes et pourraient induire une mortalité occasionnelle plus ou moins forte soit suite à l'émergence de souches virulentes, soit suite à l'évolution des souches et à l'adaptation de ces dernières, soit en raison d'une plus grande sensibilité des hôtes aviaires accidentels. Dans ce dernier cas, l'hôte aviaire amplificateur pourrait ne pas correspondre à celui qui présente une virémie suffisante et une mortalité plus élevée, mais un autre hôte présentant une virémie plus faible mais permettant un maintien plus long de l'infection virale.

#### 4.2.2 Surveillance active dans l'avifaune sauvage

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées sur l'avifaune sauvage ces dernières années en Grèce [89], en Italie [90] et en Allemagne [62] principalement. Au cours de ces études, la recherche des génomes des virus WNV et USUV sur dans les organes d'oiseaux sauvages déposés dans les centres de soins puis décédés ainsi que d'oiseaux morts collectés est réalisée en complément d'enquêtes sérologiques sur ces oiseaux lorsqu'un prélèvement sanguin était possible. Les oiseaux ainsi analysés appartiennent principalement aux ordres Passeriformes, Colombiformes et Falconiformes. Les taux de prévalence et séroprévalence d'USUV et WNV se sont avérés plus élevés chez les Colombiformes, plus particulièrement chez le pigeon commun (*Columba palumbus*). Cette espèce a également été détectée comme co-infectée par les deux virus.

Au vu de ces résultats, notre attention s'est tout d'abord portée sur les espèces de colombidés en France à savoir le pigeon ramier, le pigeon colombin, la tourterelle des bois et la tourterelle turque. Ces espèces aviaires constituent des espèces grégaires et abondantes réparties sur l'ensemble du territoire notamment dans les zones urbanisées. Seule la tourterelle des bois est une espèce migratrice stricte qui quitte la France pour le Sahara pour hiverner. Les trois autres espèces sont des espèces sédentaires retrouvées à moins de 20 km de leur nid. Les colombidés cités ci-dessus pourraient donc être utilisés comme sentinelles afin de surveiller la circulation de WNV et USUV en France pour identifier des régions d'exposition aux deux virus.

L'ordre Passeriformes et plus particulièrement les familles turdidés (le merle commun, la grive) et corvidés (pies bavardes, corbeaux) constituent également des espèces de choix pour la surveillance des deux virus d'intérêt.

J'ai établi une collaboration fructueuse avec les écoles vétérinaires d'Alfort, Nantes et Toulouse nous permettant d'avoir accès à une diversité de cadavres d'oiseaux collectés dans ces centres de soin pour la recherche des génomes viraux dans le foie, la rate et l'encéphale de ces individus. Des enquêtes de séroprévalence sont également menées sur les individus admis en phase de soins.

Les CHU Faune-Sauvage d'Alfort, Toulouse et Nantes accueillent majoritairement des oiseaux (respectivement 85%, 60% et 60% des entrées) et des mammifères (respectivement 15%, 40% et 20%). Les espèces aviaires sont fortement représentatives de la faune urbaine et péri-urbaine. Les colombidés (pigeon biset, pigeon ramier) et les passeriformes (merle commun, pie bavarde) sont les plus représentés. Les falconidés et les strigidés sont également couramment retrouvés dans les CHU de Toulouse et Nantes.

Un système de priorisation des échantillons à analyser par le LNR pour chacun des virus a été mis en place en fonction de trois paramètres : (i) la probabilité de circulation des virus dans les départements, (ii) l'espèce aviaire considérée et (iii) la période de l'année au cours de laquelle l'échantillon est collecté (Figure 16). La probabilité de circulation des virus dans un département est évaluée en fonction de sa localisation et de la détection antérieure de cas positifs. Un score de 3 à 1 sera attribué par département en fonction de la probabilité de circulation des virus. Plus la probabilité est élevée, plus le score est grand. L'ordre Columbiformes, Passeriformes, Falconiformes (WNV uniquement), Accipitriformes (WNV uniquement) et Strigiformes (USUV uniquement) sont principalement ciblés pour la détection des virus WNV ou USUV et se verront attribuer un score de 3. Tout échantillon collecté lors de la saison de transmission, définie entre juin et novembre, sera analysé en priorité (score de 3). Ceux collectés avant (janvier à mai) et après la saison de transmission (novembre-décembre) se verront attribuer respectivement un score de 2 et 1.

## A) Paramètres de priorisation

### 1. Départements à risque



### 2. Période de collecte des échantillons



### 3. Espèces aviaires



## B) Surveillance pour WNV



## C) Surveillance pour USUV



**Figure 16 : Système de priorisation des organes aviaires (foie, rate et encéphale) à analyser pour la détection moléculaire des génomes viraux West Nile et Usutu.** (A) Trois paramètres sont pris en compte : (1) le département dans lequel les carcasses sont collectées, (2) la période de collecte des échantillons et (3) l'espèce aviaire considérée. Un score de 3 (couleur rouge) est attribué pour les départements dans lesquels un cas positif a été détecté, pour des collectes lors de la saison de transmission (de juin à novembre) et pour les espèces aviaires appartenant aux ordres : Passeriforme, Colombiforme, Strigiforme et Accipitriforme. Un score de 2 (couleur orange) est attribué aux départements limitrophes des départements à risque, pour des périodes de collecte en amont de la saison de transmission (janvier à mai) d'espèces aviaires différentes de celles citées ci-dessus. Un score (couleur beige) de 1 est attribué aux départements non cités précédemment, pour des collectes, réalisées en décembre, d'espèces aviaires autres que celles citées en (3). Des cartes spécifiques sont ainsi établies pour la surveillance WNV (B) et USUV (C).

### 4.2.3 Surveillance active dans l'avifaune captive

Je poursuis la collaboration avec l'AFVPZ en demandant une participation d'un plus grand nombre de parcs zoologiques répartis sur le territoire métropolitain. Nous proposons de disposer des pièges à moustiques dès la mise en évidence d'un premier cas positif dans un zoo en collaboration avec Vincent Raquin, entomologiste (UMR 754 Infections Virales et Pathologie Comparée, Université Claude Bernard Lyon 1). Nous demandons également un prélèvement des oiseaux commensaux des zoos lorsque ceci est possible afin d'obtenir des informations sur la séroprévalence d'USUV et WNV dans l'avifaune sauvage.

### 4.2.4 Méthodes de diagnostic pour le suivi épidémiologique renforcé

#### 4.2.4.1 Développement de méthodes de prélèvement peu invasif

Sur les espèces aviaires présentant une probabilité élevée ou modérée d'infection par WNV et/ou USUV au cours de la période de transmission ou suite à celle-ci, des prélèvements sanguins concomitant aux soins prodigués dans les CHU, seront réalisés sur tubes secs et EDTA et conservés à -20°C. Une goutte de sang sera également disposée sur papiers buvards Whatman (FTA cards) pour chaque individu. Ces buvards permettront un stockage des échantillons à température ambiante. Une miniaturisation de la technique d'extraction utilisée en routine par le LNR sera développée à partir des deux types d'échantillons. Le temps de conservation des papiers buvards et l'impact de celui-ci sur la qualité et la quantité de l'ARN extrait seront également analysés. Afin d'optimiser le système de surveillance nationale dans l'avifaune pour la détection précoce et le suivi de la présence d'USUV et WNV, nous examinerons la pertinence de différents types d'échantillons prélevés sur oiseaux vigiles (prise de sang et écouvillons oro-pharyngés et cloacaux) ou décédés (écouvillons oro-pharyngés et cloacaux) pour la détection du génome viral ou d'anticorps spécifiques de chacun des virus. Il a été démontré que les écouvillons

cloacaux et oro-pharyngés présentait une charge virale équivalente à celle retrouvée dans le cerveau, le foie ou la rate des individus infectés par WNV et USUV. La détection des génomes viraux dans ces échantillons alternatifs est optimale par RT-qPCR jusqu'à 22 jours post-conservation des plumes et est identique entre les échantillons cloacaux, oro-pharyngés et plumaires. Cette seule étude publiée récemment a été réalisée sur un faible nombre d'individus appartenant à l'ordre des Passeriformes (principalement des merles communs) et requiert confirmation sur d'autres espèces aviaires cibles de l'infection telles que les chouettes (ordre des Strigiformes). Cette approche confirmera la nécessité de combiner des approches de détection sérologique et moléculaire pour mettre en évidence une circulation précoce de WNV et USUV en France. Par conséquent, cela permettra d'identifier les prélèvements *ante-mortem* et *post-mortem* plus faciles à obtenir que le sang/sérum, pour lequel le volume minimal nécessaire pour les analyses est souvent difficile à atteindre chez les oiseaux, ou que les organes cibles nécessitant la collecte de carcasses entières suivi des étapes fastidieuses d'autopsie et d'envoi au LNR West Nile.

Un échantillonnage pilote sera réalisé dans un premier temps sur les CHU Faune sauvage de Nantes et Toulouse. La thèse vétérinaire d'Elsa Charpentier encadrée par Philippe Gourlay (DVM, PhD, CHU-FS Nantes) et moi-même a débuté en janvier 2023.

#### 4.2.4.2 Optimisation des méthodes de diagnostic moléculaires

Le plan de surveillance nationale français sur l'émergence ou la réémergence de ces deux virus dans l'avifaune repose sur une surveillance événementielle et comprend une détection moléculaire des deux virus dans des organes cibles de l'infection par deux RT-qPCR indépendantes. Un total de 328 organes a été analysé par le LNR au cours de ces 4 dernières années. Le coût total de cette activité (comprenant le coût en consommables, équipements et temps en ressource humaine) est estimé à environ 10000€ [91].

Une étude préliminaire réalisée dans l'équipe a permis d'observer que les méthodes de diagnostic moléculaire en place ont une sensibilité limitée à 500copies génomes/ $\mu$ L pour WNV et 50 copies génomes/ $\mu$ L pour USUV, et réduite à 1000 copies pour WNV quand l'individu est co-infecté. Pour ce faire, dans le cadre des activités du LR-UE Maladies Equines, nous développons actuellement une RT-qPCR triplex via la technologie TaqMan permettant de détecter en une seule réaction la présence des génomes viraux de WNV et/ou USUV dans des organes et sangs équinés et aviaires. Notre objectif est d'obtenir une sensibilité de détection des génomes viraux WNV et USUV tout aussi sensible que celle obtenue pour chacune des duplex, permettant le diagnostic d'une co-infection WNV-USUV quel que soit la charge virale de chaque virus dans l'organe considéré. L'utilisation de cette méthode réduira de moitié les coûts d'analyse pour un diagnostic différentiel WNV / USUV des cas suspects d'infection dans l'avifaune. Nous souhaitons accréditer cette nouvelle technique par le COFRAC et la mettre à disposition des LNR Européens sur le site web du LR-UE Maladies équinés.

Plusieurs pays européens réalisent une surveillance active par l'analyse des cas suspects d'infection WNV ainsi que par l'euthanasie d'oiseaux résidents sentinelles sélectionnés [91] [62, 90]. La surveillance épidémiologique active de l'émergence ou la réémergence de WNV et USUV nécessite donc l'intervention d'organismes le plus souvent volontaires permettant la collecte de prélèvements (OFB, FDC, vétérinaires mandatés, etc.), l'envoi aux laboratoires aptes à réaliser les analyses et la transmission des résultats aux autorités compétentes. Ce type de surveillance et d'alerte précoce est plus coûteux et consiste en l'analyse par RT-qPCR de type TaqMan d'un nombre conséquent d'échantillons (organes ou sangs) le plus souvent négatifs pour l'identification des virus WNV et USUV. Il est indispensable de développer une méthode de détection à grande échelle de ces deux flavivirus plus rentable et applicable aux activités de surveillance dans les pays endémiques, y compris ceux dont les ressources et l'expertise sont limitées.

Notre objectif est de déployer un RT-qPCR panflavivirus via la technologie SybrGreen [92] [93] afin de dépister la présence de génome flaviviraux sur les échantillons collectés lors de nos enquêtes de prévalence décrites dans le précédent paragraphe. Nous testerons la spécificité et la sensibilité de cette technique dont les performances seront au minimum comparables à celles obtenues par la technologie TaqMan. Cette méthode sera également évaluée sur des échantillons terrains. Cette technologie permettra de déployer un système de surveillance actif à moindre coût.

Le renforcement du plan de surveillance annoncé dans le paragraphe 4.2 nécessite également l'emploi de technologie haut-débit. Pour ce faire, nous disposons, en collaboration avec la plateforme IdentityPath de l'ANSES au laboratoire de santé des aliments à Maisons-Alfort, du thermocycleur LightCycler 1536® (Roche). Un total de 1536 réactions de RT-PCR ou de PCR temps réel (fonction de la nature de l'échantillon : ARN ou ADN) sont faites en une fois sur une plaque de 1536 puits. Le volume réactionnel est faible (0,6 à 2µL), réduisant ainsi le coût (0.065€ / réaction). Nous adapterons donc la RT-qPCR panflavivirus sur ce thermocycleur et testerons ainsi en une seule réaction 1536 prélèvements aviaires d'intérêt collectés dans les CHU.

Une fois ces trois méthodes de diagnostic moléculaire optimisées, il nous sera possible de déployer différents outils de diagnostic moléculaire en fonction du contexte épidémiologique local et temporel et ainsi déterminer rapidement si les virus USUV et WNV circulent en France métropolitaine (Figure 17).

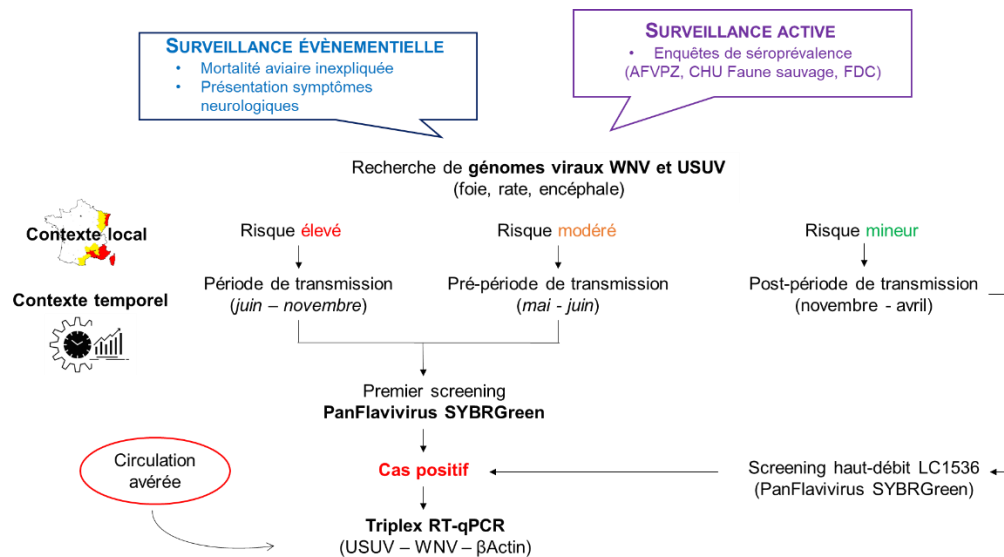


Figure 17 : Schéma décisionnel de l'utilisation des outils de diagnostic moléculaire à prioriser dans le cadre de la surveillance des flavivirus WNV et USUV en France métropolitaine en fonction du contexte local et temporel.

#### 4.2.4.3 Optimisation des méthodes de diagnostic sérologique

L'analyse sérologique de chevaux ou d'oiseaux manifestant des symptômes neurologiques repose en première intention sur la technologie ELISA. Celle-ci n'est cependant pas suffisamment spécifique pour permettre une identification précise du flavivirus à l'origine de l'infection et requiert l'utilisation d'une méthode de référence longue et laborieuse, la séroneutralisation. Ce système de surveillance plus actif de la situation épidémiologique de WNV et USUV en France nécessite le développement de méthode(s) de diagnostic peu coûteuse(s), moins fastidieuse(s) et moins chronophage(s). L'objectif de ce projet est de développer une méthode d'analyse basée sur l'utilisation des nouvelles technologies de biologie cellulaire pour mesurer le caractère infectieux des souches WNV et USUV en temps réel en surveillant l'apparition d'effets cytopathiques (ECP) induits par WNV et USUV et mesurer l'inhibition des ECP par des anticorps neutralisants spécifiques contenus dans les sérums des individus infectés par WNV ou/et USUV. Il s'agira à moyen terme d'étudier l'effet de chacun des virus sur la croissance, la morphologie et la viabilité des cellules Véro. La réponse cellulaire due aux ECP générés suite à l'infection serait donc retardée suite à une diminution de la dose infectieuse. La neutralisation des particules infectieuses par des anticorps spécifiques devrait également bloquer voire diminuer la réponse cellulaire à l'infection. Le suivi de l'infection en temps réel par la mesure du CI permet d'obtenir le titre en anticorps neutralisant en omettant la lecture visuelle des ECP opératoire dépendante et fastidieuse.

Nous émettons l'hypothèse que l'apparition d'ECP directement corrélé à des modifications de la croissance, de la morphologie et de la viabilité cellulaire est spécifique d'un virus (voire d'une souche donnée) et d'un modèle cellulaire donné. Cette technologie pourra être également utilisée pour étudier la persistance de WNV et USUV

dans différentes cellules aviaires/moustiques et tester l'efficacité de molécules antivirales. La spécificité et donc la protection croisée des anticorps WNV et USUV sera également testée par ce système.

En parallèle, le projet IMPEC « Imagerie temps réel par spectroscopie d'impédance pour le suivi et l'analyse d'infections cellulaires par des agents pathogènes viraux et bactériens » pour lequel je suis coordinatrice a été déposé à l'appel à projet Amorçage de l'université Paris-Est Créteil en novembre 2022 (budget : 48 000€).

Ce projet mettra en commun les expertises de l'unité Virologie de l'équipe ZEN (Dr G. Gonzalez), l'unité Virus entérique du laboratoire de sécurité des aliments (LSAI, Dr S. Martin-Latil), l'unité Zoonoses bactériennes (Dr K. Larouveau) et le laboratoire Electronique, Systèmes de Communication et Microsystèmes (ESYCOM) - UMR 9007, CNRS, Université Gustave Eiffel (Dr Olivier Français, Dr Lionel Rousseau et Dr Gaëlle Lissorgues). IMPEC vise à étendre le champ d'application de l'impédancemétrie pour développer un système s'appuyant sur de la spectroscopie d'impédance large bande [100 Hz – 1 Mhz]. Nous associerons, aux mesures, des modèles électriques permettant l'extraction en temps réel de paramètres images de l'état cellulaire. Nous nous intéresserons notamment au suivi de la capacité membranaire des cellules, dont l'évolution est souvent le reflet de l'infection. Ce projet doit permettre de mettre en place des indicateurs innovants permettant d'imager les effets cytopathogènes induits par la présence d'un agent pathogène, en temps réel et de manière non invasive sur des modèles cellulaires d'intérêt pour l'étude des pathologies équine telles que les cellules de derme équin. La mise en œuvre des cultures cellulaires, de l'infection et du suivi des effets induits par la présence de micro-organismes s'effectuera dans un premier temps sur des dispositifs existants monofréquence (de type xCELLigence) à partir desquels nous développerons une instrumentation dédiée permettant une mesure en spectroscopie d'impédance multifréquence et multiplexée. Les mesures obtenues seront associées à des modèles électriques pour en déduire des indicateurs d'états physiologiques cellulaires en lien avec les différents agents pathogènes. En lien avec les résultats obtenus, un prototype de mesure sera développé afin d'aboutir à la conception d'un micro-dispositif large bande « à façon » dont la réalisation s'appuiera sur les moyens en microfabrication en salle blanche disponible au sein du laboratoire ESYCOM.

Ce projet pluridisciplinaire fédère une nouvelle collaboration entre 3 laboratoires ayant des expertises et compétences complémentaires (Biologie, Physique, MicroTechnologies). La problématique de santé que porte le projet, est au cœur des axes de recherche de ces 3 laboratoires. Ce projet permettra de valider les développements mis au point. Ces derniers pourront être appliqués non seulement à d'autres agents pathogènes, mais également d'ouvrir la voie pour des études en spectroscopie d'impédance sur des modèles 3D (de type organoïdes) d'infection cellulaire, outils en cours de développement au LSA et LSAI. Le remaniement des interactions cellulaires et/ou cellules-pathogènes pourrait être analysé via cette nouvelle microtechnologie "à façon" permettant de répondre à de nombreuses questions ouvertes en virologie et bactériologie. On pourra étendre ces travaux à de la tomographie d'impédance pour de l'imagerie 3D des propriétés diélectriques des organoïdes.

#### **4.2.5 Cartographie nationale de la distribution et de la prévalence de WNV, USUV et TBEV en France dans la faune sauvage mammifère.**

Le virus West Nile est susceptible d'infecter une grande diversité d'espèces de mammifères sauvages telles que les chevreuils, les cerfs [94-96], les écureuils [97, 98], les rongeurs, les canidés [99] [100], les ours, les lagomorphes [101] [102], etc.

Ces dernières décennies, l'expansion des populations de chevreuils et de sangliers a été fulgurante en France. Selon les données de l'OFB, 1,5 à 2 millions d'individus sont présents dans toutes les régions y compris l'arc méditerranéen. Aux Etats-Unis, des enquêtes de séroprévalence sur les prélèvements de chevreuils et de cerfs se sont révélées des indicateurs fiables de l'activité de certains arbovirus [103] tels que WNV [94] [95], le virus de l'encéphalite de Saint Louis (SLEV) et le virus de l'encéphalite équine de l'Est [104]. Le taux de séroprévalence de WNV dans ces deux populations variait de 6% à 18,7%.

En Europe, peu de données sont disponibles sur le taux de séroprévalence de WNV et USUV dans la faune sauvage mammifère. Des études menées en France, en Espagne et en Serbie ont démontré la présence

d'anticorps spécifiques dirigés contre WNV et USUV chez les chevreuils, les cerfs et les sangliers [96] [65, 105]. Notre objectif est d'obtenir une cartographie au plus proche de la situation épidémiologique de WNV, USUV et TBEV en France. Au vu du nombre d'individus et de leur distribution géographique, nous émettons l'hypothèse que ces populations d'ongulés seraient des espèces sentinelles complémentaires à l'avifaune sauvage pour évaluer la distribution et la prévalence de WNV et USUV en France métropolitaine et obtenir des données complémentaires aux données de séroprévalence dans les troupeaux de bovins obtenues en collaboration avec Laure Bournez.

Nous avons entrepris en collaboration avec la Fédération des Chasseurs, une détection sérologique par ELISA puis séroneutralisation de WNV et USUV dans des sérums de grands gibiers collectés depuis 2010 dans les départements du pourtour méditerranéen et dans le Grand-Est ainsi que la recherche des génomes viraux correspondant dans les prélèvements de rate obtenu sur ces mêmes individus. Nous avons également entrepris, en collaboration avec l'équipe dirigée par Emmanuelle Gilot (Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558 CNRS - Université Claude Bernard Lyon 1 - VetAgro Sup) de réaliser une analyse sérologique rétrospective de prélèvements de populations de chevreuils collectés depuis 2010 sur 3 sites : Chizé (79), Trois-Fontaine (51) et Toulouse (31). Ces précieuses échantillothèques constituées de milliers de sérums nous permettront d'alimenter la carte de distribution actualisée des flavivirus en France et confirmera la circulation de ces virus dans des zones non identifiées par notre système de surveillance dans la faune sauvage mammifère.

### 4.3 Situation exceptionnelle de circulation de West Nile et Usutu en région Nouvelle Aquitaine

#### 4.3.1 Contexte

Depuis 2022, il a été mis en évidence une circulation de WNV en Gironde et dans un corridor territorial situé au nord de Bordeaux. Ceci est nouveau, car si le virus circule de manière connue en Europe et dans le sud-est de la France depuis au moins le début des années 1960, avec des épisodes récurrents d'intensité plus élevée se manifestant par des cas humains et équin, il n'avait jamais été détecté sur la sud-ouest du pays. Par ailleurs, la circulation d'USUV, est attestée dans l'avifaune sauvage de plusieurs départements de Nouvelle Aquitaine. En 2022 et 2023, les premiers cas humains infectés par USUV ont été détectés (Gironde/Landes) dans cette partie du territoire français. Cette co-circulation de deux arbovirus transmis par les moustiques du genre *Culex* en Nouvelle Aquitaine n'est pas pour plusieurs raisons :

- Elle est avérée dans les compartiments aviaires, humain, vectoriel et, s'agissant du WNV, chez les équins. Comme attendu, les cas humains d'infection à WNV étaient de gravité variable, allant de formes très peu symptomatiques à des formes neurologiques sévères. Dans ce contexte, la survenue de cas humains d'infection à USUV dont la présentation clinique s'avère proche représente un enjeu diagnostique.
- En 2023, cette circulation est retrouvée de manière répétée sous la forme de cas humains au sein de la métropole bordelaise et ses environs, chez les équidés et l'avifaune, mais également chez le moustique, ce qui indique qu'un cycle de transmission est installé localement avec un réservoir aviaire (et les possibilités inhérentes de dissémination spatiale par les oiseaux) et des moustiques infectés dans des zones de contact répété de ces populations de *Culex* avec l'homme. En résumé, les éléments sont réunis pour une circulation continue pendant la période estivale et l'automne, avec donc la possibilité que surviennent de nouveaux cas humains.

#### 4.3.2 Développement d'un réseau « One Health » local en Gironde

Dès 2022, des actions de recherche intégrée de type « One Health » ont été initiées pour mieux caractériser la circulation virale de WNV dans son éco-environnement et ses conséquences sanitaires.

Un consortium de recherche régional (Direction Départementale de la Protection des Populations de Gironde et l'unité des maladies tropicales et du voyageur, CHU Bordeaux) associé à des partenaires nationaux dont le LNR



West Nile et le CNR arbovirus a entrepris de produire de manière coordonnée des données scientifiques dans les secteurs humain, vétérinaire et entomologique.

Ces données ont prouvé leur utilité cruciale en complément des données de surveillance institutionnelles. Par exemple, au-delà de la seule observation de cas humains (WNV et USUV) rapportés par les cliniciens, confirmés par le CNR des arbovirus et dont le suivi est réalisé par Santé Publique France, et des cas équin (WNV) rapportés par les vétérinaires et confirmés par le LNR West Nile, ce consortium a produit des données de séroprévalence équine et de détection virale chez les moustiques qui ont considérablement fait évoluer l'appréhension de la situation: l'image de cas ponctuels au sein de la ville de Bordeaux s'est transformée en l'identification d'un cycle actif de circulation qui englobe certes la métropole bordelaise, mais s'étend bien au-delà vers le Nord. Ceci a été confirmé par la détection de cas équin (WNV) et humains (WNV et USUV) au Nord de Bordeaux et dans le Sud du département de la Charente Maritime, ainsi que par la détection d'une surmortalité chez les flamants du Chili (*Phoenicopterus chilensis*) hébergés par le Zoo de la Palmyre (West Nile). L'importance de ce constat est telle qu'elle a mené le SECPROCH du HCSP à proposer de maintenir le diagnostic génomique viral du WNV (qui permet également l'identification du génome d'USUV) chez les donneurs de sang en Gironde, mais aussi à l'étendre à la Charente Maritime avant même la survenue des premiers cas humains et vétérinaires dans ce département.

Prises dans leur ensemble, ces données préliminaires et pour l'instant parcellaires, suggèrent déjà la circulation active des arbovirus WNV et USUV tous deux transmis par les moustiques du genre *Culex* dans un vaste socio-écosystème s'étendant de la métropole bordelaise aux deux rives de l'estuaire de la Gironde, qui pourrait se prolonger en amont dans les zones de marais situées le long des axes fluviaux Garonne et Dordogne, ainsi que de l'Isle (affluent majeur de la Dordogne). D'autres zones des deux départements semblent également propices à la circulation de ces deux agents mais n'ont pour l'heure pu être investiguées (ex : Bassin d'Arcachon avec en particulier l'estuaire de la Leyre ; estuaires de la Seudre et de la Charente ainsi que les marais côtiers entre Rochefort et La Rochelle). Ceci est d'importance si l'on considère la proximité immédiate de ces zones de circulation putatives avec les aires urbaines densément peuplées d'Arcachon, Libourne, Royan, Rochefort ou La Rochelle.

L'objectif principal de ce projet est d'accélérer l'acquisition de connaissances sur la circulation, la dissémination et la transmission du WNV et USUV dans la région Nouvelle-Aquitaine, zone de nouvelle émergence. Pour atteindre son objectif principal, ce projet vise à (1) cartographier le risque d'infection au niveau régional, en tenant compte des informations entomologiques, aviaires, équin et humaines basées sur le réseau de surveillance One Health mis en place en Gironde en 2022 ; (2) identifier l'origine géographique des virus WNV et USUV introduits dans la région Nouvelle-Aquitaine ; (3) renforcer le fonctionnement de la plateforme intégrée d'étude de la circulation des arbovirus *Culex* dans les différents compartiments épidémiologiques et ses déterminants socio-écosystémiques en région Nouvelle-Aquitaine ; (4) diffuser et communiquer les résultats aux parties prenantes concernées, et construire une feuille de route pour renforcer et améliorer la recherche opérationnelle. Le projet nous permettra d'acquérir une vision intégrée du risque que constituent WNV et USUV au niveau régional et national.

Le consortium décrit précédemment s'est récemment structuré en Association loi 1901 nommée « Groupe One Health de Recherche et d'Investigation des Arboviroses et autres maladies infectieuses émergentes – Nouvelle Aquitaine » (ORHIA-NA) dont je suis la Vice-présidente.

Deux financements d'urgence ont été obtenus en septembre 2023 par le consortium ORHIA-NA auprès de l'ANRS MIE (budget total : 50 000€ dont 10 000€ pour l'équipe ZEN) et le LabEx IBEID (budget total : 100 000€ dont 20 000€ pour l'équipe ZEN) afin d'initier ce projet de recherche.

ORHIA-NA participera également à la réponse à l'appel à projet Prezode 2024 sur le renforcement de la surveillance des arboviroses et l'application de nouvelles méthodes de détection en étroite collaboration avec les équipes de recherche évoluant sur le pourtour méditerranéen en région Camargue (Université de Montpellier - équipe NERVE (Neuroinfections and EmeRging VirusEs), CIRAD – UMR ASTRE, etc.) ayant développé une recherche opérationnelle différente compatible avec l'écosystème local.

#### 4.4 Compétence des espèces aviaires prévalentes en France à WNV et USUV

Notre hypothèse générale est que la propagation limitée de WNV en Europe, en comparaison à sa propagation massive sur le continent américain ou à celle d'USUV en Europe, est due à une moindre sensibilité des espèces aviaires européennes à l'infection par ce dernier, combinée à une faible prévalence des espèces d'oiseaux européens les plus sensibles sur le continent. La vérification de cette hypothèse nécessite une compréhension plus aboutie de la compétence des hôtes aviaires européens pour les souches de WNV circulant sur le continent. L'importance des espèces d'oiseaux en tant qu'hôtes amplificateurs dépend de leur sensibilité à l'infection, de la durée de la virémie à un niveau suffisamment élevé pour infecter les moustiques qui se nourrissent, de l'attrait de l'espèce aviaire pour les moustiques vecteurs et du taux de mortalité, y compris la mortalité spécifique au virus, des individus infectés [106]. Depuis 1955, 77 espèces d'oiseaux appartenant à 29 familles et 12 ordres ont été inoculées expérimentalement avec différentes souches de WNV [107, 108]. Ces infections expérimentales ont été utilisées pour caractériser la durée et l'intensité de la virémie dans le sang des oiseaux, données à partir desquelles la compétence de l'espèce ; sa capacité à transmettre le WNV à un moustique lors d'un repas sanguin ; est déduite. Ces études ont démontré l'étendue de la gamme d'espèces aviaires sensibles à WNV, mais ont également révélé des variations importantes de la compétence entre des espèces étroitement apparentées. Actuellement, la compétence des espèces d'oiseaux européens vis-à-vis de WNV et d'USUV n'a pas été évaluée de manière approfondie, ce qui limite notre capacité à déterminer le risque de circulation de ces deux virus en fonction de la prévalence et des mouvements des oiseaux.

##### 4.4.1 Tester la sensibilité des hôtes aviaires par culture *ex vivo* de cellules primaires et sur organoïdes

Les infections expérimentales d'oiseaux ont été essentielles pour évaluer le potentiel des différentes espèces à servir d'hôtes amplificateurs, pour caractériser la pathobiologie de l'infection par différentes souches virales et pour évaluer l'efficacité des vaccins et des agents thérapeutiques. Cette approche présente cependant des limites. Contrairement à d'autres animaux de laboratoire tels que les souris, chez les oiseaux, l'utilisation d'un grand nombre d'individus n'est pas toujours possible, en particulier si l'espèce cible n'est pas élevée en captivité [107]. La collecte d'oiseaux sauvages à des fins scientifiques est limitée et nécessite obligatoirement l'obtention au préalable d'autorisations gouvernementales de collecte et de mise en captivité. Ces expériences nécessitent également un équipement particulier et se révèlent être très coûteuses. L'hétérogénéité des individus collectés (âge, sexe, condition physique, exposition antérieure à des agents pathogènes, etc.) et le bien-être animal (minimiser le stress, manipulation par des personnes expérimentées en condition appropriées, procédures de prélèvements adaptés, etc.) sont des paramètres à prendre en compte lors de l'analyse et de l'interprétation des résultats. Il est désormais essentiel de développer des outils innovants, biologiquement pertinents et reproductibles, représentant une réelle alternative à l'expérimentation animale sur l'avifaune sauvage. Parmi ceux-ci, les cultures cellulaires *in vitro* permettent de limiter le recours aux prélèvements répétitifs. L'obtention de cellules souches ayant une capacité de prolifération et de différenciation importante est un atout pour répondre à cette préoccupation. Ces cellules souches peuvent être utilisées à la fois sous leur forme non différenciée, mais de façon plus intéressante dans un modèle de différenciation contrôlée dans un lignage d'intérêt. Cette différenciation peut se faire dans des conditions adhérentes (2D) ou tridimensionnelles (3D). Il y a un intérêt grandissant à obtenir ces structures qui s'auto-organisent et qui se différencient en même temps pour mimer un tissu dans son architecture et sa fonction.

Dans un objectif de remplacement et de réduction, mon objectif est d'exploiter la percée réalisée dans la culture de cellules souches et la production d'organoïdes pour mettre au point un système de culture de cellules souches pluripotentes induites aviaires issues du merle afin d'obtenir des modèles cellulaires 2D puis 3D, notamment cérébraux, qui permettront de prédire la pathogénicité des souches WNV et USUV dans l'avifaune française.

Les cellules somatiques de merle seront obtenues soit à partir de bulbes plumaires soit par prélèvements sanguins lors de réception d'animaux au centre hospitalier universitaire faune sauvage de l'école vétérinaire de Toulouse (collaboration Dr Guillaume Le Loch, CHU faune sauvage de Toulouse). Les échantillons seront mis dans un milieu de prolifération permettant l'expansion des cellules de différents phénotypes par l'addition dans le

milieu de culture d'un cocktail de facteurs de croissance et de cytokines. Ce traitement permettra de ne pas dériver que des fibroblastes, même s'ils sont souvent majoritaires. Pour les cellules sanguines, un milieu favorisant la prolifération des cellules hématopoïétiques sera utilisé contenant les cytokines ad hoc selon le procédé de production de précurseurs T2EC [109] ou monocytaires. Les cellules somatiques seront alors transduites avec des transposons inductibles permettant l'expression de gènes de reprogrammation comme OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4 et NANOG comme précédemment utilisés dans les espèces poulet et canard [110] et aussi utilisé dans le modèle mandarin diamant (*Taeniopygia guttata*) (données non publiées). Le gène ESRRB sera également utilisé pour renforcer la plasticité des cellules reprogrammées. Il est attendu l'apparition de colonies qui seront prélevées, amplifiées et caractérisées. Les cellules reprogrammées, ainsi obtenues, seront ensuite induites à différencier dans la voie neurale à l'aide d'un changement de milieux de culture, notamment par l'utilisation du milieu N2/B27 en présence d'inducteurs proneuraux comme l'acide rétinoïque, l'hormone thyroïdienne, etc. Les cellules différenciées seront analysées aux niveaux morphologique, moléculaire et immunocytochimique selon la disponibilité des anticorps pouvant croiser avec le mandarin (Passereau). Selon l'avancée des expériences, les structures 3D organoïdes cérébraux seront envisagées.

Nous chercherons à déterminer si WNV et USUV infectent et se répliquent différemment (ou non) dans les cellules de merle aux stades iPSCs, cellules neurales (2D), organoïdes cérébraux (3D). A chacune des étapes de différenciation de reprogrammation cellulaire, la capacité répliquative de chacun des virus sera étudiée à une multiplicité d'infection variant de  $10^{-3}$  à 1. En tant que Laboratoire National de Référence WNV et flavivirus émergents, nous disposons d'une souchothèque WNV et USUV. Nous nous concentrerons sur la lignée 2 du WNV qui a affecté l'avifaune sauvage en France en 2018 (Genbank accession number : MT863561.1) [18] et la lignée 1 du WNV New-York 1999 hautement pathogène chez les oiseaux sauvages d'Amérique du Nord [3], ainsi que sur deux souches d'USUV isolées en France en 2015 (Europa 3, Genbank accession number : KX601691.1) et en 2018 (Africa 3). Afin d'évaluer la répllication et la dissémination des virus dans ces cellules, nous réaliserons une cinétique d'infection, le titrage des particules virales infectieuses, par dilution au point final (TCID50) et la quantification de l'ARN viral dans les surnageants collectés quotidiennement jusqu'à 7 jours post-infection. Les effets cytopathiques et la mort cellulaire seront surveillés respectivement en mesurant la viabilité cellulaire par un test MTT et en quantifiant l'expression de l'activité de la caspase 3 par cytométrie de flux.

La réponse immunitaire à l'infection varie en fonction de la sensibilité de l'hôte. Il est bien caractérisé que les oiseaux utilisent la voie OAS (2'-5' oligoadenylate synthase) qui inhibe la répllication virale et induit l'apoptose [74]. Une comparaison des profils transcriptomiques de cellules aviaires résistantes et sensibles à WNV et/ou USUV sera réalisée avec l'aide de Nolwenn M. Dheilly. La prédiction de la sensibilité de certaines espèces aviaires européenne à différentes souches de WNV et d'USUV circulants en Europe pourra être évaluée et les facteurs de l'hôte réservoir qui le protègent de l'infection et qui permettent au virus de se maintenir à long terme dans ces oiseaux, seront identifiés.

#### 4.4.2 Pathobiologie de WNV et USUV chez des hôtes aviaires sensibles

L'écologie des hôtes aviaires sensibles ou résistantes à WNV et USUV ainsi que le comportement alimentaire des moustiques sont étroitement liés à leur épidémiologie [111] [112]. Il a été démontré que différentes espèces de moustiques vont présenter des comportements alimentaires différents. Les moustiques *Culex* préfèrent se nourrir en première intention sur les hôtes aviaires puis sur les hôtes mammifères y compris l'Homme et le cheval. En Europe, leur hôte préférentiel est le merle commun (*Turdus merula*) comme décrit dans différentes études [87] [113]. D'autres espèces d'oiseaux, comme le moineau (*Passer Domesticus*), le pigeon domestique (*Columba livia*) et les pies, pourraient être occasionnellement choisies par les moustiques dans les endroits où les merles sont moins abondants. Ainsi, le merle est probablement l'espèce d'oiseau en Europe la plus exposée à la fois à WNV et à USUV.

En effet, des merles ont été trouvés exposés ou infectés par WNV à plusieurs reprises [87], bien que ce virus n'ait jamais provoqué d'événements de mortalité massive tels que ceux décrits pour l'USUV pendant la saison de transmission. A ce jour, aucune étude expérimentale a été menée sur les merles européens. Ainsi chez ces oiseaux, la dynamique d'infection des deux virus, et surtout le niveau et la durée de la virémie, restent inconnus. Mon objectif est de tester expérimentalement, sur merle commun et autres espèces potentiellement compétentes telles que la pie ou l'oie la compétence de ces espèces à l'infection par WNV et USUV (n= 25 individus). Nous comparerons ainsi la pathobiologie de WNV et d'USUV chez ces espèces « cibles ». Nous émettons l'hypothèse que le merle (et/ou autres espèces sensibles identifiées) ne développe pas de virémie suffisante permettant l'infection de moustiques suite à une primo-infection par WNV alors que celle-ci est très

élevée suite à une infection par USUV entraînant la mort rapide de l'hôte. Nous définirons la virulence de chacun des virus ainsi que la réponse immunitaire et la compétence de l'hôte. Cette expérience sera menée en Belgique, à Sciensano reconnu comme expert en expérimentation *in vivo* sur l'avifaune. Les oiseaux seront suivis quotidiennement pour détecter des signes cliniques tels qu'une dépression (ataxie, prostration), une désorientation, un port de tête anormal, des tremblements, des troubles moteurs et des anomalies oculaires. Du 1<sup>er</sup> jour au 7<sup>ème</sup> jour p.i., les oiseaux seront quotidiennement pesés et soumis aux prélèvements suivants : sang/sérum, plumes et écouvillons oro-pharyngés et cloacaux. Lors du décès ou l'euthanasie des oiseaux, la présence de l'ARN des virus sera quantifiée dans la peau, l'intestin, le cœur, le poumon, le foie, la rate et le cerveau, ainsi que dans les écouvillons oraux et les plumes. L'histologie et l'immunohistochimie seront réalisées sur les tissus d'organes fixés pour détecter les lésions inflammatoires et la présence d'antigène viral à l'aide d'un anticorps produits « in house » dirigé contre le domaine III de la protéine d'enveloppe de WNV ou d'USUV. La détection d'une réponse immunitaire innée à l'infection par WNV ou USUV sera effectuée en examinant la présence d'anticorps neutralisants spécifiques à chacun des virus ainsi que l'activation de la voie OAS par RT-qPCR.

La diversité génétique des quasi-espèces virales sera caractérisée à l'aide du séquençage par amplicons.

Les zones génomiques à l'origine de toute différence de transmissibilité entre USUV et WNV seront identifiées par des approches interactives complémentaires en utilisant une banque d'ADNc de moustiques *Culex* que nous développerons dans le cadre de cette tâche.

En complément des expérimentations *in vivo* réalisées sur pies, nous collecterons les tissus neuraux et/ou hépatiques afin de générer des banques d'ADNc indispensables à l'étude comparative de la pathobiologie de WNV et USUV en fonction de l'hôte considéré développé dans le paragraphe « 4.4.3 Pathobiologie comparée des virus WNV et USUV chez les hôtes aviaires, équins et humains ».

Nous identifierons ainsi les mécanismes et les facteurs favorisant l'augmentation de la virulence, de la transmissibilité et/ou du changement d'hôte de WNV et/ou USUV.

Cette étude sera réalisée dans le cadre du projet européen HORIZON-CL6-2022 - Ecology of infectious animal diseases intitulé « Ecology of Wildlife, Livestock, huMan and Infectious Diseases in changing environments (WiliMan-ID) » (Coordinateur : C. Citti (INRAe), budget total : 6M€).

Le groupe ZEN est bénéficiaire de ce projet et porte l'axe sur le pathosystème « West Nile et Usutu ». Un budget total de 250k€ a été alloué à ce pathosystème.

Je suis identifiée comme cheffe de projet (task leader) pour l'identification des déterminants moléculaires impliqués dans l'augmentation de la virulence, de la transmissibilité et/ou du changement d'hôte des cinq pathosystèmes étudiés (WNV/USUV, peste équine, peste porcine africaine, grippe aviaire, prions) et adjointe au responsable du pathosystème WNV-USUV.

Un étudiant en thèse sera recruté sur cette partie.

#### **4.4.3 Pathobiologie comparée des virus WNV et USUV chez les hôtes aviaires, équins et humains**

##### *4.4.3.1 Contexte*

Les virus WNV et l'USUV se maintiennent dans un cycle de transmission enzootique utilisant des moustiques du genre *Culex* comme vecteurs et des oiseaux résidents ou migrants comme hôtes amplificateurs et réservoirs [84]. Les piqûres de moustiques peuvent provoquer une infection accidentelle chez un certain nombre de mammifères [114]. Malgré leurs similitudes, les deux virus présentent une pathobiologie contrastée. Aux États-Unis, la dissémination de WNV en 1999 a été dramatique, provoquant une épidémie avec le recensement de nombreux cas neurologiques chez les humains, les chevaux et les oiseaux [115]. Les États-Unis a été le pays qui a signalé le plus grand nombre d'infections par WNV chez l'Homme chaque année. Cependant, en 2018, pour la première fois, le nombre total de cas déclarés d'infection humaine par le WNV était plus élevé en Europe qu'aux États-Unis. Pour les équidés, l'impact économique est également considérable. Une étude menée sur l'épizootie de WNV de 2015 en Camargue, a estimé un coût total de près de 80 000€ pour la région [116] [14]. La mortalité généralisée chez les oiseaux sauvages est devenue la principale signature de l'émergence du WNV sur le continent américain. Le virus Usutu n'y circule pas et n'a pas encore été détecté. En Europe, WNV provoque des épidémies imprévues et de grande ampleur chez les équidés et les humains [117] [118], alors que les infections

d'USUV chez l'Homme restent rares : une centaine de cas ont été signalés jusqu'à présent en Europe, avec le développement de formes asymptomatiques et de formes neurologiques de type méningo-encéphalite ou encéphalite [117, 119, 120]. Les chevaux sont infectés par USUV mais ne développent pas de signes cliniques. En revanche, alors que la plupart des oiseaux européens infectés par WNV subissent une infection subclinique et ne développent pas de signes cliniques [85, 121], USUV est responsable d'innombrables décès [122] de merles d'Eurasie et de chouettes lapones.

Les flavivirus sont des formes de vie intracellulaires obligatoires, dont la survie nécessite un détournement des processus cellulaires et le développement de mécanismes d'échappement immunitaire par le biais d'interactions protéine-protéine (IPP) virus-hôte [123]. L'exploitation virale des processus cellulaires est largement menée par des interactions physiques entre les protéines virales dédiées et les protéines de l'hôte. Nous supposons que les IPP virus-hôtes sont en grande partie responsables de la pathobiologie des flavivirus transmis par les moustiques, y compris le spectre d'hôtes, le potentiel zoonotique et la virulence de ces derniers. Plusieurs approches systématiques et non biaisées visant à identifier les facteurs de l'hôte impliqués dans la réplication des flavivirus ont été menées à ce jour. Un inventaire solide des interactions entre le virus et les protéines de l'hôte a été établi entre les protéines de WNV et les protéines cellulaires humaines, principalement à l'aide de l'approche double hybride en levures (Y2H) [124, 125]. Cependant, les déterminants moléculaires de l'interaction de WNV et d'USUV avec la machinerie cellulaire aviaire et équine n'ont pas été caractérisés. Nous proposons de comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant les différences de tropisme, de virulence et de pathogénicité de WNV et USUV chez l'hôte. Pour ce faire, nous utiliserons plusieurs approches de biologie moléculaire permettant d'identifier des interactions directes physiques entre protéines virales et protéines cellulaires telles que le double hybride ou l'interactomique. Celles-ci seront complétées par une approche de co-précipitation d'affinité associée à une identification des partenaires protéiques par spectrométrie de masse, en particulier pour les protéines ne générant pas ou peu d'interactants par double-hybride. L'approche interactomique et l'interactomique (spécifique aux espèces aviaires d'intérêt) devraient permettre de dresser un tableau systématique comparatif des voies de signalisation, des modules fonctionnels et des mécanismes cellulaires qui sont soit conservés et probablement essentiels à la réplication et à la propagation de WNV et USUV, soit hautement spécifiques d'un virus particulier et contribuent aux variations de la virulence spécifique à l'espèce.

La validation fonctionnelle de ces interactions sera réalisée par interférence ARN sur modèles cellulaires pertinents et par génétique inverse. L'interférence ARN sera utilisée pour tester l'impact de l'absence de certains interacteurs cellulaires sur la réplication virale de WNV et USUV sur modèles cellulaires adaptés en fonction de l'hôte considéré. Un suivi du niveau d'expression des protéines pro-virales qui permettent et renforcent l'infection virale (dépendance à l'égard de l'hôte) et des protéines anti-virales qui empêchent la réplication et la propagation virale (facteurs de restriction) sera réalisé. En complément, des virus chimériques seront créés à l'aide de la méthode de génétique inverse "infectious subgenomic amplicon" (ISA) [74] pour confirmer le rôle des régions génomiques virales dans la pathogénicité, le tropisme et la virulence du WNV et USUV : nous générerons des clones infectieux du WNV contenant les régions génomiques de l'USUV identifiées comme déterminants moléculaires viraux de la pathogénicité et du tropisme chez le merle et inversement. L'aptitude virale et le suivi des effets cytopathiques et de la mort cellulaire seront évalués *in vitro*.

#### 4.4.3.2 Méthodologie

##### 4.4.3.2.1 Interactomique

Afin d'identifier les fonctions des protéines d'USUV et les comparer à celles décrites du virus West Nile dans la pathogenèse virale et/ou la restriction d'hôtes, nous réaliserons une recherche systématique de partenaires cellulaires humains, équins, aviaires (pies) et moustiques pour l'ensemble des ORFs (orféome) viraux par l'approche double hybride en levure initiée par l'équipe BIOR et utilisée en routine à l'UMR Virologie. Le principe du double-hybride repose sur les propriétés du facteur de transcription Gal4, codé par la levure, lequel comprend deux domaines fonctionnels : DNA-binding domain (DBD), activating domain (AD) [126]. Le domaine DB se fixe spécifiquement sur son promoteur tandis que le domaine AD permet la transactivation d'un gène rapporteur, par exemple le gène histidine 3 (His3) qui permet la croissance des levures en absence d'histidine (Figure) [127].

Ces deux domaines peuvent être découplées et fusionnées à une protéine appât et une protéine proie dont on cherche à tester l'interaction. Quand l'appât et la proie n'interagissent pas, les deux domaines du facteur Gal4 restent dissociés, la transcription du gène His3 n'est pas activée et les levures ne peuvent donc pas se développer sur un milieu dépourvu d'histidine. En revanche, si l'appât et la proie interagissent, le facteur Gal4 est reconstitué et peut activer le gène rapporteur His3, permettant alors la croissance des levures. L'ensemble des ORFs des virus d'intérêt seront tout d'abord clonés par la technologie Gateway. Cette méthode permet le transfert de manière directionnelle par recombinaison homologue des séquences d'intérêt amplifiées par PCR dans un vecteur d'entrée (pDONR207 ; réaction BP), lesquels peuvent ensuite être transférés par une seconde réaction (réaction LR) dans différents vecteurs d'expression en fonction des applications souhaitées. Le protocole de criblage passe par l'utilisation des souches de levure Y2H-Gold et Y187. Ces souches sont transformées respectivement par un vecteur contenant l'ORF virale (l'appât) fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-DB) et par un vecteur contenant une banque d'ADNc comme proie fusionnée au domaine d'activation de Gal4 (Gal4-AD). Ces vecteurs sont réunis par conjugaison des deux souches de levure de type sexuel opposé et les deux protéines chimères (l'appât et la proie) sont testées pour leur interaction par transactivation du gène rapporteur His3. La dernière partie du protocole consiste à amplifier à l'aide d'amorces génériques l'ADNc de la proie cellulaire impliquée dans l'interaction et à séquencer le produit amplifié. Afin d'automatiser l'analyse des électro-chromatogrammes de séquence, un BLAST multiparallèle dirigé contre différentes banques (ENSEMBL, GenBank, Uniprot) a été développé en collaboration avec Yannick Blanchard et les bioinformaticiens de l'ANSES de Ploufragan. Enfin, les interactants peuvent être représentés sous forme de cartes grâce au logiciel Cytoscape.

#### 4.4.3.2 Interferactomique sur différentes espèces aviaires

D'après la littérature, l'infection par WNV est caractérisée par une forte transcription des ISGs (interferon stimulated genes) conduisant à une forte activité antivirale à l'origine notamment d'une réponse apoptotique [128, 129]. Les flavivirus sont des formes de vies intracellulaires obligatoires qui ont évolué et se sont adaptés afin de s'établir chez un hôte donné. Cette évolution au niveau moléculaire leur permet non seulement de pénétrer et de se répliquer dans un environnement cellulaire et moléculaire inédit mais également de neutraliser les défenses antivirales de l'hôte [130-133]. De très nombreuses protéines cellulaires sont ciblées par les virus pour bloquer la voie IFN par diverses stratégies [134]. Le détournement viral des processus cellulaires est largement médié par des interactions binaires entre des protéines virales dédiées et des protéines critiques de l'hôte afin d'établir un équilibre optimal entre réplication virale et survie de l'hôte. Le rôle de certaines protéines de WNV dans la modulation/altération de la réponse IFN-I a été décrit [135]. Ces antagonismes ont cependant été rapportés dans des systèmes cellulaires issus uniquement de l'espèce humaine. Il est possible de définir une liste restreinte de 16 gènes de la voie IFN qui sont ciblés dans les deux tiers des interactions décrites entre protéines virales et protéines cellulaires (Vitour et al ; revue en préparation). Comparer les mécanismes d'inhibition de la voie IFN par WNV et USUV dans différentes espèces aviaires différentiellement sensibles à l'infection permettra d'identifier de nouveaux antagonismes viraux et notamment des antagonismes spécifiques aux hôtes chez qui les virus se comportent de façon opposée. Pour ce faire, le clonage des 16 gènes de la voie IFN (RIG-I, MDA5, MAVS, TRIF, IKK, STAT2, STAT1, NEMO, STING, TRAF3, TBK1, PKR, IKK $\beta$ , TYK2, IRF7 et IRF3) sera réalisé par une société prestataire (Twist bioscience), en collaboration avec l'équipe BIOR de l'UMR de Virologie, à l'origine de l'approche « interferactomique ». Nous nous concentrerons sur trois espèces sensibles : le merle commun (*Turdus Merula*), le pigeon domestique (*Columba livia*) et la pie bavarde. Chaque ORF virale sera criblé individuellement contre ces « mini-banques » à l'aide de la méthode NanoLuc PCA (Protein Complementation Assay). Cette méthode est basée sur la reconstitution de l'activité de la Nano-Luciférase, chacune des protéines étant exprimées en fusion avec des fragments complémentaires non actifs de la Nano-luciférase. Quand une interaction a lieu, ces deux sous-domaines se lient et restaurent la fonctionnalité de la Nano-luciférase dont l'activité est proportionnelle à l'intensité des interactions.

#### 4.4.3.2.3 Validation des interactions

##### C. Validation biochimique

Lorsque les interactions candidates entre protéines de merle et de pie de la voie IFN-I et protéines virales seront identifiées, le projet passera à l'étape de la validation biochimique de ces interactions (IPP). Ces confirmations seront réalisées tout d'abord par chromatographie d'affinité de type GST Pull Down, en condition de surexpression dans les cellules 293T. Si la transfection des cellules primaires aviaires est possible et en fonction des anticorps disponibles pour les espèces concernées, des essais analogues pourront être conduits pour mettre en évidence les IPP.

##### D. Validation fonctionnelle

Afin de préciser la fonction des protéines identifiées, comme facteurs de dépendance ou de restriction des flavivirus WNV et USUV, nous éteindrions leur expression par interférence ARN (ARNi) et déterminerons les conséquences sur l'infection virale de différentes cellules cibles par immunomarquage des cellules infectées avec un anticorps anti-DIII-WNV ou DIII-USUV et quantification par imagerie haut contenu/haut débit, et sur la production de particules virales infectieuses, par dosage TCID50 sur les surnageants. Nous utiliserons des pools de 4 siRNA commerciaux. Les conditions de transfection optimales des cellules humaines A549 ont été établies par le groupe de Jennifer Richardson à l'UMR Virologie qui a obtenu une diminution de l'expression des ARNm compris entre 84 et 99%. L'optimisation de transfection des autres types cellulaires sera réalisée au cours de ce projet. Nous nous attendons à ce que le knockout des facteurs de restriction et de dépendance virale augmente ou diminue la réplication virale.

Si la transfection des cellules primaires aviaires est possible et en fonction des anticorps disponibles pour les espèces concernées, des essais analogues pourront être conduits pour mettre en évidence les IPP. La dernière partie du projet sera consacrée à la validation fonctionnelle des IPP confirmées et à l'évaluation biologique de leur impact sur la voie IFN. Notre laboratoire et précisément l'équipe I5 ayant une grande expérience de l'étude de la réponse IFN au virus de la fièvre catarrhale ovine (Bluetongue virus, BTV) (Doceul et al, 2014), les outils pour investiguer la voie IFN sont disponibles dans l'unité.

Cette étape nous permettra également d'identifier des gènes viraux candidats pouvant être reconnus comme déterminants moléculaires de virulence de WNV et/ou USUV selon l'hôte considéré (aviaire, équin, moustique ou humain).

##### E. Génétique inverse

Afin de valider la fonction d'un gène viral comme déterminants moléculaires de virulence, des stratégies de génétique inverse peuvent être développées pour chaque gène candidat et l'atténuation de la virulence évaluée *in vitro* ou *ex-vivo* sur modèles cellulaires adaptés avant de tester les virus chimériques d'intérêt en expérimentation animale.

Nous nous proposons d'échanger les régions génomiques entre les virus WNV et/ou USUV en utilisant la technologie ISA afin de générer des virus chimériques présentant une diminution voire une perte de leur infectiosité et pathogénicité dans un modèle cellulaire donné. Des résultats différents sont attendus pour une même chimère si celle-ci infecte des lignées cellulaires ou des cellules primaires aviaires, équines, moustiques ou humaine.

#### 4.4.3.3 Résultats préliminaires

Les ORFéomes complets de WNV Israël 1998, WNV Italie 2008 (WNV lignée 1), WNV France 2018 (WNV lignée 2), USUV France 2015 (lignée Europa 3), France 2016 (lignée Africa 3), France 2018 (lignée Africa 3) ont été clonés par la technologie Gateway dans un plasmide pPC97 qui contient la séquence Gal4-DB.



Nous disposons de deux banque d'ADNc issues de l'Homme (A549) et du cheval (cellules PBMC). Nous devons désormais acquérir les banques d'ADNc issues de moustiques *Culex* (cellules Hsu) et de pies (cellules primaires isolées du foie) pour réaliser une recherche comparative des partenaires cellulaires des virus cités ci-dessus.

A ce jour, nous avons donc criblé 10 protéines virales de WNV France 2018 et 10 protéines d'USUV Africa 3 (2018) contre la banque humaine A549. L'identification de 408 interactions protéines virales – protéines cellulaires a été permise. Nous avons pu identifier au total 42 interacteurs cellulaires, dont un peu moins de la moitié ont été identifiés deux fois ou plus. Ce crible constitue la première analyse des IPP entre USUV et l'Homme.

L'analyse comparative des interactions conservées ou spécifiques entre les protéines de l'hôte (l'Homme) et les protéines virales de différents flavivirus est réalisée préférentiellement entre WNV et les virus Dengue et Zika, deux flavivirus d'importance en santé humaine [131].

Nous avons identifié un manque de connaissance sur les IPP entre WNV et USUV et les facteurs cellulaires des acteurs principaux de leur cycle de transmission, à savoir l'avifaune, les moustiques *Culex* et le cheval, hôte mammifère sensible à l'infection par WNV uniquement. Compte tenu des nombreuses similitudes ainsi que des différences frappantes dans le spectre d'hôtes, la pathogénèse et la virulence de WNV et USUV, des études comparatives devraient être utiles pour mettre en évidence les IPP qui distinguent la pathobiologie de ces deux virus et la transmission inter-espèces pour chacun d'eux.

Nous émettons l'hypothèse que plusieurs groupes d'IPP seront ainsi mis en évidence. Nous envisageons (i) d'identifier des interactions virus-hôte conservées entre les différents hôtes qui seraient susceptibles d'être essentielles pour la réplication et la propagation plus générale des *Culex*-borne flavivirus et (ii) d'identifier des interactions hautement spécifiques d'une souche virale particulière pour un hôte donné. Les mécanismes moléculaires et voies de signalisation responsables de sa virulence/pathogénicité et/ou de sa transmission inter-espèces pourront être soulignés. Nous supposons qu'USUV ne disposerait pas des mécanismes moléculaires optimaux lui permettant de détourner la machinerie cellulaire et ainsi échapper au système de défense antivirale des équidés et de l'Homme, ce qui pourrait expliquer pourquoi ce virus présente un faible potentiel zoonotique pour le moment en comparaison à WNV. Dans l'avifaune, ce scénario serait différent. Le virus USUV posséderait les armes virales nécessaires permettant d'échapper au système immunitaire aviaire de certaines espèces comme le merle commun ou la chouette lapone et induire une infection rapide et mortelle pour ces derniers avec une transmission optimale du virus aux moustiques *Culex*. Les résultats d'IPP mettront en lumière les mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence et la pathogénicité chez ces hôtes aviaires qui pourraient être similaires à ceux identifiés pour WNV chez l'hôte équin, voire humain. Le virus WNV infecte l'avifaune sans induire de mortalité massive. Les IPP ainsi mises en évidence seront comparées à celles obtenues pour USUV et permettront d'identifier et recentrer les IPP impliquées dans l'infection « usuelle » de l'avifaune et celles impliquées dans la pathogénicité et la virulence.

Concernant les IPP identifiées chez les moustiques, nous émettons l'hypothèse que certaines protéines des moustiques favoriseraient la réplication et la propagation des flavivirus avec une pertinence dans la transmission de ces agents pathogènes aux hôtes mammifères.

#### 4.4.3.4 Conclusion

Mon projet « UsWestar » initié en 2021 sera poursuivi dans le cadre du projet européen HORIZON-CL6-2022 - Ecology of infectious animal diseases intitulé « Ecology of Wildlife, Livestock, huMan and Infectious Diseases in changing environments (WiliMan-ID) » pour lequel nous identifierons les facteurs de l'hôte (aviaire, équin, humain et moustiques *Culex*) qui ont un impact sur la dynamique et l'évolution de WNV et/ou USUV, en particulier ceux liés à la réponse immunitaire. Nous nous attendons à ce que ces résultats contribuent de manière significative à la compréhension actuelle de la façon dont les flavivirus WNV et USUV détournent les fonctions cellulaires, échappent aux défenses antivirales, se répliquent et se disséminent chez les différents hôtes impliqués dans leur cycle de transmission. Grâce à l'identification des IPP clés et de leur rôle en tant que facteurs de dépendance ou de restriction virale, nous espérons définir les déterminants moléculaires des caractéristiques pathobiologiques critiques, telles que le spectre d'hôtes, le potentiel zoonotique et la neurovirulence. Certains peuvent représenter des moteurs moléculaires de l'émergence virale. En outre, ce projet est idéalement

positionné pour fournir des pistes pour des thérapies antivirales dirigées vers l'hôte et affiner les stratégies de lutte qui peuvent être appliquées à d'autres virus émergents.

#### 4.5 Le rôle des co-infections dans les processus d'émergence ou de ré-émergence

L'émergence rapide et continue de maladies infectieuses émergentes ou ré-émergentes représente un sérieux défi en santé humaine et vétérinaire. De multiples facteurs, tels que l'urbanisation, les modifications des écosystèmes dues à la perte de biodiversité et la modification de l'utilisation des sols, la mondialisation et le changement climatique, ont été identifiés comme fortes menaces pour la santé publique et vétérinaire par l'Organisation Mondiale de la Santé [42]. Les maladies infectieuses émergentes, en particulier les maladies à transmission vectorielle, sont étroitement liées aux modifications des processus écologiques influencés par ces facteurs [87]. Les maladies vectorielles les plus notoires comprennent entre autres les arboviroses induites par les flavivirus tels que le virus Zika, le virus de la Dengue, WNV et USUV et également celles induites par les alphavirus comme Chikungunya. Les facteurs anthropogéniques listés ci-dessus influencent la dynamique des populations de moustiques et d'hôtes réservoirs ainsi que la transmission de ces arbovirus. Il a été démontré en Europe du Sud, l'augmentation de la température favorise l'augmentation de la taille des populations de *Culex* spp. au printemps mais diminue la survie des adultes en été [121]. Ces moustiques prolifèrent dans les zones agricoles et urbaines avec un pic larvaire plus précoce dû à l'effet de chaleur urbaine. Parmi les hôtes vertébrés, les populations d'oiseaux sont également impactées. Les comportements migratoires, la richesse et l'abondance des espèces d'oiseaux dans une zone spécifique vont dépendre de ces facteurs [136]. L'émergence des virus Chikungunya et Zika dans les régions où le virus de la Dengue est endémique a créé des scénari intrigants et potentiellement alarmants. En effet, ces trois virus sont transmis par les moustiques *Aedes* spp. et peuvent infecter l'Homme. Il en est de même pour WNV et USUV qui partagent un cycle de transmission commun entre les moustiques du genre *Culex* spp. et différents hôtes aviaires. Ces deux groupes de virus sont donc régis par des facteurs biologiques, écologiques et économiques similaires pouvant entraîner une synergie épidémiologique.

Malgré cette tendance et le défi potentiel en santé publique et vétérinaire, nous ne disposons de peu de données sur le mécanisme et les conséquences des co-infections WNV/USUV chez les différents acteurs du cycle de transmission [137] [138]. De nombreuses questions restent ouvertes et appellent à de nouveaux projets de recherche.

Ces deux flavivirus co-infectants modifient-ils le développement clinique et l'issue de la maladie chez l'hôte aviaire, l'Homme et le cheval? La co-infection est-elle le fruit d'infections successives par plusieurs moustiques ou d'infection unique par un même moustique infecté par les deux virus? Il est également important de comprendre dans quelle mesure la co-circulation et les épidémies et épizooties simultanées de ces deux virus peuvent affecter la dynamique de transmission de WNV et USUV.

L'objectif est donc de comprendre le rôle des co-infections dans le processus d'émergence et de ré-émergence de WNV et/ou USUV chez l'hôte aviaire, chez le moustique *Culex* et chez le cheval.

##### 4.5.1 Impact de la co-circulation de WNV et USUV sur la compétence des moustiques

Un large éventail d'espèces de moustiques peut être infectées par WNV ou USUV. Quatre d'entre elles sont compétentes pour les 2 virus. Il s'agit d'*Anopheles maculipennis s.l.*, *Culex perexiguus*, *Cx. pipiens*, et *Ochlerotatus caspius* pour [84]. La détection simultanée des deux virus a été mise en évidence dans des pools de moustiques *Culex pipiens* uniquement [139]. Il est important de déterminer l'impact de la co-circulation voire la co-infection des espèces vectrices par WNV/USUV sur la compétence connue pour chacun des virus [138]. Une première étude a tenté de répondre à cette problématique. Les auteurs se sont concentrés sur la compétence vectorielle des moustiques *Culex pipiens* aux virus USUV Africa 3 isolé en 2016 aux Pays-Bas et WNV lignée 2 isolé en Grèce en 2010. Les moustiques *Culex pipiens* ont été exposés à chacun des virus individuellement, simultanément ou de façon successive par le biais de repas sanguin artificiel infectieux [138]. Les taux d'infection et de transmission des virus ont été estimés respectivement par quantification de la charge virale dans le corps du moustique et dans la salive. Les premiers résultats sont encourageants. Lors d'infections simultanées de moustiques *Culex pipiens* par WNV et USUV, ces derniers transmettent sélectivement WNV. Il y a cependant une diminution du taux d'infection des moustiques co-exposés aux virus avec un faible taux de transmission des deux virus.

Néanmoins, la pré-infection des moustiques *Culex pipiens* par USUV lors d'un repas sanguin artificiel les rend moins sensibles à l'infection par WNV. Cette pré-infection « protégerait » donc les moustiques de l'infection par WNV. Cependant, lorsqu'USUV est injecté directement dans l'abdomen des moustiques, aucune inhibition de l'infection par WNV est observée. L'intestin des moustiques joue donc un rôle essentiel dans la compétition établie entre USUV et WNV lors de co-infection. Ces résultats sont discordants par rapport à ce qui a été démontré sur la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti* pour ZIKA, DENV et CHIK. Aucune interférence sur le taux d'infection et de transmission de chacun de ces 3 virus a été démontrée en comparaison à une infection simple par chacun des virus [140] [141].

Nous émettons l'hypothèse que plus la distance phylogénétique est établie entre les virus lors de co-infection chez le moustique, moins les interférences en termes de réplication et de transmission sont grandes. Les virus WNV et USUV appartiennent tous deux au clade *Culex* et au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise. Ils sont donc proches phylogénétiquement (similarité de séquence de 76%) et antigéniquement (similarité de séquence de 69%). Comme indiqué précédemment, USUV a une distribution géographique plus étendue que WNV dans le Nord-Ouest de l'Europe. Dans les régions où ces deux virus co-circulent, des repas sanguins successifs peuvent entraîner l'introduction séquentielle de différents agents pathogènes dans l'organisme du moustique. La primo-infection induit donc une réponse immunitaire locale dans les cellules intestinales du moustique qui restreint une surinfection et la transmission d'un nouvel agent infectieux. Ce phénomène est connu sous le nom d'exclusion de la surinfection. Un projet auquel je participe est actuellement en cours dans l'équipe afin d'étudier *in vitro* l'exclusion de la surinfection de WNV lignée 1 (Israël 98 et Italie 2008), WNV lignée 2 (Autriche 2008 et Grèce 2011), USUV Africa 3 France 2018 et ZIKA suite à des infections séquentielles sur les lignées cellulaires de moustiques U4-4 (*Aedes albopictus*) et Hsu (*Culex pipiens*).

Nous nous intéresserons particulièrement aux mécanismes antiviraux déployés par la cellule pour bloquer ou non l'infection successive en fonction de la combinaison de virus employés. Cette étude sera proposée dans le projet ANR « ArboMod » coordonné par Dr. Pauline Ezzano (DR2 INRAE). ArboMod vise à mieux comprendre la dynamique de transmission des arbovirus à plusieurs échelles (au sein du vecteur, au sein de l'hôte vertébré, à l'échelle de la (méta)population) et leurs interactions. L'hypothèse principale est que la dynamique virale intra-hôte et intra-vecteur a un impact sur les épidémies à grande échelle, tout en étant façonnée par des facteurs (a)biotiques distribués de manière hétérogène dans l'espace et le temps.

#### **4.5.2 Impact de la co-circulation de WNV et USUV sur la sensibilité et compétence des hôtes aviaires**

Une des questions non élucidées correspond à la qualité de l'interaction entre les virus co-infectants chez un même hôte. Nous pouvons distinguer quatre hypothèses possibles :

- une synergie de l'infection au cours de laquelle la réplication de chacun des virus est promue.
- une atténuation de l'infection par la mise en place d'un état antiviral non pathogénique.
- une compétition d'infection entre les deux virus : seul le virus vainqueur sera transmis.
- une neutralité lors de l'infection : chaque virus se comporte comme en cas d'infection unique.

Afin de tester ces hypothèses, je propose tout d'abord d'employer des modèles *in vitro* d'infections uniques, simultanées ou successives de lignées cellulaires et de cellules primaires aviaires. Les co-infections jouent un rôle important dans l'évolution virale. Si deux virus peuvent infecter et se répliquer à partir d'une même cellule, des échanges géniques/protéiques lors des cycles de réplication pourraient avoir lieu. De nombreux virus s'opposent cependant activement à la co-infection. De diverses manières, ils modifient une cellule infectée jusqu'à ce qu'elle devienne résistante à l'infection par des virus apparentés. Cet effet est connu sous le nom d'exclusion de la surinfection (SIE) [142, 143]. En laboratoire, nous pouvons établir des expériences dans lesquelles les cellules sont co-infectées simultanément, bien que les chances que deux virus apparentés ou non pénètrent dans un organisme hôte et trouvent exactement la même cellule, au même moment, sont faibles.

Nous émettons l'hypothèse que des virus non apparentés établissent d'abord des infections distinctes à l'intérieur d'un hôte, puis se rencontrent lorsque ces infections se propagent dans les tissus. Comment la SIE contrôlerait-elle ces infections qui se propagent ? Il n'est pas facile de suivre les infections à l'intérieur d'un animal vivant. Nous commencerons par des cellules, en utilisant WNV et USUV qui ne différeront que par la couleur d'une étiquette fluorescente. Ensuite, pour observer la propagation, nous utiliserons le modèle de propagation virale par plaque de lyse. Lorsque différents virus qui se propagent se rencontrent, ou que deux plaques se heurtent, la co-infection ne peut se produire que dans une fine frontière de cellules récemment infectées. Au-delà de ce point, la SIE est pleinement efficace. Mais qu'en est-il des interactions au sein d'une même région de propagation ? Pour étudier cette question, nous avons eu besoin de plaques qui ont commencé avec un mélange des deux virus. Au fur et à mesure que les plaques mixtes se répandent, la co-infection est-elle maintenue ou les plaques se séparent-elles en régions issues d'un seul virus ? Pour créer des plaques mixtes, nous co-infecterons des cellules simultanément, les dissocierons avec de la trypsine, les diluerons, puis les réensemencerons sur de nouvelles plaques de sorte que chaque cellule co-infectée soit une unité formant une plaque. Chaque nouvelle cellule d'une plaque en croissance peut recevoir une grande quantité des deux couleurs de virus avant que la SIE n'entre en jeu. En parallèle, nous infecterons des souris avec les deux virus et observerons les lésions développées, et la localisation de chacun des virus dans les mêmes compartiments anatomiques.

Je caractériserai ainsi la capacité répliquative des virus et réaliserai l'analyse transcriptomique des réponses cellulaires afin d'identifier les mécanismes d'échappement au système de défense antiviral de l'hôte.

Je caractériserai ensuite l'impact des co-infections sur la pathogénie et la virulence de WNV et USUV *in vivo* sur modèle pie, espèce capable de répliquer les deux virus sans induire de décès. Comme décrit précédemment des infections uniques, séquentielles et simultanées seront réalisées. La capacité répliquative des virus isolés du foie, de la rate et de l'encéphale des oiseaux co-infectés sera évaluée en quantifiant le génome total et l'infectiosité des particules virales sur lignées cellulaires de mammifère et aviaire. Une évaluation clinique des individus sera réalisée quotidiennement par une pesée suivie d'une observation subjective de l'animal (grille de score). Un suivi de la virémie et de la charge virale dans les plumes, les écouvillons cloacaux et oro-pharyngés seront entrepris. Une autopsie comparative complète entre les individus mono-infectés et ceux ayant été co-infectés simultanément ou successivement sera entreprise afin de recueillir le maximum d'informations exactes et fiables sur les lésions observées chez ces oiseaux. La charge virale totale et infectieuse sera quantifiée dans les différents organes par RT-qPCR spécifiques ou par TCID50.

## 5. Conclusion générale

Les maladies infectieuses émergentes à transmission vectorielle nécessitent une approche multidisciplinaire mobilisant entre autre la santé publique et vétérinaire, l'épidémiologie, la surveillance, la virologie, l'immunologie, l'entomologie, la recherche clinique, etc. afin d'acquérir une compréhension de celles-ci et de leur écologie. En effet, la capacité des virus à passer d'une espèce hôte à une autre, à se disséminer dans différents écosystèmes, à évoluer vers une virulence accrue ou réduite et à se propager n'est que partiellement comprise. Au vu de l'émergence ou la réémergence et l'expansion géographique de ces dernières années, il est indispensable de développer et renforcer les programmes de surveillance actuels, de disposer d'outils de diagnostics utilisables à grande échelle et de développer des projets de recherche abordant la complexité et la dynamique des interactions virus – hôtes pour ces maladies infectieuses émergentes dont celle induite par WNV classée comme prioritaire en santé humaine et vétérinaire par l'UE et circulant entre les chevaux et la faune sauvage (oiseaux majoritairement).

En tant que chercheuse à l'ANSES, nos missions principales consistent à améliorer la surveillance des agents pathogènes en santé animale et pour la sécurité alimentaire et à faire progresser nos connaissances sur la dynamique des interactions virus-hôtes. Au cours de ces dernières années, dans le cadre du LR-UE Maladies équine – West Nile et encéphalites équine exotiques, j'ai développé et participé à l'optimisation d'outils de diagnostic permettant la détection et l'identification sensibles et précises des flavivirus émergents et de leurs

variantes associées dans des environnements changeants et complexes. J'ai également développer un projet de renforcement de la surveillance nationale des flavivirus WNV, USUV et TBEV en utilisant la faune sauvage comme sentinelle. Le développement du réseau « One Health » territorial en Nouvelle Aquitaine, initié avec des partenaires locaux et institutionnels en 2023, a brisé les silos entre les différents volets de surveillance et a montré l'importance de la mise en place d'une recherche opérationnelle intégrée à l'interface entre la santé humaine, animale et environnementale, adossée aux instances nationales de surveillance permettant un partage rapide des données utilisées par les décideurs politiques pour sécuriser rapidement les dons de sangs et d'organes. Cet exemple questionne la surveillance West Nile actuellement déployée en France métropolitaine.

En parallèle de ces projets, je m'intéresse particulièrement aux mécanismes sous-tendant les différences de virulence, pathogénicité et tropisme des flavivirus. Certains projets ont pu être initiés grâce aux moyens humains et financiers de l'unité Virologie et aux étudiants en master 2 et en thèse que j'ai pu encadrer. Consciente que les projets de recherche doivent être financés par le biais de convention, je me suis engagée depuis ces dernières années dans la réponse aux appels à projets au niveau institutionnel et national (ANR) et dans ma participation à des appels à projets européens (Horizon 2020).

S'il est indispensable d'étudier la pathobiologie d'un virus chez un hôte donné et de développer des outils innovants de détection, il est désormais indispensable de prendre en considération le risque des co-infections et l'impact de ces dernières sur l'épidémiologie, l'écologie, la pathogénicité et la transmissibilité connues des virus. Ma participation au projet Horizon 2022-FARM2FORK "Ecology of Wildlife, Livestock, huMan and Infectious Diseases in changing environments" permet de financer mes premiers travaux dans cette thématique. A terme, je serai en mesure de demander des allocations doctorales et post-doctorales à différentes agences (DIM, ABIES, ICRAD) pour poursuivre dans ce domaine et offrir des opportunités aux étudiants ayant divers intérêts fondamentaux et appliqués en épidémiologie, surveillance, diagnostic, génomique et développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## 6. Références bibliographiques

1. Fiacre, L., et al., *Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(23).
2. Statistics, C.F.M.D., [consulté December, 21, 2022].
3. McKone, E.F., et al., *Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: a phase 3, open-label extension study (PERSIST)*. Lancet Respir Med, 2014. **2**(11): p. 902-910.
4. Wainwright, C.E., et al., *Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR*. N Engl J Med, 2015. **373**(3): p. 220-31.
5. Drumm, M.L., et al., *Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1227-33.
6. Halbert, C.L., J.M. Allen, and A.D. Miller, *Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6615-24.
7. Wagner, J.A., et al., *A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(11): p. 1349-59.
8. Moss, R.B., et al., *Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial*. Chest, 2004. **125**(2): p. 509-21.
9. Simon, R.H., et al., *Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study*. Hum Gene Ther, 1993. **4**(6): p. 771-80.
10. Douglas, J.T., et al., *Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(11): p. 1574-8.

11. Alba, R., et al., *Identification of coagulation factor (F)X binding sites on the adenovirus serotype 5 hexon: effect of mutagenesis on FX interactions and gene transfer*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 965-71.
12. Waddington, S.N., et al., *Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 397-409.
13. Greig, J.A., et al., *Influence of coagulation factor x on in vitro and in vivo gene delivery by adenovirus (Ad) 5, Ad35, and chimeric Ad5/Ad35 vectors*. *Mol Ther*, 2009. **17**(10): p. 1683-91.
14. Corjon, S., et al., *Cell entry and trafficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon:heparan sulfate interaction*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e18205.
15. Granio, O., et al., *Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia*. *Hum Gene Ther*, 2010. **21**(3): p. 251-69.
16. Le Lay, S., M.C. Martinez, and R. Andriantsitohaina, *[Extracellular vesicles as biomarkers and bioeffectors of metabolic syndrome]*. *Med Sci (Paris)*, 2018. **34**(11): p. 936-943.
17. Gonzalez, G., et al., *Microparticle-mediated transfer of the viral receptors CAR and CD46, and the CFTR channel in a CHO cell model confers new functions to target cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e52326.
18. Gonzalez, G., et al., *Characterization of a novel type of HIV-1 particle assembly inhibitor using a quantitative luciferase-Vpr packaging-based assay*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27234.
19. Zhang, N., et al., *Recent Advances in the Development of Virus-Like Particle-Based Flavivirus Vaccines*. *Vaccines (Basel)*, 2020. **8**(3).
20. Chua, A.J., et al., *A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies*. *Virology*, 2013. **10**: p. 129.
21. Kitidee, K., et al., *Baculovirus display of single chain antibody (scFv) using a novel signal peptide*. *BMC biotechnology*, 2010. **10**(1): p. 1-21.
22. Vituret, C., et al., *Transfer of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Human Cystic Fibrosis Cells Mediated by Extracellular Vesicles*. *Hum Gene Ther*, 2016. **27**(2): p. 166-83.
23. Woolhouse, M.E., D.T. Haydon, and R. Antia, *Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps*. *Trends Ecol Evol*, 2005. **20**(5): p. 238-44.
24. Parrish, C.R., et al., *Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008. **72**(3): p. 457-70.
25. Smith, G.J., et al., *Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic*. *Nature*, 2009. **459**(7250): p. 1122-5.
26. Beigel, J.H., et al., *Avian influenza A (H5N1) infection in humans*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(13): p. 1374-85.
27. Peiris, M., et al., *Human infection with influenza H9N2*. *Lancet*, 1999. **354**(9182): p. 916-7.
28. Gao, R., et al., *Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(20): p. 1888-97.
29. Chen, H., et al., *Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study*. *Lancet*, 2014. **383**(9918): p. 714-21.
30. Crawford, P.C., et al., *Transmission of equine influenza virus to dogs*. *Science*, 2005. **310**(5747): p. 482-5.
31. Gonzalez, G., et al., *Infection and pathogenesis of canine, equine, and human influenza viruses in canine tracheas*. *J Virol*, 2014. **88**(16): p. 9208-19.
32. Geoghegan, J.L. and E.C. Holmes, *Evolutionary Virology at 40*. *Genetics*, 2018. **210**(4): p. 1151-1162.
33. Hurt, A.C., et al., *Detection of evolutionarily distinct avian influenza a viruses in antarctica*. *mBio*, 2014. **5**(3): p. e01098-14.
34. Bravo-Vasquez, N., et al., *Equine-Like H3 Avian Influenza Viruses in Wild Birds, Chile*. *Emerg Infect Dis*, 2020. **26**(12): p. 2887-2898.

35. Amat, J.A.R., et al., *Long-term adaptation following influenza A virus host shifts results in increased within-host viral fitness due to higher replication rates, broader dissemination within the respiratory epithelium and reduced tissue damage*. PLoS Pathog, 2021. **17**(12): p. e1010174.
36. Feng, K.H., et al., *Equine and Canine Influenza H3N8 Viruses Show Minimal Biological Differences Despite Phylogenetic Divergence*. J Virol, 2015. **89**(13): p. 6860-73.
37. Zhu, H., et al., *Absence of adaptive evolution is the main barrier against influenza emergence in horses in Asia despite frequent virus interspecies transmission from wild birds*. PLoS pathogens, 2019. **15**(2): p. e1007531.
38. Musso, D., et al., *Zika virus in French Polynesia 2013-14: anatomy of a completed outbreak*. Lancet Infect Dis, 2018. **18**(5): p. e172-e182.
39. Olival, K.J. and P. Daszak, *The ecology of emerging neurotropic viruses*. J Neurovirol, 2005. **11**(5): p. 441-6.
40. Simmonds, P., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae*. J Gen Virol, 2017. **98**(1): p. 2-3.
41. Failloux, A.B. and A. Fontanet, *Virus Zika : premiers cas de transmission en France métropolitaine par le moustique tigre*. The Conversation, 2019.
42. Nava, A., et al., *The Impact of Global Environmental Changes on Infectious Disease Emergence with a Focus on Risks for Brazil*. Ilar j, 2017. **58**(3): p. 393-400.
43. Negev, M., et al., *Impacts of Climate Change on Vector Borne Diseases in the Mediterranean Basin - Implications for Preparedness and Adaptation Policy*. Int J Environ Res Public Health, 2015. **12**(6): p. 6745-70.
44. Pierson, T.C. and M.S. Diamond, *The continued threat of emerging flaviviruses*. Nat Microbiol, 2020. **5**(6): p. 796-812.
45. Lecollinet, S., et al., *Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(12): p. 2225.
46. Giglia, G., et al., *Pathology and Pathogenesis of Eurasian Blackbirds (Turdus merula) Naturally Infected with Usutu Virus*. Viruses, 2021. **13**(8).
47. Vilibic-Cavlek, T., et al., *Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario*. Pathogens, 2020. **9**(9).
48. Mancuso, E., et al., *West Nile and Usutu Virus Introduction via Migratory Birds: A Retrospective Analysis in Italy*. Viruses, 2022. **14**(2).
49. Bogovic, P. and F. Strle, *Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management*. World J Clin Cases, 2015. **3**(5): p. 430-41.
50. Valarcher, J.F., et al., *Tick-borne encephalitis*. Rev Sci Tech, 2015. **34**(2): p. 453-66.
51. Alfano, N., et al., *Tick-borne encephalitis foci in northeast Italy revealed by combined virus detection in ticks, serosurvey on goats and human cases*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 474-484.
52. Wallenhammar, A., et al., *Revealing new tick-borne encephalitis virus foci by screening antibodies in sheep milk*. Parasit Vectors, 2020. **13**(1): p. 185.
53. Salat, J., et al., *Tick-Borne Encephalitis in Sheep, Romania*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(12): p. 2065-2067.
54. Paulsen, K.M., et al., *Tick-borne encephalitis virus in cows and unpasteurized cow milk from Norway*. Zoonoses Public Health, 2019. **66**(2): p. 216-222.
55. Cisak, E., et al., *Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland*. Ann Agric Environ Med, 2010. **17**(2): p. 283-6.
56. Joubert, L., et al., *[Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]*. Ann Inst Pasteur (Paris), 1970. **118**(2): p. 239-47.
57. Pradier, S., S. Lecollinet, and A. Leblond, *West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe*. Rev Sci Tech, 2012. **31**(3): p. 829-44.
58. Young, J.J., et al., *Epidemiology of human West Nile virus infections in the European Union and European Union enlargement countries, 2010 to 2018*. Euro Surveill, 2021. **26**(19).



59. Beck, C., et al., *Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019*. *Pathogens*, 2020. **9**(11).
60. Michel, F., et al., *Evidence for West Nile Virus and Usutu Virus Infections in Wild and Resident Birds in Germany, 2017 and 2018*. *Viruses*, 2019. **11**(7).
61. Benzarti, E., et al., *Usutu Virus Epizootic in Belgium in 2017 and 2018: Evidence of Virus Endemization and Ongoing Introduction Events*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2020. **20**(1): p. 43-50.
62. Michel, F., et al., *West Nile Virus and Usutu Virus Monitoring of Wild Birds in Germany*. *Int J Environ Res Public Health*, 2018. **15**(1).
63. Oude Munnink, B.B., et al., *Genomic monitoring to understand the emergence and spread of Usutu virus in the Netherlands, 2016-2018*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 2798.
64. Velay, A., et al., *Tick-borne encephalitis virus: molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen*. *Crit Rev Microbiol*, 2019. **45**(4): p. 472-493.
65. Bournez, L., et al., *Exposure of Wild Ungulates to the Usutu and Tick-Borne Encephalitis Viruses in France in 2009-2014: Evidence of Undetected Flavivirus Circulation a Decade Ago*. *Viruses*, 2019. **12**(1).
66. Gonzalez, G., et al., *A One-Health Approach to Investigating an Outbreak of Alimentary Tick-Borne Encephalitis in a Non-endemic Area in France (Ain, Eastern France): A Longitudinal Serological Study in Livestock, Detection in Ticks, and the First Tick-Borne Encephalitis Virus Isolation and Molecular Characterisation*. *Frontiers in microbiology*, 2022. **13**: p. 863725-863725.
67. (CDC), C.f.D.C.a.P., *Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1999. **48**(38): p. 845-9.
68. Langevin, S.A., et al., *Host competence and helicase activity differences exhibited by West Nile viral variants expressing NS3-249 amino acid polymorphisms*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e100802.
69. Dridi, M., et al., *Setting up a SPF chicken model for the pathotyping of West Nile virus (WNV) strains*. *Transbound Emerg Dis*, 2013. **60 Suppl 2**: p. 51-62.
70. Lim, S.M., et al., *Characterization of the mouse neuroinvasiveness of selected European strains of West Nile virus*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74575.
71. Dridi, M., et al., *Experimental infection of Carrion crows (*Corvus corone*) with two European West Nile virus (WNV) strains*. *Vet Microbiol*, 2013. **165**(1-2): p. 160-6.
72. Bahuon, C., et al., *IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47666.
73. Fiacre, L., et al., *Evaluation of NS4A, NS4B, NS5 and 3'UTR Genetic Determinants of WNV Lineage 1 Virulence in Birds and Mammals*. *Viruses*, 2023. **15**(5).
74. 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. 2462-2467.
75. Kríz, B., C. Benes, and M. Daniel, *Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008)*. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2009. **58**(2): p. 98-103.
76. Balogh, Z., et al., *Experimental infection of goats with tick-borne encephalitis virus and the possibilities to prevent virus transmission by raw goat milk*. *Intervirology*, 2012. **55**(3): p. 194-200.
77. Rónai, Z. and L. Egyed, *Survival of Tick-Borne Encephalitis Virus in Goat Cheese and Milk*. *Food Environ Virol*, 2020. **12**(3): p. 264-268.
78. Buczek, A.M., et al., *Food-Borne Transmission of Tick-Borne Encephalitis Virus-Spread, Consequences, and Prophylaxis*. *Int J Environ Res Public Health*, 2022. **19**(3).
79. Offerdahl, D.K., N.G. Clancy, and M.E. Bloom, *Stability of a Tick-Borne Flavivirus in Milk*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2016. **4**: p. 40.
80. Hennechart-Collette, C., et al., *Method for tick-borne encephalitis virus detection in raw milk products*. *Food Microbiology*, 2022. **104**: p. 104003.

81. Malkinson, M. and C. Banet, *The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002. **267**: p. 309-22.
82. Jourdain, E., et al., *Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western Mediterranean wetlands*. *Emerg Infect Dis*, 2007. **13**(3): p. 365-72.
83. Maharaj, P.D., et al., *West Nile and St. Louis encephalitis viral genetic determinants of avian host competence*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018. **12**(2): p. e0006302.
84. Nikolay, B., *A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap?* *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2015. **109**(10): p. 609-18.
85. Zannoli, S. and V. Sambri, *West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications*. *Microorganisms*, 2019. **7**(7).
86. Vilibic-Cavlek, T., et al., *Emerging Trends in the Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe*. *Front Vet Sci*, 2019. **6**: p. 437.
87. Rizzoli, A., et al., *Understanding West Nile virus ecology in Europe: Culex pipiens host feeding preference in a hotspot of virus emergence*. *Parasit Vectors*, 2015. **8**: p. 213.
88. Santos, P.D., et al., *Co-infections: Simultaneous detections of West Nile virus and Usutu virus in birds from Germany*. *Transbound Emerg Dis*, 2022. **69**(2): p. 776-792.
89. Mavrouli, M., et al., *Reemergence of West Nile Virus Infections in Southern Greece, 2017*. *Am J Trop Med Hyg*, 2019. **100**(2): p. 420-426.
90. Lauriano, A., et al., *West Nile and Usutu Viruses' Surveillance in Birds of the Province of Ferrara, Italy, from 2015 to 2019*. *Viruses*, 2021. **13**(7).
91. Defilippo, F., et al., *Assessment of the Costs Related to West Nile Virus Monitoring in Lombardy Region (Italy) between 2014 and 2018*. *Int J Environ Res Public Health*, 2022. **19**(9).
92. Moureau, G., et al., *A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2007. **7**(4): p. 467-77.
93. Vina-Rodriguez, A., et al., *A Novel Pan-Flavivirus Detection and Identification Assay Based on RT-qPCR and Microarray*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 4248756.
94. Santaella, J., et al., *West Nile virus serosurveillance in Iowa white-tailed deer (1999-2003)*. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **73**(6): p. 1038-42.
95. Farajollahi, A., et al., *Serologic evidence of West Nile virus and St. Louis encephalitis virus infections in white-tailed deer (Odocoileus virginianus) from New Jersey, 2001*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2004. **4**(4): p. 379-83.
96. Escribano-Romero, E., et al., *West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia*. *Vet Microbiol*, 2015. **176**(3-4): p. 365-9.
97. Heinz-Taheny, K.M., et al., *West Nile virus infection in free-ranging squirrels in Illinois*. *J Vet Diagn Invest*, 2004. **16**(3): p. 186-90.
98. Kiupel, M., et al., *West Nile virus infection in Eastern fox squirrels (Sciurus niger)*. *Vet Pathol*, 2003. **40**(6): p. 703-7.
99. Docherty, D.E., et al., *West Nile virus antibody prevalence in wild mammals, Southern Wisconsin*. *Emerg Infect Dis*, 2006. **12**(12): p. 1982-4.
100. Docherty, D.E., et al., *Changes in West Nile virus seroprevalence and antibody titers among Wisconsin mesopredators 2003-2006*. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. **81**(1): p. 177-9.
101. Le Lay-Rogues, G., et al., *[Wild rabbit, Oryctolagus cuniculus L., and arboviruses in southeast France. Results of two serologic investigations]*. *Bull Soc Pathol Exot*, 1990. **83**(4): p. 446-56; discussion 456-7.
102. Padgett, K.A., et al., *West Nile virus infection in tree squirrels (Rodentia: Sciuridae) in California, 2004-2005*. *Am J Trop Med Hyg*, 2007. **76**(5): p. 810-3.
103. Palermo, P.M., et al., *Serological Evidence of West Nile Virus Infection in White-Tailed Deer in Central Texas*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2020. **20**(11): p. 850-854.
104. Mutebi, J.P., et al., *Using wild white-tailed deer to detect eastern equine encephalitis virus activity in Maine*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011. **11**(10): p. 1403-9.
105. García-Bocanegra, I., et al., *Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants*. *BMC Vet Res*, 2016. **12**(1): p. 249.

106. Taieb, L., et al., *Bird Species Involved in West Nile Virus Epidemiological Cycle in Southern Québec*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(12).
107. Pérez-Ramírez, E., F. Llorente, and M. Jiménez-Clavero, *Experimental infections of wild birds with West Nile virus*. Viruses, 2014. **6**(2): p. 752-81.
108. Dietrich, E.A., R.A. Bowen, and A.C. Brault, *An ex vivo avian leukocyte culture model for West Nile virus infection*. J Virol Methods, 2015. **218**: p. 19-22.
109. Gandrillon, O., et al., *TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism*. Embo j, 1999. **18**(10): p. 2764-81.
110. Fuet, A., et al., *NANOG Is Required for the Long-Term Establishment of Avian Somatic Reprogrammed Cells*. Stem Cell Reports, 2018. **11**(5): p. 1272-1286.
111. Failloux, A.B., et al., *Surveillance of Arthropod-Borne Viruses and Their Vectors in the Mediterranean and Black Sea Regions Within the MediLabSecure Network*. Curr Trop Med Rep, 2017. **4**(1): p. 27-39.
112. Yan, J., et al., *Avian phenotypic traits related to feeding preferences in two Culex mosquitoes*. Naturwissenschaften, 2017. **104**(9-10): p. 76.
113. González, M.A., et al., *Avian Feeding Preferences of Culex pipiens and Culiseta spp. Along an Urban-to-Wild Gradient in Northern Spain*. Frontiers in Ecology and Evolution, 2020. **8**.
114. Constant, O., et al., *Evidence of Exposure to USUV and WNV in Zoo Animals in France*. Pathogens, 2020. **9**(12).
115. Control, C.f.d., *Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1999. **48**(38): p. 845-9.
116. Morgane, L., *Evaluation des coûts liés à la surveillance et à la lutte et des pertes engendrées par l'épizootie de West Nile de 2015 en Camargue dans la filière équine*. Université Claude Bernard Lyon 1, Thèse d'université, 2018.
117. Tran, A., et al., *An Integrative Eco-Epidemiological Analysis of West Nile Virus Transmission*. Ecohealth, 2017. **14**(3): p. 474-489.
118. Lustig, Y., et al., *Epidemiologic and phylogenetic analysis of the 2018 West Nile virus (WNV) outbreak in Israel demonstrates human infection of WNV lineage I*. Euro Surveill, 2019. **24**(1).
119. Gamino, V. and U. Höfle, *Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review*. Vet Res, 2013. **44**(1): p. 39.
120. Paré, J. and A. Moore, *West Nile virus in horses - What do you need to know to diagnose the disease?* Can Vet J, 2018. **59**(10): p. 1119-1120.
121. Marini, G., et al., *West Nile virus transmission and human infection risk in Veneto (Italy): a modelling analysis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 14005.
122. Staples, J.E., et al., *Initial and long-term costs of patients hospitalized with West Nile virus disease*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **90**(3): p. 402-9.
123. Rolland, T., et al., *A proteome-scale map of the human interactome network*. Cell, 2014. **159**(5): p. 1212-1226.
124. Mairiang, D., et al., *Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53535.
125. Marceau, C.D., et al., *Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 159-63.
126. Brückner, A., et al., *Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(6): p. 2763-88.
127. Vidal, M. and S. Fields, *The yeast two-hybrid assay: still finding connections after 25 years*. Nat Methods, 2014. **11**(12): p. 1203-6.
128. Cui, D., et al., *Two Interferon-Stimulated Response Elements Cooperatively Regulate Interferon-Stimulated Gene Expression in West Nile Virus-Infected IFNAR(-/-) Mouse Embryo Fibroblasts*. J Virol, 2021. **95**(22): p. e0104021.
129. Diamond, M.S. and M. Gale, Jr., *Cell-intrinsic innate immune control of West Nile virus infection*. Trends Immunol, 2012. **33**(10): p. 522-30.

130. Fishburn, A.T., et al., *Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 847588.
131. Li, M., et al., *Identification of antiviral roles for the exon-junction complex and nonsense-mediated decay in flaviviral infection*. Nat Microbiol, 2019. **4**(6): p. 985-995.
132. van Leur, S.W., et al., *Pathogenesis and virulence of flavivirus infections*. Virulence, 2021. **12**(1): p. 2814-2838.
133. Zhang, X., et al., *Structure and function of capsid protein in flavivirus infection and its applications in the development of vaccines and therapeutics*. Vet Res, 2021. **52**(1): p. 98.
134. García-Sastre, A., *Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses*. Cell Host Microbe, 2017. **22**(2): p. 176-184.
135. Chen, J., et al., *Structure-based prediction of West Nile virus-human protein-protein interactions*. J Biomol Struct Dyn, 2019. **37**(9): p. 2310-2321.
136. Paz, S., *Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015. **370**(1665).
137. Escribano-Romero, E., et al., *Previous Usutu Virus Exposure Partially Protects Magpies (*Pica pica*) against West Nile Virus Disease But Does Not Prevent Horizontal Transmission*. Viruses, 2021. **13**(7).
138. Wang, H., et al., *Competition between Usutu virus and West Nile virus during simultaneous and sequential infection of *Culex pipiens* mosquitoes*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 2642-2652.
139. Calzolari, M., et al., *Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14324.
140. Rückert, C., et al., *Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15412.
141. Göertz, G.P., et al., *Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti**. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(6): p. e0005654.
142. Laureti, M., et al., *Superinfection Exclusion in Mosquitoes and Its Potential as an Arbovirus Control Strategy*. Viruses, 2020. **12**(11).
143. Duggal, N.K., et al., *On the Fly: Interactions Between Birds, Mosquitoes, and Environment That Have Molded West Nile Virus Genomic Structure Over Two Decades*. J Med Entomol, 2019. **56**(6): p. 1467-1474.