

Antiviraux et vaccins

Jeudi 23 mars 2017, 14 h 00- 15 h

Modérateurs : Bruno Canard & Aure Saulnier

Communications orales O6 à O10

Affiches P30 à P36, P83, P84, P97

O6

Impact des mutations de résistance (RASs) sur le retraitement des patients en échec d'antiviraux directs (ANRS HEPATHER CO22)

Stéphane Chevaliez¹, Pascale Trimoulet², Céline Dorival³, Sylvie Larrat⁴, Caroline Scholtès⁵, Arielle Rosenberg⁶, Edouard Tuaille⁷, Laurence Bocket⁸, Fabrice Carrat³, Stanislas Pol⁹, Jean-Michel Pawlotsky¹

¹ CNR des hépatites virales B, C et delta, Hôpital Henri Mondor, France

² Laboratoire de virologie, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France

³ Institut Pierre-Louis d'épidémiologie et de santé publique

⁴ Laboratoire de virologie, Hôpital Grenoble Alpes, France

⁵ Laboratoire de virologie, Hôpital de Lyon, France

⁶ Laboratoire de virologie, AP-HP, Hôpital Cochin, Service de virologie, France

⁷ Laboratoire de virologie, Hôpital de Montpellier, France

⁸ Laboratoire de virologie, CHRU Lille, France

⁹ Service d'hépatologie, Hôpital Cochin, France

<stephane.chevaliez@aphp.fr>

Introduction. Le traitement de l'hépatite chronique C s'est profondément modifié ces dernières années avec l'arrivée des nouveaux antiviraux directs (DAAs), disponibles *per os*, très efficaces et généralement bien tolérés. Ils permettent une éradication virale dans plus de 95 % des cas, et ce quel que soit le génotype, le stade de fibrose ou la présence d'une coinfection par le VIH. Néanmoins, une proportion substantielle de patients est incapable de guérir de leur infection après un traitement de 8 à 24 semaines. La plupart des patients en échec de traitement ont sélectionné des variants viraux résistants qui portent une ou plusieurs substitutions amino acidiques (RASs) capables de conférer une diminution de sensibilité à un plusieurs DAAs. L'objectif de cette étude de « vraie vie » était d'évaluer l'effet des RASs NS5A, NS5B et/ou NS3 sur la réponse au retraitement de patients antérieurement exposés à une ou plusieurs lignes de traitement.

Patients et méthodes. 6791 patients inclus dans la cohorte HEPATHER (ANRS CO22) ont été traités par différentes combinaisons d'antiviraux (90 % des traitements avec du sofosbuvir (SOF) en combinaison avec la ribavirine ± pegIFN ou un anti-NS5A ou du siméprévir (SMV) dans respectivement 11,9 %, 63,7 % et 13,5 % des cas ; 10 % des traitements sans SOF dont 8,1 % des traitements avec la combinaison PrO±D (paritaprevir/ritonavir + ombitasvir ± dasabuvir)). Parmi les patients traités par antiviraux directs, 576 (8,5 %) étaient en échec. Les profils de résistance ont été déterminés par séquençage direct ("population sequencing") des 3 régions ciblées par les DAAs.

Résultats. Les résultats étaient disponibles pour les 169 premiers patients. L'âge moyen des patients était de 61 ans, majoritairement de sexe masculin (70 %) avec une fibrose sévère dans plus de 90 % des cas et une cirrhose dans plus de 70 % (cirrhose compensée chez la plupart des patients cirrhotiques). Les génotypes 1, 3, 4 et 2 étaient les plus fréquents (respectivement 47 %, 25 %, 17 % et 9 %). Au total, 62 % des patients avaient des RASs au moment du retraitement avec des différences selon le génotype viral. Parmi les patients en échec, 68 % ont été retraités par un traitement contenant du sofosbuvir en combinaison avec un ou plusieurs antiviraux directs, avec ou sans ribavirine pendant 12 ou 24 semaines. Une guérison (RVS12) était obtenue chez 92,9 % des patients retraités, tandis que 8 patients étaient en échec de retraitement.

Conclusion. La présence de RASs au moment du retraitement avait un effet modeste sur la réponse au retraitement excepté chez les patients cirrhotiques de génotype 1a. La détermination des profils de résistance avant retraitement est néanmoins utile pour adapter la stratégie de retraitement.

O7

Identification et repositionnement de médicaments déjà sur le marché comme nouveaux inhibiteurs des virus influenza sur la base de signatures virogénomiques cliniques

Andrés Pizzorno, Olivier Terrier, Claire Nicolas De Lamballerie, Thomas Julien, Blandine Padey, Aurélien Traversier, Magali Roche, Marie-Eve Hamelin, Bruno Lina, Catherine Legras-Lachuer, Julien Textoris, Guy Boivin, Manuel Rosa-Calatrava

Centre international de recherche en infectiologie (CIRI -Team VirPath), École normale supérieure (ENS), Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL), CNRS UMR5308, Inserm U1111, 7-11 rue Guillaume-Paradin 69372 Lyon cedex 08, France

<mario-andre.pizzorno@univ-lyon1.fr>

Les infections grippales constituent un problème majeur et récurrent de santé publique. La nature intrinsèque des virus influenza, l'efficacité sous-optimale des vaccins actuels, ainsi que l'émergence récurrente de résistances contre un arsenal antiviral très limité, soulignent le besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter ces infections respiratoires. Dans ce contexte, nous avons développé et validé une stratégie de sélection de médicaments déjà sur le marché pour leur repositionnement comme nouveaux antiviraux ciblant la cellule hôte plutôt que les déterminants du virus. Basé sur le postulat que le profil d'expression des gènes de l'hôte constitue une « empreinte » globale de tout état cellulaire spécifique, y compris dans le cas d'infections virales ou de traitements pharmacologiques, nous avons émis l'hypothèse que des molécules associées à une signature cellulaire transcriptomique inverse de celle de l'infection, pouvaient induire un état d'activités cellulaires globalement défavorable à la réplication virale. Nous avons ainsi exploité des signatures transcriptomiques d'infection *in vivo*, obtenues à partir d'une cohorte de patients infectés par le virus A(H1N1)pdm09, et sélectionné *in silico* une liste restreinte de 35 candidats à fort potentiel parmi un total de 1309 molécules bioactives. L'étiléfrine (Effortil), un agoniste des récepteurs adrénergiques, et notamment le diltiazem (Tildiem), un inhibiteur calcique couramment utilisé dans le traitement préventif de l'angine de poitrine et de l'hypertension artérielle, ont été validés dans des modèles d'infection *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* pour leur activité antivirale significative contre plusieurs sous-types de virus influenza. À partir de leur signature établie par séquençage de nouvelle génération (NGS) et validée en modèle *ex-vivo* par RT-qPCR et dosages biochimiques, nous avons déterminé plusieurs modes d'action potentiels de ces deux molécules via la modulation de différentes voies de signalisation et métaboliques cellulaires, déjà documentées pour leurs interactions fonctionnelles avec plusieurs étapes du cycle réplécatif des virus influenza. L'effet synergique observé suite à la combinaison de ces molécules repositionnées avec l'oseltamivir (Tamiflu), l'inhibiteur viral classique de référence, a permis la mise en place d'un essai clinique national multicentrique de phase 2b, visant à l'évaluation de cette combinaison de molécules dans la prise en charge de patients atteints de grippe sévère en services de réanimation (essai FLUNEXT, PHRC #15-0442, NCT03212716, hivers 2018 et 2019). En résumé, notre stratégie innovante de criblage de molécules antivirales ciblant la cellule plutôt que le virus, est bien adaptée à la pathologie d'infection aiguë des virus pathogènes respiratoires, avec des perspectives majeures d'application thérapeutique dans le contexte des résistances antimicrobiennes et des maladies émergentes épidémiques ou pandémiques. Cette stratégie s'inscrit également dans une démarche de repositionnement thérapeutique de molécules ayant déjà une autorisation de mise sur le marché (AMM), avec des avantages réglementaires et financiers évidents par rapport au processus long et coûteux de développement de molécules *de novo*.

O8

Anticorps neutralisant le VIH : deux lignées à large spectre isolées chez un donneur africain et ciblant la région N332 du trimère d'enveloppe

Claire Roussel, Elise Landais, Sebastian Dergan-Dylon, Audrey Cappelletti, Pascal Poignard

Institut de biologie structurale, Université Grenoble Alpes (UGA),
CS 40700 38058 Grenoble cedex, France
<pascal.poignard@ibs.fr>

Environ 15 % des personnes infectées par le VIH-1 produisent des anticorps neutralisants à large spectre (AcLS), capable de bloquer l'entrée de la grande diversité génétique des VIH par fixation aux trimères d'enveloppe. L'induction par vaccination de tels anticorps permettrait de prévenir l'infection par le VIH. À cette heure, il n'existe pas de stratégies vaccinales capables d'induire de telles réponses. Nos travaux concernent le développement d'AcLS chez un donneur du *Protocol C*, une large cohorte longitudinale subsaharienne organisée par *International AIDS Vaccine Initiative*. Ce donneur est le deuxième meilleur neutralisateur de la cohorte (sérum neutralisant 82 % d'un panel de 37 virus). Cette activité a été cartographiée à la base de la boucle V3 de la gp120 et nécessite une glycosylation en position 332. Afin d'isoler les AcLS du donneur, les lymphocytes B mémoires issus d'échantillons sanguins de 48, 54 et 60 mois post-infection (mpi) ont été triés par cytométrie en flux (*fluorescence-assisted cell sorting, FACS*) à l'aide de gp120 sauvage et mutée N332A, marquées par fluorescence. Les gènes de chaînes lourdes et légères d'anticorps ont été amplifiés par PCR sur cellule unique. Parmi les 260 paires de séquences chaînes lourdes et légères obtenues, deux lignées d'anticorps d'intérêt ont été définies grâce au différentiel de fluorescence des gp120 sauvage et mutée. Ces deux lignées ont été caractérisées pour la neutralisation hétérologue, autologue et cartographiées. La première lignée comprend 12 anticorps monoclonaux utilisant le gène de chaîne lourde HV1-18. Leur taux d'hypermutations somatiques s'échelonne de 15 à 20 % de nucléotides. La boucle HCDR3 (*heavy chain complementarity-determining region 3*) est longue de 23 acides aminés. 20 à 30 % du panel de 37 virus sont neutralisés avec une IC50 moyenne de l'ordre de 10 µg/mL. Le spectre de neutralisation n'évolue pas de façon significative de 48 à 60 mpi. La spécificité pour la glycosylation en 332 a été confirmée, la mutation N332A diminuant la neutralisation de 7 pseudovirus. La neutralisation des enveloppes autologues est importante à 12 mpi, suggérant une induction précoce. Elle diminue à partir de 18 mpi et disparaît complètement à 30 mpi selon des mécanismes d'échappement viral à élucider. La deuxième lignée comprend 17 anticorps monoclonaux utilisant le gène de chaîne lourde HV330 avec des taux de mutations entre 10 et 20 % de nucléotides et un HCDR3 de 18 acides aminés. Le spectre de neutralisation est légèrement supérieur autour de 40 %, également sans nette progression entre 48 et 60 mpi. L'impact de la mutation N332A a été observé pour 4 virus sur 9 testés. La neutralisation autologue indique une induction plus tardive à partir de 18 mpi. Étant donnée la relative rareté des réponses neutralisantes à large spectre, il est particulièrement intéressant de trouver deux lignées ciblant la même région chez un même donneur. Cependant, les anticorps de ces deux lignées ne suffisent pas à expliquer totalement l'important spectre de neutralisation du sérum. Il est possible que des anticorps monoclonaux plus tardifs de ces 2 lignées soient à l'origine de cette activité. Ils seront isolés prochainement par *FACS* ou par séquençage de nouvelle génération couplant la chaîne lourde et légère.

O9

Le récepteur humain CD46 n'est pas requis pour la réplication du vaccin vivant rougeole *in vivo* sur modèle murin : l'interféron de type I est la barrière d'espèce

Marie Mura^{1,2}, Claude Ruffie¹, Emmanuelle Billon-Denis², Chantal Combredet¹, Jean Nicolas Tournier², Frédéric Tangy¹

¹ *Génomique virale et vaccination, Institut Pasteur de Paris, France*

² *Biothérapies anti-infectieuses et immunité, Institut de recherche biomédicale des armées, France*

<frederic.tangy@pasteur.fr>

Le vaccin vivant rougeole a été atténué dans les années 1960 par passages successifs en culture de cellules embryonnaires de poulet. C'est un vaccin très sûr et efficace qui confère une protection à vie. L'atténuation virale s'est accompagnée d'un élargissement du tropisme cellulaire, avec utilisation

du récepteur humain ubiquitaire CD46. Le virus de la rougeole ayant un tropisme restreint à l'homme et aux primates non humains, des modèles d'étude murins transgéniques portant le récepteur hCD46 ont été générés. Cependant, pour reproduire l'infection humaine avec une réplication virale systémique, il a été nécessaire de bloquer la voie interféron de type I (IFN-I) en supprimant l'expression du récepteur IFNAR (*type I interferon receptor*). Pour comprendre la restriction d'hôte et simplifier le modèle murin du vaccin rougeole, nous avons comparé la réplication et l'immunogénicité d'un virus vaccinal recombinant rougeole-luciférase dans quatre modèles murins exprimant ou non le récepteur hCD46 et *knockout* (KO) ou non pour le récepteur IFNAR. Nous avons observé que les souris KO pour le récepteur IFNAR permettent la réplication systémique du virus, qu'elles expriment ou non le récepteur hCD46. À l'inverse, aucune réplication systémique n'est possible chez les souris dont la voie IFN-I est fonctionnelle, même lorsqu'elles expriment le récepteur hCD46. De même, l'établissement des réponses humorales et cellulaires antivirales dépend de la fonctionnalité de la voie IFN-I et non de la présence du récepteur hCD46. Ainsi, la restriction d'hôte est contrôlée par les réponses immunes innées, en particulier la voie IFN-I, et, la barrière d'espèce de ce vaccin ne repose pas uniquement sur le tropisme cellulaire récepteur dépendant. Ces résultats permettent à la fois de mieux comprendre les mécanismes définissant la restriction d'hôte et de simplifier le modèle murin en utilisant des souris uniquement KO pour le récepteur IFNAR. Du reste, ce modèle s'installe comme un modèle simple permettant la réplication de nombreux autres virus humains en outrepassant la barrière d'espèce.

O10

Les anticorps d'origine maternelle réduisent l'efficacité de la vaccination contre le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin chez les porcelets

Patricia Renson^{1,2,3}, Christelle Fablet^{1,2}, Mathieu Andraud^{1,2}, Sophie Mahe^{1,2}, Virginie Dorenlor^{1,2}, Mireille Le Dimna^{1,2}, Eric Eveno^{1,2}, Florent Eono^{1,2}, Frédéric Paboeuf^{1,2}, Nicolas Rose^{1,2}, Olivier Bourry^{1,2}

¹ *Anses, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané, BP53, 22440 Ploufragan, France*

² *Université Bretagne Loire (UBL), UBL, Cité internationale, 1 place Paul Ricœur, CS 54417, 35044 Rennes cedex, France*

³ *Union des groupements de producteurs de viande de Bretagne (UGPVB), UGPVB, 104 rue Eugène Pottier, CS 26553, 35066 Rennes, France*
<patricia.renson@anses.fr>

Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP), causé par un petit virus à ARN simple brin de la famille des *arteriviridae* (SDRPV), est considéré comme l'une des maladies les plus coûteuses pour la production porcine mondiale. Des vaccins vivants atténués (MLV) sont utilisés pour réduire l'impact clinique du SDRP mais leur efficacité se montre limitée sur le terrain. Nous avons montré récemment que les anticorps neutralisants d'origine maternelle (ANOM) interféraient avec l'induction des réponses immunitaires post-vaccinales contre le SDRPV. Dans cette étude, l'impact des ANOM sur la protection vaccinale a été évalué suite à une épreuve virale. Des porcelets avec des niveaux d'ANOM faibles (A-) ou élevés (A+) ont été vaccinés (V+) ou non (V-) avec un MLV à 3 (v1) et 4 (v2) semaines de vie. Quatre semaines après la seconde vaccination (S4 pv2), les porcelets ont été soit inoculés avec une souche terrain de SDRPV afin d'évaluer l'efficacité vaccinale, soit mis en contact direct avec des porcelets inoculés afin d'estimer les paramètres de transmission. Des prélèvements sanguins ont été effectués après la vaccination puis après l'infection jusqu'à 42 jours post-infection (J pi) afin de quantifier le génome viral par RT-PCR, détecter les anticorps anti-SDRPV par ELISA et énumérer les cellules sécrétrices d'IFN γ (IFN γ -SC) par ELISPOT. Les résultats montrent qu'à S1 pv2, le génome du virus vaccinal est détecté chez 69 % des animaux A-V+ et 6% des animaux A+V+. A S4 pv2, 94 % des animaux A-V+ ont séroconverti suite à la vaccination contre 44 % chez les A+V+ et seule la réponse IFN γ des A-V+ est significativement différente de celle des animaux V-. Après l'infection, chez les porcelets A+V+, les charges génomiques de la souche d'épreuve ne se distinguent

pas de celles des animaux V- alors que celles des A-V+ sont 100 fois plus faibles à J10 pi. Chez les A-V+, les quantités de IFN γ -SC apparaissent plus élevées que chez les A+V+ à J7 pi et une corrélation négative peut être établie avec les charges virales entre J7 et J15 pi ($r = -0.55$; $p < 0.05$). Chez les animaux contacts, les charges virales des porcelets A+V+ ne se distinguent pas de celles des animaux V- alors qu'à J7 pi, les animaux A-V+ présentent une charge virale significativement plus faible que les V-. De plus, la durée moyenne de la virémie du groupe A-V+ est raccourcie par rapport aux groupes A+V+ et V- (6 jours contre 12 et 19 jours respectivement) et un taux de transmission plus faible est estimé pour le groupe A-V+ par rapport aux groupes A+V+ et V- (0.15 [0.07-0.29] contre 0.44 [0.18-1.76] et 0.32 [0.14-0.68] respectivement). Les ANOM réduisent donc la protection contre le SDRPV conférée par un MLV chez les animaux inoculés, mais aussi chez les animaux contacts. L'inhibition de la réplication de la souche vaccinale liée à ces anticorps pourrait expliquer l'absence d'induction des réponses immunitaires post-vaccinales. Ces résultats pourront contribuer à l'amélioration des protocoles vaccinaux afin de mieux contrôler la circulation du virus et réduire l'impact du SDRP sur le terrain.

P30

Analyse longitudinale de génomes entiers du VHC chez des patients en échec d'anti-NS5A : émergence de nouvelles substitutions amino-acidiques dans des régions non ciblées par les antiviraux anti-NS5A
Slim Fourati, Christophe Rodriguez, Alexandre Soulier, Lila Poiteau, Guillaume Gricourt, Vanessa Demontant, Isaac Ruiz, Christophe Hézode, Stéphane Chevaliez, Jean-Michel Pawlotsky
Centre national de référence des hépatites virales B, C et Delta, Créteil, France

Inserm U955, Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne (UPEC), France
<slim.fourati@aphp.fr>

Introduction. Les substitutions amino-acidiques associées à la résistance (RASs) aux antiviraux anti-NS5A sont localisées dans le domaine I de NS5A du VHC. Ces RASs persistent plusieurs années voire à vie. Par analogie avec le VIH et le virus de l'hépatite B, il est probable que des mutations compensatoires puissent être sélectionnées au cours du traitement antiviral ; ceci pourrait, du moins en partie, expliquer la persistance à long terme des RASs NS5A. Il y a peu de données disponibles en regard de la sélection des mutations compensatoires sous traitement antiviral. Cela est dû en partie aux techniques de séquençage disponibles, limitées à la caractérisation de courts fragments géniques. Dans ce travail, nous avons utilisé une méthode de métagénomique « *shot-gun* » basée sur le séquençage du génome entier du VHC pour caractériser de nouvelles mutations survenant dans des régions ciblées ou non ciblées par les anti-NS5A, sélectionnées au cours d'échecs virologiques.

Méthodes. L'utilisation de la méthode métagénomique « *shot-gun* » nous a permis de générer les séquences de génomes entiers VHC des souches cliniques longitudinales chez 12 patients en échec d'un traitement comprenant des antiviraux anti-NS5A (sofosbuvir + daclatasvir ou sofosbuvir + ledipasvir). Une extraction « universelle » ADN/ARN a été réalisée suivie d'une préparation de « librairie » utilisant les kits Total RNA and Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina). Le séquençage à haut débit a été réalisé par NextSeq500 (Illumina). Nous avons utilisé le logiciel MetaMIC mis au point au laboratoire (qualité, filtre, identification, reconstruction génomique et comparaison inter-génome) pour analyser les séquences génomiques. Les séquences ont été analysées en utilisant un seuil de profondeur à 15 %, selon les recommandations de l'EASL (European Association for the Study of the Liver).

Résultats. Nous avons mis en évidence une excellente corrélation entre les niveaux de charge virale VHC (inter et intra patients) et le nombre d'équivalents génomes séquencés ($p < 0.01$; $r_2 = 0.91$). L'analyse longitudinale de génomes entiers a permis d'identifier, en plus des substitutions RASs connues sur le domaine I de NS5A, plusieurs substitutions amino-acidiques dans d'autres régions du génome viral (core, E1, E2, NS3, NS4B, NS5A domaine III). La majorité des patients en échec thérapeutique portait

des virus de génotype-3 ($n=5$) ou de génotype-4 ($n=4$). Chez les patients infectés par le génotype-3, les substitutions amino-acidiques suivantes ont été sélectionnées (en plus d'autres RASs connues sur NS5A) : sur NS3 T98S ou T98A, NS4B T48A et G114S, NS5A N448S et NS5B K114R.

Conclusion. L'utilisation de la méthode originale métagénomique « *shot-gun* » basée sur le séquençage à haut débit de génomes VHC complets nous a permis de détecter de nouvelles substitutions amino-acidiques sélectionnées de façon indépendante sur les régions NS3, NS4B, NS5A (domaine III) ou NS5B chez des patients en échec de sofosbuvir et d'anti-NS5A. Les données de la littérature suggèrent que certains résidus mutés mis en évidence dans notre étude ont un impact positif sur la capacité répliquative virale. Ces modifications pourraient permettre de renforcer le niveau de résistance induit par les RASs ou de compenser la perte de capacité répliquative induite par certaines RASs (ex. Y93H). La caractérisation phénotypique de ces mutants est en cours.

P31

Stability modeling to predict vaccine shelf-life and evaluate impact of temperature excursions from the "cold chain"

Didier Clénet, Aure Saulnier

Sanofi Pasteur (R&D), Marcy l'Étoile and Lyon, France
<aure.saulnier@sanofi.com>

The stability of vaccines is of great interest for industries and government institutions. Accelerated stability studies are designed to determine the rate of vaccine degradation over time as a result of exposure to temperatures higher than those recommended for product storage. However, commonly applied stability predictions based on the application of zero- or first-order kinetics are often too simplified for description of the degradation of biological products, which frequently undergo complex and multistep degradation reactions. We used an advanced kinetic approach integrating statistical analysis to fit the forced degradation data (ELISA, NTA...) by computed kinetic parameters, and to predict the long-term stability of vaccine. This modeling approach is based on the selection of the most appropriate kinetic equations which fit the degradation rate of compounds subjected to elevated temperatures, thus accelerating the rate of the reaction. According to 1-3 month data obtained at elevated storage temperatures, "two-step" models were identified to conveniently describe the antigenicity of a vaccine. We predicted product antigenicity over 2 years. The stability modeling procedure was also applied for the prediction of antigenicity during several temperature excursions, thereby demonstrating the accuracy of the kinetic models. To our knowledge, this is the first procedure integrating a global kinetic approach and modern statistical analyses to accurately determine a vaccine degradation rate that enables to predict the shelf-life of bio-products stored in refrigerated conditions and subjected to temperature excursions from the "cold chain".

P32

Development of Zika Virus RT-PCR and droplet digital RT-PCR optimized for the quantification of various Zika strains

Sophie Fraysse, Jérémy Pontvianne, Yves Girerd-Chambaz, Nathalie Mantel, Eric Abachin, Valérie Lecouturier

Sanofi Pasteur (RD), Marcy l'Étoile and Lyon, France
<sophie.fraysse@sanofi.com>

From its first documentation in sentinel monkeys in 1952 in Uganda, Zika virus (ZIKV) has been circulating at low levels in Africa. But since 2007, ZIKV caused outbreaks in Asia/Pacific islands, and particularly in 2015/2016, when it caused a large epidemic in South America with the associated microcephalies due to congenital infection. Because of their high sensitivity and specificity, nucleic acid diagnostic techniques were rapidly developed in 2007, and ZIKV Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) has been implemented (Lanciotti et al., 2008). Recently, droplet digital RT-PCR (ddRT-PCR) has been developed, offering highly

precise and direct quantification with no need of any standard curve. To develop an optimal method to detect and quantify a large panel of ZIKV strains including recent ones, we first designed two primer/probe sets for either qRT-PCR or ddRT-PCR assay. The two designed primer/probe sets target a highly conserved region in ZIKV NS5 and amplify specifically ZIKV and not the other fPCR assay, tested including DENV. The first one is specific for the Asian/American strains (As/Am set), and the second one is based on a degenerated primer/probe sequence to address the mismatches between the African and As/Am strains (Pan-ZIKV set). The sensitivity of the 2 sets was then evaluated in qRT-PCR and ddRT-PCR assays on the African MR766 strain and two recent Asian (H/FP/2013) and American (PRVABC59) strains. We observed a larger dynamic range of titers with the qRT-PCR assay than with the ddRT-PCR assay. However, the ddRT-PCR assay had the advantage of being more rapid to develop. Both primer/probe sets were highly specific to ZIKV. The As/Am set showed higher sensitivity and amplification quality for H/FP/2013 and PRVABC59 than for MR766. The impact of mismatches between the As/Am and African strains was even more important with ddRT-PCR than with qRT-PCR. The pan-ZIKV set showed similar sensitivity for the recent As/Am strains and the African MR766 strain; the sensitivity was found to be consistently higher compared with the E primer/probe set previously published (Lancioti et al., 2008). We developed highly specific and sensitive qRT-PCR and ddRT-PCR assays using two sets of primers and probes designed for Asian/American strains or for all ZIKV strains including ZIKV of African origin. *Study funded by Sanofi Pasteur and BARDA.*

P33

Les aminostéroïdes dérivés de molécules isolées chez le requin, nouvelles pistes pour de thérapies antivirales

Mélanie Lovera-Leroux, Stéphanie Philippot, Margaux Trombini, Jean-Michel Brunel¹, Mihayl Varbanov²

¹ CNRS UMR7258, Inserm, Aix-Marseille University, Institut Paoli Calmettes, UM 105, Inserm, U1068, Marseille, France

² Laboratoire lorrain de chimie moléculaire (L2CM), CNRS UMR7565, Faculté de pharmacie, Université de Lorraine-FST, boulevard des Aiguillettes 54506 Vandœuvre-Lès-Nancy, France
<mihayl.varbanov@univ-lorraine.fr>

La squalamine est un aminostéroïde cationique naturel isolé chez le requin (*Squalus acanthias*) et la lamproie marine (*Petromyzon marinus*) découvert par l'équipe de Zasloff en 1993 [1]. Jusqu'à présent, de nombreuses études ont démontré l'activité antibactérienne [2, 3] et antitumorale [4] de la squalamine et de ses dérivés synthétiques. Cependant, un article, publié en 2011, suggère que la squalamine peut également être un agent antiviral à large spectre grâce à ses propriétés électrostatiques [5]. Notre projet vise à évaluer le potentiel antiviral de 18 molécules synthétiques basées sur la structure de la squalamine. Ces 18 molécules amphiphiles varient au niveau de la longueur de leur chaîne latérale, le nombre de structures de type anneau stéroïdien, la charge, ou les groupes fonctionnels. Nos résultats montrent que 6 des 18 molécules testées présentent un effet antiviral contre les virus enveloppés (comme le coronavirus humain). Cependant cet effet n'est pas observé dans le cas des virus non enveloppés (comme l'adénovirus humain). Nos analyses du mécanisme d'action des molécules à potentiel effet antiviral indiquent que la squalamine peut être un bon agent d'inactivation des particules virales mais également un traitement préventif contre les infections par les virus respiratoires humains.

1. Moore KS, et al.. *Proc Natl AcadSci U S A* 1993 ; 90 : 1354-8.
2. Kikuchi K, et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 ; 41 : 1433-8.
3. Hraiech S, et al. *J Antimicrob Chemother* 2012 ; 67: 2452-2458
4. Sills AK Jr, et al. *Cancer Res* 1998 ; 58:2784-92.
5. Zasloff M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 ; 108 : 15978-83

P34

Une recombinaison entre deux souches vaccinales SDRP de génotype I conduit à la persistance en élevage d'une souche à virulence accrue

Julie Eclercy^{2,1}, Patricia Renson^{1,3,4}, Frédéric Paboeuf^{2,1}, Nicolas Rose^{1,3}, Olivier Bourry^{3,1}

¹ Anses-Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, France

² Université Bretagne Loire (UBL), Cité Internationale, 1 place Paul Ricoeur CS 54417 35044 Rennes cedex, France

³ Université Bretagne Loire (UBL), UBL, Cité Internationale, 1 place Paul Ricoeur CS 54417, 35044 Rennes cedex, France

⁴ Union des groupements de producteurs de viande de Bretagne (UGPVB), UGPVB, 104 rue Eugène Pottier CS 26553, 35066 Rennes, France
<julie.eclercy@anses.fr>

Introduction. Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection présente sur tous les continents induisant des pertes économiques considérables pour la production porcine. Au niveau clinique, il se caractérise par des troubles de la reproduction chez les truies et des problèmes respiratoires chez les porcs en croissance. En Europe, la lutte contre le virus du SDRP (SDRPV) fait principalement appel aux vaccins vivants atténués de génotype 1 (*modified live vaccine* : MLV1). En décembre 2014, dans un élevage où 2 MLV1 ont été utilisés successivement, une souche recombinante entre les 2 souches vaccinales a été isolée. Dans le but de caractériser le niveau de virulence de cette souche recombinante, un essai *in vivo* a été mis en place afin de comparer les paramètres cliniques, virologiques et de transmission de cette souche recombinante à ceux des deux souches vaccinales parentales.

Matériel & méthodes. Trois groupes de 6 porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés ont été inoculés respectivement avec le vaccin Porcillus PRRS (groupe Porci), le vaccin Unistrain PRRS (groupe Uni) ou avec la souche recombinante (groupe Rec). Vingt-quatre heures après infection, 6 porcelets contacts ont été ajoutés à chacun des 3 groupes inoculés pour évaluer la transmission virale. Un 4^e groupe composé de 6 porcelets non inoculés constituait le groupe contrôle de l'étude. Les données cliniques ont été relevées sur tous les porcs tout au long de l'essai. Une prise de sang a été réalisée deux fois par semaine sur tous les animaux ainsi qu'un écouvillon nasal uniquement sur les porcelets inoculés et les contrôles. La charge génomique virale a été mesurée par RT-qPCR dans les sérums et écouvillons nasaux. La séroconversion a été déterminée par ELISA.

Résultats. Les souches recombinantes et vaccinales n'ont pas induit de signes cliniques. La virémie des animaux du groupe Rec était 10 à 100 fois supérieure que celle des groupes Uni et Porci. Le premier porc contact virémique a été détecté au bout de 2 jours post-infection (jpi) au sein du groupe Rec contre 10 et 17 jpi respectivement pour les premières détections chez les porcelets des groupes Porci et Uni. La quantification du génome viral dans les écouvillons nasaux a permis de montrer que l'excrétion virale était 8 à 60 fois plus importante pour le groupe Rec par rapport aux groupes Uni et Porci. L'estimation des paramètres de transmission par modélisation mathématique a permis de déterminer un taux de transmission instantané (nombre de porcs infectés par porc infectieux par jour) de 0,57 pour le groupe Rec contre 0,08 et 0,11 respectivement pour les groupes Uni et Porci. La détection des anticorps anti-SDRPV a révélé que les animaux du groupe Rec sont les premiers à séroconvertir.

Discussion & Conclusion. Malgré l'absence de signes cliniques, les résultats de cette étude montrent que la recombinaison entre deux souches vaccinales vivantes atténuées peut conduire à l'obtention d'une souche SDRPV dont les capacités de réplication, d'excrétion et de transmission sont augmentées. Compte tenu de ces résultats, des mesures sont à envisager pour prévenir l'apparition de telles souches recombinantes.

P35

Étude chez la souris de l'expression de gènes précoces de l'immunité en réponse à l'administration d'un vaccin adénovectorisé et adjuvé Manon Broutin¹, Fleur Watier¹, Jennifer Maye², Sandy Peltier², Juliette Ben Arous², Nicolas Versillé², Bernard Klonjowski¹

¹ Virologie UMR1161 (VIRO), INRA, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Anses, ENVA Maisons Alfort 7 avenue du Général de Gaulle 94704 Maisons-Alfort cedex, France

² SEPPIC, SA, 22 Terrasse Bellini, 92800 Puteaux, France
<bernard.klonjowski@vet-alfort.fr>

Introduction. La vaccination est, à ce jour, un des moyens les plus efficaces pour réduire la morbidité et la mortalité liées aux maladies infectieuses. Cependant, les vaccins disponibles doivent être améliorés pour répondre aux nouveaux enjeux en matière de santé publique et animale. Des stratégies vaccinales innovantes sont proposées afin d'améliorer l'efficacité, la durée et l'amplitude des réponses immunitaires. Parmi elles, la vaccination s'appuyant sur des vaccins vivants recombinés est particulièrement prometteuse. Notre étude repose sur l'utilisation de différents vecteurs dérivés de l'adénovirus canin type 2, permettant le transfert du gène codant l'antigène pour immuniser l'animal. Cette approche est désormais bien documentée et son efficacité a été démontrée dans de nombreux essais vaccinaux. En collaboration avec l'entreprise SEPPIC, nous avons initié des travaux visant à augmenter de manière ciblée l'efficacité de ces vecteurs vaccinaux en y associant une immunostimulation par adjuvant. Le développement de ces formulations vaccinales nécessite une meilleure compréhension mécanistique de leurs effets sur l'induction, la stimulation et l'orientation des réponses immunitaires de l'hôte après vaccination.

Matériels et méthodes. Le principal objectif est de contribuer à l'étude des signatures transcriptomiques précoces impliquées dans la réponse de l'hôte à l'administration de vaccins adénovectorisés et adjuvés. Les vecteurs utilisés sont des adénovirus canins de type 2 délétés de la région E1, Cav R₀. Le premier, Cav-GFP R₀ exprime la protéine fluorescente verte (GFP). Le second, Cav-G R₀ exprime la glycoprotéine du virus de la rage. Plusieurs lignées cellulaires murines ont été transduites par le vecteur Cav-GFP R₀ et des souris C57BL/6 ont été immunisées à l'aide de différentes formulations vaccinales contenant le vecteur Cav-G R₀ associé ou non avec l'adjuvant Montanide ISA 201 VG. La susceptibilité des cellules murines à l'infection par le Cav-GFP R₀ a été évaluée par microscopie à fluorescence et/ou cytométrie en flux. L'immunogénicité du vecteur Cav-G R₀ a été déterminée chez la souris C57BL/6 en utilisant la trousse ELISA PLATELIA Rabies II (BioRad). Les réponses précoces de l'hôte aux vecteurs Cav ont été analysées par RT-PCR quantitatives ciblant plus de 80 gènes impliqués dans la réponse antivirale (RT² Profiler PCR Array Mouse Antiviral Response, Qiagen).

Résultats et perspectives. Cette étude nous a permis d'aborder les questions suivantes : le Montanide ISA 201 VG permet-il d'augmenter l'efficacité de la vaccination adénovectorisée ? Est-il possible d'observer des modulations précoces du transcriptome en ciblant les gènes de la réponse antivirale ? Ces modulations permettent-elles d'ouvrir des perspectives vers l'étude mécanistique de ces vaccins ? Les lignées cellulaires murines sont-elles un modèle pertinent afin d'étudier la réponse entre le vecteur adénoviral et la cellule hôte ? Des conclusions et perspectives seront également présentées.

P36

Développement d'une méthode de criblage à haut débit, par imagerie automatisée en utilisant des cellules neurales humaines dérivées de progéniteurs fœtaux, pour l'identification de molécules antivirales contre le virus de l'encéphalite à tiques

Gaëlle Gonzalez¹, Nathalie Aulner², Mazigh Fares¹, Marielle Cochet¹, Claudia Montéro-Mené³, Patrick Dallemagne⁴, Anne Danckaert⁵, Muriel Couplier¹

¹ Anses Laboratoire de santé animale, Unité de virologie UMR 1161, INRA, ENVA, 7 avenue du Général de Gaulle 94700 Maisons-Alfort, France

² Institut Pasteur (UtechS Photonic BioImaging (Imagopole)), Institut Pasteur de Paris, 28 rue du Dr Roux 75724 Paris cedex 15, France

³ Centre de recherche de cancérologie et d'immunologie Nantes-Angers (CRCINA), Centre de recherche Inserm, 8 quai de Moncousu BP 70721 44007 Nantes cedex 1, France

⁴ EA 4258 Centre d'études et de recherche sur le médicament de Normandie (CERNM), CNRS EA4258, UFR de Santé, Faculté de pharmacie, Université de Caen-Normandie, Bd Becquerel 14032 Caen cedex France, France

⁵ Institut Pasteur de Paris (Imagopole-Citech), 25-28, rue du Dr Roux 75015 Paris, France
<muriel.couplier@vet-alfort.fr>

Les virus neurotropes d'importance en santé humaine appartiennent à plusieurs familles virales dont les *Flaviviridae* et *Togaviridae*, (genre *Alphavirus*), deux familles de virus à simple brin d'ARN de polarité positive, transmis par des arthropodes. Ces pathogènes vectorisés, émergents et ré-émergents dans différentes parties du monde, sont responsables d'épidémies d'encéphalites pour lesquelles il n'existe actuellement aucun traitement efficace. Il est donc important de mettre au point de nouvelles technologies permettant d'identifier rapidement de nouvelles thérapeutiques efficaces contre ces virus. Nous avons, pour cela, développé un système de criblage à haut débit/ haut contenu pour l'identification de molécules bloquant la réplication d'un *Flavivirus*, le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV, *tick-borne encephalitis virus*). 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 quantifier de façon rapide et standardisée le nombre de cellules infectées par le virus TBEV à plusieurs multiplicités d'infection (MOI 1, 10e-1, 10e-2 et 10e-3) au cours d'une cinétique allant de 14 h 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 10e-3 à 48 h post-infection. Nous avons par la suite identifié une molécule capable d'inhiber l'infection des cellules neurales humaines par TBEV. Il s'agit de l'interferon-β utilisé 2 heures en pré-traitement et présente au cours de l'infection qui sera utilisé comme contrôle au cours du crible. Un premier crible, 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 vous seront présentés et 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 neuraux 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.

P83

The hepatitis C virus RNA polymerase directs incoming nucleotides to the active site through limited rearrangements of two connected segments

Kaouther Ben Ouirane, Yves Boulard, Stéphane Bressanelli
Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette cedex, France
<kaouther.benouirane@i2bc.paris-saclay.fr>

RNA viruses synthesise new genomes in the infected host thanks to dedicated, virally-encoded RNA-templated RNA polymerases (RdRp). As such

those enzymes are prime targets for antiviral therapy, as spectacularly exemplified recently in the case of hepatitis C virus (HCV) with the nucleotide inhibitor sofosbuvir. The HCV RNA polymerase NS5B, the target of sofosbuvir, has also become one of the best-characterised viral polymerases, both biochemically and structurally. Here we use molecular modelling and molecular dynamics simulations, starting from the available crystal structures of HCV NS5B in complex with template-primer duplexes, to address the question of ribonucleotide selectivity by this class of viral polymerases. We find that in complexes with an incoming nucleotide, strong interactions lock the triphosphate and base moieties in place. Tracing the possible passage of incoming nucleotides through the entry tunnel, we find that direct access to the active site is checked by mobile elements. The first is a loop that overhangs the tunnel entry and separates it into two connected apertures. Nucleotides coming within a "capture cone" are directed by the loop to either aperture, eventually coming to an intermediate binding site. At this site the nucleotide is reoriented to face the RNA template base prior to nucleotide insertion into the active site. Thus the Watson-Crick base pairing that selects for correct nucleotide incorporation occurs before final insertion. Such a "pre-insertion" of incoming nucleotides has been described also for the T7 RNA polymerase and should thus be valid for the related mitochondrial RNA polymerase. However, the molecular details of preinsertion for NS5B are completely different from T7 polymerase's and seem specific to viral RdRps. This explains in part how 2'-modified nucleotides such as sofosbuvir can be so successful as drugs against RNA viruses.

P84

Action immunomodulatrice et antivirale de la cathélicidine humaine LL-37 et de la bêta-défensine humaine de type 3 au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains par le virus West Nile

Céline Chessa^{1,2}, Magali Garcia^{1,2}, Vincent Lerat^{1,2}, Charles Bodet², Nicolas Leveque^{1,2}

¹ Laboratoire Inflammation, tissus épithéliaux et cytokines (LITEC), Université de Poitiers EA4331

² Laboratoire de virologie et mycobactériologie, CHU de Poitiers, Poitiers

<nicolas.leveque@chu-poitiers.fr>

Contexte. Le virus West Nile (WNV) est un arbovirus émergent. Au cours de l'infection, la peau, et plus particulièrement les kératinocytes, constituants cellulaires majoritaires de l'épiderme, représentent le site initial de la réplication virale mais également la première ligne de défense de l'organisme. Pour lutter contre l'infection, les kératinocytes sécrètent des cytokines, des chimiokines et des peptides antimicrobiens (PAMs). Diverses études ont démontré les propriétés immunomodulatrices et antivirales des PAMs cutanés, mais leur rôle au cours de l'infection par le WNV reste inconnu.

Objectifs. Le but de notre étude a été d'explorer les propriétés immunomodulatrices et antivirales de deux des sept peptides antimicrobiens sécrétés par le kératinocyte humain, la cathélicidine humaine LL-37 et la bêta-défensine humaine (hBD) 3, lors de l'infection par le WNV.

Matériels et méthodes. Des kératinocytes primaires humains ont été stimulés avec de l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly (I:C)), ARN double-brin mimant un intermédiaire de réplication présent lors du

cycle viral, ou infectés par le WNV à une multiplicité d'infection de 0,1, pendant 3 h, 24 h et 48 h, en présence ou en l'absence de LL-37 ou hBD-3, à des concentrations de 0,1, 1 ou 10 µg/mL. Une étude transcriptomique de marqueurs de l'inflammation, de chimiokines et de molécules impliqués dans les mécanismes antiviraux (IFN β-1, les IFNs λ (IL-28A et IL-29), CXCL-8 et CCL-5, IFIT-1, RSAD2, MX1) a été réalisée par RT-PCR quantitative. La sécrétion de CXCL-8 a été étudiée par dosage ELISA dans le surnageant de culture des kératinocytes stimulés par le poly (I:C). Enfin, les propriétés antivirales des PAMs aux concentrations de 1, 10 ou 40 µg/mL ont été évaluées grâce à la mesure de la charge virale dans le surnageant de culture des kératinocytes infectés par RT-PCR quantitative et par titrage sur cellules Vero. **Résultats.** L'incubation des kératinocytes en présence des PAMs seuls n'induisait pas l'expression des ARNm des marqueurs de l'inflammation. L'expression des cinq marqueurs étudiés était en revanche stimulée par le poly (I:C) ou le WNV par des facteurs multiplicateurs variant de 9 à 450. Cette expression pouvait être potentialisée entre 4.5 et 20 fois par l'ajout de LL-37 ou d'hBD-3. À forte concentration, la LL-37 empêchait la réplication virale dans les kératinocytes et réduisait même le titre de particules virales infectieuses après 2 h de pré incubation. **Conclusion.** Nos résultats démontrent que LL-37 et hBD-3, disposent de propriétés immunomodulatrices capables de renforcer la réponse immunitaire innée antivirale du kératinocyte contre l'infection par le virus West Nile. De plus, à forte concentration ils présentent des propriétés antivirales vis-à-vis du WNV dont le mode d'action reste à préciser.

P97

Évolution de la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux en Algérie

Salima Bouzeghoub¹, Soumia Benmahfoud¹, Fatma Zohra Aissat²

¹ Institut Pasteur d'Algérie, 1, rue du Docteur Laveran El-Hamma Alger, Algérie

² Hôpital El Kettar, Alger, Algérie

<salibouzeghoub@yahoo.fr>

La surveillance épidémiologique de la résistance du VIH aux antirétroviraux en Algérie est devenue une des priorités actuelles, qui recommande d'adopter des stratégies nationales de prévention et d'évaluation de l'émergence des résistances du VIH. Avant 2008, la prévalence de la résistance primaire était faible, estimée à 3,8 % (n = 131). Elle a concerné deux classes antirétrovirales, les INTI et IP à 2,3 % et 1,5 % respectivement. Concernant la résistance acquise, elle était élevée (78 %) sur l'ensemble des 87 sujets traités. Parmi eux, 37 % présentait une résistance à au moins une molécule antirétrovirale. Cette résistance a touché les 3 classes thérapeutiques : INTI (27,6 %), INNTI (4,6 %) et IP (17 %). En 2014, le niveau de résistance primaire a atteint 15 % (n = 89) et a touché les 3 classes. Les mutations majeures identifiées sont : M184V (INTI), K103N (INNTI) et V82F (IP). En 2017, les résultats actuels montrent une augmentation du niveau de résistance. Le taux de la résistance transmise reste élevé estimé à 23 % et touche surtout les INNTI. Concernant la résistance acquise, 60 % des sujets en échec thérapeutique présentent une résistance à au moins une molécule ARV. Elle a touché les 3 classes : INTI (48,5 %), INNTI (34 %) et IP (5 %). Les mutations M184V, T215Y et K103N, étaient les plus fréquemment observées, conférant ainsi une résistance au 3TC AZT et EFV.