

Antiviraux et vaccins

Vendredi 29 mars, 14 h 00-15 h 30

Modération : Christophe Ramière, Christophe Peyrefitte

Communications orales : O37 à O42

Affiches : P92 à P112, P134, P137, P138

O37

Efficacité de la vaccination contre l'hépatite B (HB) commencée dès la naissance et suivie du programme élargi de vaccination comprenant la valence PEV-HB, chez les enfants nés de mère AgHBs positives, à Tokombéré, Cameroun (ANRS 12303)

Hélène Le Guillou-Guillemette¹, Pascal Veillon¹, Jacques Birguel², Adeline Pivert¹, Richard Njououm³, Alexandra Ducancelle¹, Agnès Gautheret⁴, Jean-Pierre Adoukara², Jean-Marie Huraux, Françoise Lunel-Fabiani¹

¹ CHU d'Angers, France

² Hôpital de Tokombéré, Cameroun

³ Centre Pasteur de Yaoundé (CPC), Yaoundé, Cameroun

⁴ AP-HP La Pitié-Salpêtrière (APHP), Pitié-Salpêtrière university hospital, Sorbonne Université UPMC Paris VI, France

<HeLeguillou@chu-angers.fr>

Contexte. L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est hautement endémique en Afrique, avec un fort taux de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire. Sans intervention, le risque de transmission de la mère AgHBs positive à l'enfant (TME) est élevé. La vaccination des nouveau-nés (NN) à la naissance est recommandée (OMS). Au Cameroun, la vaccination HB commence à la 6^e semaine (programme national de vaccination élargi, EPI-HB). Cependant, une charge virale (CV) élevée du VHB chez les mères expose à un échec de la vaccination. Nous avons réalisé un programme de prévention de la TME VHB en dépistant l'AgHBs chez les femmes enceintes (FE) et en vaccinant les NN des mères AgHBs+ à la naissance. Avec le GEMHEP, nous avons étudié 1276 FE à Tokombéré et trouvé que 20,3 % étaient AgHBs+ et 22,8 % AgHBe+ avec une CV de plus de 7 log₁₀ UI/mL [Ducancelle *et al.* *PlosOne* 2011] montrant que le risque de TME était grand.

Patients et méthodes. L'ANRS (étude 12303) a financé une évaluation de notre programme. Le but de notre étude était d'évaluer l'intérêt du dépistage de l'AgHBs chez les FE par un test rapide et la vaccination des NN de mères AgHBs+, suivi par l'EPI-HB. Les FE ont eu un dépistage de l'AgHBs au 6^e mois de grossesse. Si l'AgHBs était +, une détection de l'AgHBe et une quantification de la CV étaient réalisées. Les NN de ces mères ont été testés pour l'AgHBs.

Résultats. 607 couples mère-enfants ont été inclus et 36 enfants (5,93 %) ont un AgHBs détectable. Pour ces derniers, dans 95 % des cas, les mères étaient AgHBe+. La charge virale des FE qui ont transmis le VHB est plus élevée que celle des FE qui n'ont pas transmis le virus, CV = 7,76 ± 1,99 log₁₀ UI/mL [8,47 ; 9,09, 3,00] vs 2,65 ± 2,58 log₁₀ UI/mL [1,72 ; 9,68, 0,70] ; P < 0,001. Tous les enfants ont eu une vaccination complète (naissance et rappels) avec des délais des différents rappels peu respectés. 21/36 des enfants ont reçu la primo-vaccination dans les 24 h après la naissance comme recommandé et les autres entre 24 et 96 h.

Conclusion. Notre étude montre que, malgré une stratégie précoce de vaccination à la naissance, il reste une TME du VHB importante, de 5,93 %. La cause principale actuellement identifiée est une positivité de l'AgHBe et une forte virémie chez les mères, comme attendu, associée à un manque de respect des schémas de vaccination. Les autres causes possibles (mutants, transmission horizontale) sont en cours d'étude. La vaccination à la naissance suivie de l'EPI-HB est donc insuffisante et devra être associée à un traitement des femmes enceintes pour prévenir la TME du VHB.

O38

Une dose unique d'un vaccin bivalent rougeole, Lassa induit une protection complète contre la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus

Mathieu Mateo^{1,2}, Xavier Carnec^{1,2}, Stéphanie Reynard^{1,2}, Hervé Raoul^{1,2,3}, Frédéric Tangy⁴, Sylvain Baize^{1,2}

¹ CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, Université Lyon I, ENS Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

² Unité de biologie des infections virales émergentes (UBIVE), Institut Pasteur, France

³ Inserm Laboratoire P4 Jean-Mérieux, Lyon, France

⁴ Génomique virale et vaccination, Institut Pasteur, Paris, France

<sylvain.baize@pasteur.fr>

La fièvre de Lassa représente un problème majeur de santé publique en Afrique de l'Ouest pour lequel aucun vaccin n'est disponible. Nous avons utilisé la plateforme vaccinale rougeole (MeV) pour développer des candidats vaccins exprimant le précurseur des glycoprotéines (GPC) du virus Lassa (LASV) en combinaison avec la nucléoprotéine (NP) ou la protéine de matrice Z. Nous avons démontré que la NP devait être mutée dans son domaine exonucléasique pour conserver l'immunogénicité innée du vecteur rougeole. Des singes cynomolgus ont été immunisés avec une dose unique de MeV-NPEXO/GPC, MeV-Z/GPC ou du vecteur MeV comme contrôle un mois avant un challenge par LASV. Les paramètres biologiques, cliniques, virologiques et immunologiques ont ensuite été monitorés chez les animaux après l'immunisation et le challenge. Les deux vaccins ont présenté une parfaite innocuité, n'ont pas été détectés dans le sang, les sécrétions orales ou l'urine et ont protégé tous les animaux tandis que les singes contrôles ont succombé à la fièvre de Lassa. Le vaccin MeV-NPEXO/GPC a induit une immunité quasi stérilisante et seule une augmentation modérée et transitoire de la température corporelle a été observée tandis qu'aucun autre signe clinique ni d'altération des paramètres biologiques n'ont été mesurés. Au contraire, les animaux immunisés par le MeV-Z/GPC ont développés des symptômes assez conséquents et une virémie LASV prolongée. L'analyse des réponses immunes a montré qu'une réponse lymphocytaire T précoce et robuste, principalement contre la GPC, était critique pour la protection contre le challenge et a suggéré que les réponses T spécifiques de la NP amélioreraient l'efficacité vaccinale. Une étude du transcriptome et du protéome a été réalisée après l'immunisation pour identifier les marqueurs biologiques précoces corrélés avec l'efficacité des vaccins. Ces vaccins ont également généré une forte réponse humorale contre le MeV, indiquant qu'une immunité contre la rougeole est également induite et qu'ils pourront être utilisés comme vaccins bivalents. En conclusion, le vaccin MeV-NPEXO/GPC est sûr, confère une protection complète contre un challenge avec LASV chez le singe cynomolgus après une dose unique, et pourrait être utilisé comme un vaccin bivalent rougeole-Lassa. Ce candidat vaccin a été sélectionné par la « Coalition for Epidemic Preparedness Innovations » (CEPI) et entrera en essai clinique prochainement.

O39

Une co-infection avec le circovirus porcin de type 2 favorise la réplication d'une souche d'origine vaccinale du virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin

Julie Eclercy^{1,2}, Frédéric Paboeuf^{1,2}, Lionel Bigault^{1,2}, Cécilia Bernard^{1,2}, Thibault Larcher³, Beatrice Grasland^{1,2}, Patricia Renson^{1,2,4}, Nicolas Rose^{1,2}, Olivier Bourry^{1,2}

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, France

² Université Bretagne Loire (UBL) Rennes, France

³ Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), INRA, Université Bretagne Loire, Nantes, France

⁴ Institut du Porc (IFIP) Paris, France

<julie.eclercy@anses.fr>

Introduction. Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP), affection mondialement répandue, est responsable de pertes économiques considérables pour la production porcine. Le virus du SDRP (SDRPv)

appartient à la famille des *Arteriviridae* du genre *Nidovirales* ; il existe deux espèces (SDRPv-1 et SDRPv-2). De par son pouvoir immunodépresseur, il favorise l'expression d'agents pathogènes secondaires bactériens ou viraux. En élevage, le SDRPv est fréquemment associé au circovirus porcin de type 2 (PCV2), cette co-infection constituant un facteur déterminant dans l'apparition de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP). La lutte contre le SDRPv fait principalement appel aux vaccins vivants atténués (*modified live vaccine* : MLV) dont les souches parentales peuvent circuler et évoluer en élevage (MLV-like). De façon préoccupante, des études ont montré qu'une vaccination à l'aide d'un SDRPv-2 MLV (MLV2) de porcs infectés par le PCV2 pouvait mener à l'apparition de la MAP. Dans un élevage français présentant un tableau clinique de MAP, une souche MLV1-like a été isolée chez des animaux co-infectés par le PCV2. Le but de cette étude était d'évaluer en conditions expérimentales l'impact d'une co-infection avec le PCV2 sur la vaccination avec un SDRPv-1 MLV (MLV1) ou sur l'infection avec une souche dérivée de ce vaccin (MLV1-like).

Matériel & Méthodes. Cinq groupes de 6 porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés ont été inoculés respectivement avec une des 2 souches SDRPv ou avec le PCV2 (groupes MLV1 ; MLV1-like ; PCV2) ou co-inoculés simultanément avec les 2 virus (groupes MLV1/PCV2 ; MLV1-like/PCV2). Un jour après inoculation, 6 porcs contacts ont été ajoutés à chacun des groupes pour évaluer la transmission virale. Les données cliniques ont été relevées sur tous les porcs tout au long de l'essai. La charge génomique virale SDRP a été mesurée par qRT-PCR dans les sérums et écouillons nasaux prélevés 2 fois par semaine et les tissus prélevés lors des autopsies.

Résultats. Aucun signe clinique n'a été relevé parmi tous les groupes. Les charges virales des groupes MLV1-like et MLV1-like/PCV2 étaient plus élevées dans les sérums, écouillons nasaux et amygdales en comparaison des groupes MLV1 et MLV1/PCV2. Ces derniers ne présentaient pas de différence entre eux contrairement aux animaux co-infectés MLV1-like/PCV2 dont la virémie et l'excrétion nasale étaient plus importantes que chez les porcs du groupe MLV1-like. De plus, la souche MLV1-like s'est transmise très rapidement aux porcs contacts des groupes MLV1-like et MLV1-like/PCV2 en comparaison de la souche parentale MLV1. L'analyse histopathologique des tissus a révélé que les animaux des groupes infectés ou co-infectés avec le PCV2 présentaient significativement plus de lésions microscopiques dans les poumons, en particulier chez les porcelets co-inoculés MLV1-like/PCV2.

Discussion. Notre étude a démontré qu'une co-infection chez le porc avec le PCV2 pouvait avoir un effet synergique sur la virulence d'une souche SDRPv d'origine vaccinale, impactant notamment sa virémie, son excrétion nasale et sa répllication dans certains tissus. Cependant, d'après nos résultats, la vaccination à l'aide d'un MLV1 au sein d'un élevage infecté par le PCV2 ne présenterait pas de risques en termes d'innocuité comme ceux décrits pour les MLV2.

O40

Développement d'une nouvelle classe d'agent de sortie de latence du VIH-1

Phuoc Bao Viet Tong¹, Laurent Chaloin¹, Edouard Tuaillon², Jean-Michel Mesnard¹, Bruno Beaumelle¹

¹ Institut de recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM), CNRS UMR9004, Université de Montpellier, Montpellier, France

² Inserm U1058, France

<bruno.beaumelle@irim.cnrs.fr>

Bien que le traitement antirétroviral (ART) supprime efficacement la multiplication du VIH-1 chez les patients infectés, l'ART ne guérit pas l'infection. En effet, si on arrête l'ART, on observe un rebond viral. Celui-ci est principalement dû à l'activation de cellules latentes qui contiennent le génome viral intégré mais ne produisent pas de virus et ne sont donc pas ciblées par l'ART ou le système immunitaire. Ces cellules latentes sont peu nombreuses (1-10 par million de cellules T-CD4) mais elles apparaissent rapidement après la primo infection et constituent donc un obstacle majeur

à l'éradication virale. La stratégie la plus acceptée, dite « *shock and kill* » pour supprimer ces cellules est de les réactiver pour qu'elles soient ensuite ciblées par l'ART et/ou la lyse par les cellules T cytotoxiques. Un certain nombre d'agents de sortie de latence (LRAs) ont été mis au point pour réactiver ces cellules. Ils ciblent les protéines cellulaires telles que les histone-désacétylases (HDAC) ou la protéine kinase C. La plupart d'entre eux présentent donc des effets non spécifiques et parfois une toxicité. Tat est une protéine clé du VIH-1 qui permet la transcription virale et favorise la traduction des gènes viraux. Tat est le facteur clé pour la levée de latence et l'initiation de la production des protéines virales par la cellule latente. Sur la base des structures RMN de Tat disponibles, nous avons mené des études de dynamique moléculaire afin d'identifier les conformations les plus stables de Tat. Nous avons ensuite identifié des ligands potentiels de Tat en criblant une banque de 55 000 composés *in silico*. 30 molécules ont été obtenues et 10 d'entre elles sélectionnées. Une molécule appelée D10 se fixe spécifiquement à la protéine Tat et augmente son activité de transactivation d'environ 4 fois. De plus, D10 présente une activité LRA sur les lignées cellulaires latentes J-Lat 9.2 et OM 10.1. L'activité LRA de D10 sur ces lignées est de 50 à 70 % de celle du SAHA (vorinostat), un inhibiteur des HDAC candidat LRA en cours d'essais cliniques (phase 2). Sur les cellules latentes de patients traités pour une infection par le VIH-1, D10 à 10-50 nM a montré une activité équivalente à celles du vorinostat ou de la bryostatine-1 qui agit sur la PKC et est considéré comme le LRA le plus prometteur actuellement.

O41

L'effet antiviral de la (S) Fluoxétine est associé à son interaction directe avec la protéine 2C de certains entérovirus

Priscila El Kazzi¹, Lisa Bauer², Roberto Manganaro³, Birgit Zonsics³, Jeroen R.p.m. Strating², Moira Lorenzo Lopez³, Rachel Ulferts², Clara Van Hoey⁴, Maria J. Maté¹, Sarah Attoumani^{1,5}, Thierry Langer⁴, Andrea Brancale³, Frank J.M. Van Kuppeveld², Bruno Coutard^{1,5}

¹ Aix-Marseille Université, CNRS, AFMB UMR 7257, Marseille, France

² Virology Division, Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, Pays-Bas

³ Medicinal Chemistry, School of Pharmacy Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Cardiff, Royaume-Uni

⁴ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Vienna, Autriche

⁵ Unité des virus émergents (UVE : Aix-Marseille Univ-IRD 190-Inserm 1207-IHU Méditerranée Infection) Marseille, France

<bruno.coutard@afmb.univ-mrs.fr>

Le genre Enterovirus (EV), appartenant à la famille des *Picornaviridae*, comprend le poliovirus, les virus Cocksackie, les échovirus, divers entérovirus et rhinovirus. Certains de ces virus peuvent être la cause de diverses maladies chez l'homme, notamment la fièvre aphteuse, la septicémie néonatale, l'encéphalite, la paralysie et certaines maladies respiratoires. À ce jour, il n'existe aucun traitement antiviral contre les infections à EV. Le criblage d'une banque de composés approuvés par la FDA a été effectué sur des cellules infectées par le virus Cocksackie B3 (CVB3). Il a permis de sélectionner plusieurs composés ayant un effet antiviral, parmi lesquels la fluoxétine qui est le « principe actif » du Prozac (Ulferts *et al.*, 2013). La fluoxétine inhibe efficacement la répllication des EV B et D. Des mutations de résistance ont été détectées sur la séquence codante de la 2C, protéine virale essentielle du complexe répllicatif qui porte notamment les fonctions enzymatiques ATPase/hélicase. Par une approche intégrative combinant la modélisation moléculaire, la génétique inverse, et des études biophysiques sur protéine recombinante, nous avons cherché à caractériser le mode d'action de la fluoxétine. Nous avons pu montrer une interaction directe entre la fluoxétine et le domaine catalytique de la 2C de CVB3. L'introduction de mutations de résistance à la fluoxétine sur la 2C recombinante conduit à l'inhibition de l'interaction entre fluoxétine et 2C, ce qui nous permet de proposer que cette interaction est la raison principale de l'effet antiviral. Le Prozac étant composée d'un mélange racémique, l'étude de l'effet antiviral et de l'interaction à la 2C par les deux

énantiomères a permis de montrer que seule la (S)-fluoxétine est active. La ou les fonctions de la 2C inhibées par la fluoxétine restent à définir mais la récente résolution de structures 3D de la protéine ouvrent des perspectives sur les études structurales du complexe 2C/fluoxétine. Face à l'émergence d'entérovirus tels que EV-D68, la fluoxétine offre des opportunités de développement de traitements antiviraux d'ores et déjà testés sur certains patients, et met en lumière le bénéfice du repositionnement de composés approuvés par des agences du médicament.

O42

Vers une substitution du test NIH par un test ELISA pour le contrôle des vaccins rabiques à usage humain

Sylvie Morgeaux¹, Jean-Michel Chapas², Stéphane Maisonneuve¹

François Cano¹, Eriko Terao³

¹ Agence nationale de sécurité des médicaments et produits de santé (ANSM), France

² Partenaires européens pour les approches alternatives aux tests sur animaux (EPAA), Belgique

³ Direction européenne de la qualité des médicaments et des soins de santé, Conseil de l'Europe (EDQM), France
<sylvie.morgeaux@ansm.sante.fr>

La réglementation internationale pour les vaccins rabiques à usage humain requiert le test *in vivo* NIH de challenge sur souris comme test de contrôle d'activité de tout lot final de vaccin avant sa mise sur le marché. Non seulement ce test est scientifiquement controversé, très variable et coûteux mais il est aussi contestable éthiquement et donc contraire à la stratégie 3R de la pharmacopée européenne. Toutefois, le remplacement du NIH par un essai *in vitro* est conditionné par la validation d'une méthode universelle standardisée. Un groupe de travail international s'est constitué sous l'égide de l'EPAA en vue de proposer une stratégie pour le remplacement du test NIH. La réflexion s'est portée sur des méthodes ELISA de quantification de la glycoprotéine G (G) qui, sous sa forme trimérique native, induit la production d'anticorps neutralisants (AcN) ainsi que la protection lors d'un test de challenge létal. En effet, des ELISA-G utilisant des anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques d'épitopes neutralisants ont démontré leur pertinence potentielle pour remplacer le test du NIH [1, 2]. Si une corrélation n'est pas envisageable entre l'ELISA-G et le NIH, la conclusion de ces tests doit être cohérente. Une étude collaborative internationale de faisabilité a comparé 3 méthodes ELISA-G pour quantifier la glycoprotéine dans des lots de vaccin dont certains étaient sous-dosés. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner un ELISA utilisant des AcM caractérisés comme spécifiques d'épitopes conformationnels qui discriminent les lots sous-dosés et reconnaissent la plupart des souches virales utilisées pour la production des vaccins à usage humain [3]. En vue de proposer le remplacement du test NIH pour la réglementation des contrôles des vaccins rabiques à usage humain, une étude collaborative internationale de standardisation a été initiée pour évaluer la transférabilité et la robustesse de la méthode choisie. La coordination de l'étude est assurée par l'EDQM, dans le cadre du Programme de standardisation biologique (BSP) financé par le Conseil de l'Europe et la Commission européenne. Ce projet est soutenu par l'Organisation mondiale de la santé. La méthode ELISA a été transférée et validée à l'ANSM en tant que laboratoire en charge du projet. 27 laboratoires (9 fabricants et 18 laboratoires publics) se sont inscrits. 12 vaccins humains issus de diverses souches virales seront inclus dans l'étude. À l'issue de l'étude, une étude des titres en glycoprotéine G obtenus pour chaque type de vaccin devrait permettre l'établissement de spécifications internationales qui seront intégrées dans la proposition de révision des textes réglementaires où le test ELISA-G pourrait se substituer au test NIH.

Références

1. Gibert R *et al.* Vaccine 2013 ; 31 : 6022-29.
2. Chabaud-Riou M, *et al.* Biologicals 2017 ; 46 : 124-29.
3. Morgeaux S *et al.* Vaccine 2017 ; 40 : 369-81.

P92

Développement d'un test de neurovirulence *in vitro* pour le vaccin fièvre jaune

Marion Aguirre, Nicolas Devard, Damien Soulet, Nina Meynard,

Erika Navarro-Sanchez, Nathalie Mantel

Sanofi Pasteur, Marcy l'Étoile, France

<nathalie.mantel@sanofi.com>

Le vaccin de la fièvre jaune est un vaccin vivant atténué basé sur la souche YF-17D. Pour tous les lots de semence, la réglementation (pharmacopée, *technical report series* de l'OMS) recommande de réaliser un test de neurotropisme, de viscérotropisme et d'immunogénicité suite à une injection intracérébrale chez le primate non humain. Ce type de test peut être réalisé additionnellement chez la souris. En accord avec les principes des 3R (réduction, raffinement, et remplacement des tests sur animaux), l'objectif est de développer un test de neurovirulence *in vitro* comme alternative aux tests réalisés sur souris et primates non humains. Le modèle considéré est un mini-cerveau *in vitro* composé de neurones, d'astrocytes et de cellules de la microglie d'origine humaine. Différents modèles cellulaires ont été évalués parmi lesquels des lignées cellulaires et des cellules neurales humaines dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) disponibles commercialement. La présence de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires (MAP2/Beta III tubuline ; vGAT ; vGLUT2 et TH pour les neurones ; GFAP pour les astrocytes et IBA1 pour la microglie) a été contrôlée par immunofluorescence. Des cinétiques d'infection (multiplicité d'infection de 1 virus pour 100 cellules) en monoculture et coculture ont été réalisées avec différents virus fièvre jaune dont la neurovirulence *in vivo* est connue. Des tests de neurovirulence *in vitro* ont été réalisés en mesurant l'impédance du tapis cellulaire ou l'apoptose induite par l'infection. Les cellules dérivées d'iPSC présentent les marqueurs caractéristiques de chaque type cellulaire démontrant leur différenciation, à l'exception d'une référence commerciale d'astrocytes qui ne présentent pas le marqueur GFAP. Pour un même virus, les profils de cinétique d'infection sont similaires quelles que soient les cellules utilisées. Peu de différences sont observées dans les profils de réplication des souches de virus fièvre jaune plus ou moins neurovirulents. Par contre, l'apoptose induite par les virus connus pour être neurovirulents est plus importante que celle obtenue avec les virus peu neurovirulents. Les résultats d'induction d'apoptose *in vitro* sont concordants avec des tests de dose létale 50 chez la souris après une injection intracérébrale menés en parallèle. Une comparaison des différents modèles est en cours pour choisir le modèle final. Le modèle CNS.4U de la société Ncardia semble intéressant car il est constitué d'un mélange de 3 types de neurones (80-90 %, dopaminergiques, glutamatergiques et GABAergiques) et d'astrocytes (10-20 %), qui permet de mimer *in vitro* la composition cérébrale. Pour parfaire le test, la prochaine étape sera d'inclure dans la coculture des cellules microgliales, cellules immunitaires du système nerveux central.

Financement : cette étude a été sponsorisée par Sanofi Pasteur.

P93

CEMIPAI : plateforme pour l'étude d'agents infectieux de classe 3 et le criblage pharmacologique

Nathalie Gros¹, Christine Chable-Bessia¹, Aymeric Neyret¹,

Rayane Dibsy¹, Sébastien Lyonnais¹, Rémi Muller¹, Andres Merits²,

Delphine Muriaux¹

¹ Cemipai, CNRS : UMS3725, Université de Montpellier, Montpellier, France

² Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonie

<nathalie.gros@cemipai.cnrs.fr>

La plateforme Cemipai est une UMS récente, centrée sur la production à façon de virus pathogènes de classe 3 et sur le design de systèmes viraux infectieux fluorescents pour le criblage pharmacologique, avec possibilité d'automatisation par robotique. Ces systèmes de criblage sont complétés par un plateau technique de microscopies installé en laboratoire L3,

permettant l'imagerie à très haute résolution de cellules infectées vivantes et de pathogènes dans leur état natif. Ce plateau inclut un microscope de force atomique de dernière génération (Bio-AFM) permettant l'imagerie simultanée AFM/optique par épi-fluorescence sur des échantillons vivants, un nanoscope équipé pour les techniques de PALM/STORM en mode TIRF, un microscope *Spinning Disk* (voir présentation de S. Lyonnais). Conçue comme un hôtel à projet, la plateforme accueille partenaires académiques et privés pour le développement de projets de R&D, la formation aux BPL en L3 ou des prestations à la carte (production de virus ou bactéries, criblage, microscopie). Nous présentons dans cette communication les systèmes de criblage nouvellement mis au point sur la plateforme, permettant de cribler petites molécules et anticorps neutralisants : i) criblage HIV sur lymphocytes primaires par quantification de p24 en utilisant la technologie alpha-lisa (Perkin Elmer) sur lecteur Envision ; ii) criblage des virus Chikungunya (CHIKV) et Zika (ZIKV) par fluorescence, reposant sur l'utilisation de clones moléculaires recombinants infectieux exprimant la protéine mCherry. Les systèmes CHIKV et ZIKV seront détaillés, en les comparant aux virus sauvages, avec quelques exemples de molécules actives dans les étapes d'entrée de ces virus. Ces systèmes s'avèrent particulièrement robustes pour la recherche de nouveaux antiviraux.

P94

Vectorisation du système CRISPR CAS9 et de ses dérivés par pseudoparticules rétrovirales non codantes

Philippe E. Mangeot, Valérie Risson, Floriane Fusil, Fabien Aubé, Emilie Laurent, Juliana Blin, Teixeira Marie, Els Verhoyen, François Loïc Cosset, Théophile Ohlmann, Emiliano Ricci
Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), École normale supérieure Lyon, Université Claude-Bernard Lyon 1, Univ Lyon, Inserm U1111, CNRS UMR5308, Lyon, France
 <emiliano.ricci@ens-lyon.fr>

Nous avons développé une technique originale pour assurer la livraison de la machinerie CRISPR/CAS9 dans la cellule primaire et dans l'animal. Notre approche repose sur la construction d'une protéine de fusion GAG-CAS9 qui permet la production de pseudoparticules rétrovirales incorporant le complexe nucléoprotéique CAS9/gRNA. Dotées d'enveloppes virales fusogéniques, ces particules que nous appelons Nanoblades sont capables de livrer transitoirement un ou plusieurs RNPs-CRISPR et d'induire des éditions génétiques dans diverses cellules cibles primaires cibles ; parmi lesquelles des macrophages, des cellules souches hématopoïétiques humaines et des iPS humaines, pour lesquelles nous avons pu mesurer plus de 70 % d'altération génétique. Injectées dans la zone pellucide de zygotes murins, les Nanoblades président à la genèse d'animaux transgéniques et peuvent être efficaces *in vivo* après injection dans l'animal. Ces pseudoparticules sont également capables de livrer une matrice de réparation simple brin ou double brin pour assurer des insertions génétiques (*knock in*) dans diverses lignées cellulaires. Des analyses par séquençage à haut débit ont pu montrer que ces particules assuraient des coupures génétiques plus précises que des procédés basés sur la transfection. Les données présentées incluront également l'usage de variants de CAS9 délivrés par pseudoparticules virales, (comme dCAS9-VPR, une chimère promulguant la transcription POL II) pour d'autres applications génomiques. (<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/10/12/202010>. Sous Presse Nat Comm).

P95

Development of a non-radioactive method for the study of inhibitors of viral and cellular DNA polymerases

Gabriel Dupré, Christophe Pannecouque, Kris Uyttersprot
Rega Institute for Medical Research, Laboratory of Virology and Chemotherapy, Leuven, Belgique
 <christophe.pannecouque@kuleuven.be>,
 <kris.uyttersprot@kuleuven.be>

Human Immunodeficiency virus 1 (HIV-1) is notorious for its large pandemic. The Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) used for HIV treatment is essentially composed of nucleoside/nucleotide and non-nucleoside transcriptase inhibitors (NRTIs/NtRTIs and NNRTIs). The objectives are to slow down the progress of immune system deficiency and effectively block viral replication. Nevertheless, as integrated proviruses and viral reservoirs subsist, reaching a cure seems almost impossible. The HIV replication cycle consists of several steps, each of them a target for antiviral compounds. HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) is a heterodimer composed of two subunits: p66 and p51. Stopping early steps of HIV replication like the reverse transcription remains an important goal in antiviral research, preventing the formation of viral reservoirs. Therefore, methods to evaluate potential RT or more generally viral polymerase inhibitors are necessary. The most commonly used assay to measure DNA polymerase activity relies on the use of radiolabeled nucleotides, which are incorporated in a primer-extension assay. Despite its great sensitivity, the use and waste management of radioisotopes involve many risks and alternative methods should be explored. Fluorescence-based assays using the ELISA technique or FRET principles seem to be a decent alternative, but often lack sensitivity. Despite having their own characteristics, RT, viral and host cell DNA polymerases share common features. They belong to the so called "right-hand" polymerases and share all the following domains: palm, thumb and fingers domains, providing the catalytic site, the DNA duplex binding and nucleotide substrate binding functions. Because of their multiple similarities, we thought it possible to develop one assay in which all DNA polymerase enzymes could be tested. In this work, we present an optimized fluorescence-based polymerase assay that can be used as a quick, convenient and reliable screening method for antiviral compounds for a broad range of RT, viral and host cell polymerases. We based our research on an article by Driscoll *et al.* in which a fluorescence-based assay for the study of DNA polymerase kinetics is presented and combined that with our experience using the EnzCheck Reverse Transcriptase Assay Kit (Invitrogen). PicoGreen was used as a nucleic acid dye which preferentially detects dsDNA or RNA-DNA heteroduplexes with a great sensitivity and specificity. It appears to be a valuable tool for studying the production of dsDNA from a single-stranded template, and also the study of DNA polymerase activity. We designed DNA templates containing all four nucleotides to approach *in vivo* conditions. After several steps of optimizations, we tested reference compounds and experimental inhibitors against HIV-1 RT WT, mutant forms of HIV-1 RT and host cell α and β DNA polymerases. Results show similar inhibition potency to what was reported in literature, using other systems. We can conclude that this new method can be used as a reliable HTS assay for all kinds of DNA polymerases. Furthermore, our method can be extended to measure the inhibition of cellular DNA polymerases and could be used as a toxicity assay for test compounds.

P96

L'AMP-GMP cyclique incorporé dans des pseudovirions amplifie la production d'anticorps et les réponses T CD4 et CD8 dans un modèle de vaccination

Lise Chauveau, Anne Bridgeman, Jan Rehwinkel
MRC Human Immunology Unit, MRC Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, Royaume-Uni
 <jan.rehwinkel@ndm.ox.ac.uk>

L'AMP-GMP cyclique (cGAMP) est un di-nucléotide cyclique produit par cGAS en réponse à la présence d'ADN à double brin dans le cytoplasme. cGAMP administré avec un antigène est un adjuvant efficace. Nous avons récemment montré que cGAMP est incorporé dans les particules virales enveloppées qui s'assemblent à la surface des cellules infectées. cGAMP est ainsi transmis à de nouvelles cellules infectées où il induit une réponse immunitaire innée. Des pseudovirions (VLPs) ayant incorporé cGAMP contiendraient donc dans la même structure et délivreraient à la même cellule à la fois l'antigène et l'adjuvant : cGAMP. Dans cette étude, nous avons examiné l'efficacité de cette méthode pour induire une réponse

immunitaire adaptative dans un modèle de vaccination. Nous avons exploré cette nouvelle approche dans un modèle murin en utilisant des VLPs formés de la protéine Gag du VIH-1, pseudotypés avec l'enveloppe VSV-G, et qui incorporent cGAMP (cGAMP-VLPs) ou non (Empty-VLPs). Quatorze jours après une immunisation intramusculaire, la présence d'anticorps spécifiques des pseudovirus est mesurée dans le sérum. Le recrutement de cellules T CD4 folliculaires et la formation de centre germinaux sont analysés dans les ganglions lymphatiques drainants. De plus, les cellules du *spleen* sont isolées et restimulées pour examiner les réponses T CD4 et CD8 spécifiques des VLPs. Nous observons ainsi une réponse IgG plus forte dans les souris immunisées avec les cGAMP-VLPs par rapport aux Empty-VLPs. Cette réponse humorale plus importante est associée à une augmentation du recrutement de cellules T CD4 folliculaires helper dans les ganglions lymphatiques drainants. Les réponses T CD4 et CD8 polyfonctionnelles sont également plus marquées dans les souris immunisées avec les cGAMP-VLPs par rapport aux Empty-VLPs. Ces résultats suggèrent que l'incorporation de cGAMP dans des VLPs amplifie leur immunogénicité ce qui en fait de bons candidats pour des nouvelles stratégies de vaccination.

P97

Développement d'une nouvelle approche antivirale à base de peptides inhibiteurs de fusion, contre l'infection par le virus de la rougeole

Claire Dumont¹, Cyrille Mathieu^{1,2,3}, Marion Ferren^{1,2,3}, Branka Horvat¹, Matteo Porotto^{2,3}

¹ CIRI, Inserm, U1111, Université Claude-Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Lyon, France

² Department of Pediatrics, Columbia University Medical Center, New York, États-Unis

³ Center for Host-Pathogen Interaction, Columbia University Medical Center, New York, États-Unis
<claire.dumont@inserm.fr>

Le virus de la rougeole (VR) est un paramyxovirus à l'origine d'épidémies dans de nombreux pays du monde, notamment en France. C'est la première cause de décès parmi les infections dont la prévention se fait par vaccination. La rougeole se caractérise par une infection respiratoire aiguë parfois associée à une infection sévère du système nerveux central (CNS), conduisant à des syndromes neurologiques mortels. Il n'existe pas de traitement spécifique pour les complications dues à l'infection rougeoleuse. Nous avons développé une nouvelle approche antivirale basée sur l'inhibition de la machinerie de fusion du VR, en utilisant des peptides spécifiques de la région HRC (*Heptad-Repeat C-terminal*) de la protéine de fusion (F) du virus. Ces peptides interfèrent avec les transitions structurales de la protéine de fusion virale en liant la région de l'heptade répétée complémentaire située en N terminale de la F. Ils inhibent ainsi efficacement la fusion cellulaire et par conséquent l'infection par le VR. De plus, les modifications des peptides telles que leur dimérisation, leur conjugaison avec des lipides (*i.e.* cholestérol) augmentent très significativement leur efficacité antivirale *in vivo*. Afin d'étudier la pathogenèse rougeoleuse et générer des nouvelles approches prophylactiques et thérapeutiques, nous avons développé un modèle de souris transgéniques (tg), humanisées pour l'expression du récepteur d'entrée du virus de la rougeole, la molécule CD150 (SLAM). Les souris SLAM transgéniques âgées d'une semaine, et les souris SLAM croisées avec une lignée déficiente en récepteurs de l'interféron type I (IFNAR KO) âgées des 3-4 semaines sont très susceptibles à l'infection rougeoleuse. Elles développent un syndrome neurologique aigu caractérisé par une léthargie, des convulsions, une ataxie, une perte de poids et la mort sous 3 semaines post-infection intranasale. Nous avons montré que l'administration préventive du peptide spécifique du VR, nommé HRC4, permet de protéger efficacement les souris transgéniques SLAMxIFNAR KO contre l'infection létale mortelle par la souche IC323-EGFP. L'administration intra-nasale de peptide HRC4 (6 mg/kg) a permis l'inhibition efficace de l'infection des souris SLAM tg par un VR hyperfusogène portant une mutation dans sa protéine de fusion, identifiée précédemment chez les patients décédés d'encéphalites

rougeoleuses à corps d'inclusion. L'amélioration de ces peptides inhibiteurs de fusion s'insère dans un projet plus large de mise en place d'une plateforme dédiée au développement d'antiviraux adaptés non seulement au VR mais également à d'autres paramyxovirus utilisant un mécanisme de fusion similaire.

P98

Plateforme criblage viral Marseille-Timone

Franck Touret, Xavier De Lamballerie, Gilles Quérat
Unité des virus émergents (UVE), Aix-Marseille Université, IRD 190, Inserm 1207, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France
<franck.touret@hotmail.fr>

La plate-forme de criblage viral Marseille-Timone (PCVMT, resp. Gilles Quérat) est une structure, labellisée IBISA, appartenant à la « *Antiviral Drug Design Platform* » (AD2P) du réseau collaboratif Plateforme technologique Aix-Marseille. La PCVMT est impliquée dans l'étude de molécules antivirales à plusieurs niveaux de leur développement tel que le criblage initial d'une chimiothèque de molécules à l'aide de virus réplicatifs (exemple : screen Chembridge 30K/Toscana virus), la caractérisation de l'activité de molécules contre une ou plusieurs familles virales, la recherche de mutants d'échappement, et la génétique inverse associée. La plateforme, implantée en P3 et P3+ et certifiée pour la manipulation de MOT, est orientée vers les virus portés par les arthropodes (arbovirus) et disposent de plusieurs dizaines de souches cliniques validées dont tous les génotypes de la dengue, Zika et Chikungunya. Le laboratoire peut également proposer la validation de molécules *in vivo* sur modèle souris (TBEV/Zika) ou hamster (YFV) dans notre animalerie en P3+. De plus, le laboratoire fait partie du consortium EVAg et la PCVMT a de ce fait accès à un très grand nombre de souches virales. À ce jour, nous avons 40 flavivirus, 16 alphavirus et 7 *Bunyavirales* pour lesquelles des tests antiviraux sont disponibles et validés délivrant des EC50s acceptables par la FDA.

P99

Impact d'une infection par un virus influenza A porcine sur la vaccination anti-SDRP à l'aide d'un vaccin vivant atténué chez le porcelet

Patricia Renson^{1,2,3}, Céline Deblanc^{2,3}, Mireille Le Dimna^{2,3}, Stéphane Gorin^{3,2}, Sophie Mahe^{2,3}, Frédéric Paboeuf^{2,3}, Gaëlle Simon^{2,3}, Olivier Bourry^{2,3}

¹ Institut du Porc (IFIP) Paris, France

² Université Bretagne Loire (UBL), Université Rennes 2-Haute Bretagne, France

³ Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort France
<olivier.bourry@anses.fr>

Contexte. L'infection par le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcine (SDRPV), membre de la famille des *Arteriviridae*, induit des pertes économiques considérables pour la production porcine mondiale. Le contrôle du SDRPV fait largement appel aux vaccins vivants atténués (*modified live vaccine* : MLV), généralement injectés aux porcelets au moment du sevrage. Or, cette période est également propice aux infections par les virus influenza porcins de type A (*swine influenza A virus* : swIAV), des pathogènes respiratoires majeurs chez cette espèce. Des études antérieures ont montré que l'infection à swIAV induit une réponse IFN α à la fois aux niveaux pulmonaire et systémique. Par ailleurs, des données récentes suggèrent que l'IFN α peut abroger complètement la réplication d'un MLV anti-SDRP et la réponse immunitaire induite.

Objectifs. Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer chez le porcelet, l'impact d'une infection par un swIAV sur i) la réplication d'un MLV anti-SDRP ; ii) la réponse immunitaire post-vaccinale ; et iii) l'efficacité de la vaccination anti-SDRP vis-à-vis d'une épreuve virulente.

Matériel et méthodes. Trois groupes de 6 porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) ont été, respectivement, infectés par un swIAV puis vaccinés 6 h plus tard par un MLV anti-SDRP (groupe SIVAC),

vaccinés par un MLV anti-SDRP (groupe VAC), ou non vaccinés (groupe UNVAC). Quatre semaines après vaccination, les animaux ont été éprouvés par une souche sauvage de SDRPV. Un groupe contrôle non vacciné et non infecté a également été inclus. Au cours des phases post-vaccinale et post-challenge, la charge virale SDRPV a été évaluée par RT-qPCR, la réponse humorale par ELISA et la réponse cellulaire par ELISPOT IFN γ , ceci à la fois dans le sang et dans des lavages broncho-alvéolaires.

Résultats. Après la vaccination, la virémie du MLV, ainsi que la séro-conversion vis-à-vis du SDRPV, ont été détectées avec un retard de respectivement 6 et 4 jours pour le groupe SIVAC par rapport au groupe VAC. Au niveau pulmonaire, la souche du MLV a été détectée à partir de 10 jours post-vaccination pour les 2 groupes et les anticorps spécifiques vis-à-vis du SDRPV ont été détectés plus précocement pour le groupe SIVAC. Dans le groupe SIVAC, une réponse cellulaire plus élevée a été évaluée à la fois au niveau sanguin et pulmonaire. Après l'épreuve virale, l'efficacité de la vaccination a été la même pour les groupes VAC et SIVAC. **Conclusion.** Au cours de cette étude nous avons montré qu'une infection concomitante par un swIAV pouvait interférer avec la vaccination anti-SDRP à l'aide d'un MLV en retardant dans un premier temps la virémie vaccinale puis en stimulant ensuite la réponse immunitaire cellulaire aux niveaux pulmonaire et systémique. Au final, l'efficacité de la vaccination n'est pas modifiée. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre cette interférence et évaluer l'impact que pourrait avoir une infection à swIAV sur la vaccination MLV anti-SDRP en conditions de terrain.

P100

Criblage et évaluation de l'effet antiviral de molécules contre les herpèsvirus équins 1 et 4 par la mesure d'impédance cellulaire : effet de la spironolactone

Côme Thieulent¹, Erika Hue¹, Christine Fortier¹, Peggy Suzanne², Stefan Zientara³, Aymeric Hans⁴, Hélène Munier-Lehmann⁵, Pierre-Olivier Vidalain⁶, Stéphane Pronost¹

¹ Labéo Frank Duncombe, Normandie Univ, UniCaen, Biotargen EA7450, Saint-Contest, France

² Centre d'études et de recherche sur le médicament de Normandie, Normandie Univ, UniCaen, CERMN EA4258, Caen, France

³ Université Paris-Est, Laboratoire de santé animale, Anses, INRA, ENVA, UMR 1161 Virologie, Maisons-Alfort, France

⁴ Anses, Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Unité de virologie et parasitologie équine, Dozulé, France

⁵ Institut Pasteur, Unité de chimie et biocatalyse, CNRS UMR 3523, Paris, France

⁶ Équipe chimie et biologie, modélisation et immunologie pour la thérapie (CBMIT), Université Paris Descartes, CNRS UMR 8601, Paris, France
<stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr>

Neuf herpèsvirus équins (HVE-1 à 9) sont actuellement décrits chez les équidés. Parmi les cinq herpèsvirus classiquement décrits chez les chevaux nous retrouvons trois alphaherpèsvirus (HVE-1, HVE-3 et HVE-4) et deux gammaherpèsvirus (HVE-2 et HVE-5). Les HVE-1 et HVE-4 sont responsables de maladies respiratoires mais également pour l'HVE-1 de formes secondaires graves comme l'avortement et l'encéphalomyélite, conduisant à de lourdes pertes économiques. Les vaccins disponibles actuellement contre ces deux virus atténuent les problèmes respiratoires et la dissémination du virus mais ne préviennent pas suffisamment les avortements et les formes nerveuses. Par ailleurs aucune molécule ne possède d'autorisation de mise sur le marché en santé équine malgré des besoins importants. Le but de notre étude est de développer de nouvelles molécules, ou de repositionner des molécules déjà existantes, capables de lutter contre l'HVE-1 et l'HVE-4. Pour cela nous avons développé un modèle cellulaire d'étude par la technologie RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, Inc). Cette technique est basée sur la mesure d'impédance cellulaire en temps réel et permet le criblage moyen/haut débit de molécules (6 x 96 puits simultanément). Notre analyse est basée sur deux principaux paramètres que sont : le calcul d'aire sous la courbe (AUC) et le temps requis pour diminuer de

50 % la valeur maximale de Cell Index (CIT50). Suite au criblage d'une première série de 1200 molécules issues de la banque Prestwick, 14 « hits » ont été identifiés comme potentiels antiviraux contre l'HVE-1. Parmi ces molécules, nous avons retrouvé l'aciclovir et le ganciclovir, dont les efficacités avaient déjà été démontrées contre l'HVE-1 et l'HVE-4, confirmant ainsi la pertinence de notre modèle. Nous avons également identifié la spironolactone parmi les 12 autres hits, comme molécule antivirale contre l'HVE-1. Une EC50 de $26,98 \pm 1,22 \mu\text{M}$ mesurée avec le système RTCA xCELLigence et une EC50 de $9,75 \pm 3,79 \mu\text{M}$ mesurée par quantification des charges virales d'HVE-1 (qPCR) ont été obtenues contre l'HVE-1 et des résultats similaires ont été obtenus contre l'HVE-4. Par ailleurs l'efficacité de la spironolactone a récemment été démontrée *in vitro* contre le virus d'Epstein-Barr [1] et sur les virus de l'immunodéficience humaine-1 et 2 [2]. Ces résultats laissent penser que la spironolactone a un effet antiviral à large spectre et pourrait être utilisée pour lutter contre un grand nombre de virus. Les autres hits sont actuellement étudiés par qPCR pour confirmer les effets obtenus par la technologie RTCA xCELLigence.

Références

1. Lacombe B. *J Virol* 2016 ; 90 : 10972-80. <https://doi.org/10.1128/JVI.101722-16>.
2. Verma D, et al. *PNAS* 2016 ; 113 : 3609-14.

P101

Développement de la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc

Laurent Souci¹, Tristan Montier², Hervé Jaunet³, Daniel Dory¹

¹ Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité génétique virale et biosécurité, Anses, Ploufragan, France

² Inserm UMR 1078, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Brest, France

³ Zoopôle Développement, Ploufragan, France
<laurent.souci@anses.fr>

Les agents pathogènes pénètrent principalement dans l'organisme par les muqueuses. Il existe donc un intérêt croissant pour le développement de vaccins mucosaux. Malheureusement, l'immunogénicité de nombreux vaccins de ce type est insuffisante et des stratégies doivent être mises en œuvre pour l'améliorer. Elles reposent principalement sur l'utilisation de vecteurs qui assurent le transport et la protection des antigènes vaccinaux jusqu'aux muqueuses. Pour développer ce type de vaccination chez le porc dans notre laboratoire, nous utilisons un vaccin à ADN qui a largement fait ses preuves et qui confère une réponse immunitaire protectrice contre le virus de la pseudorabie (PrV) porcine. Dans ce cas, le vaccin est inoculé par la voie intramusculaire. Notre objectif est désormais d'adapter ce vaccin à une inoculation par voie intranasale. Cela se justifie ici car la voie d'entrée du virus PrV dans l'organisme est la voie oronasale et cela a du sens de neutraliser le virus dès ce point d'entrée. En pratique, le vaccin à ADN doit être véhiculé par un vecteur qui lui assurera une protection vis-à-vis de l'environnement physicochimique de la muqueuse nasale ainsi qu'une prise en charge par les cellules locales clés essentielles dans la mise en place de la réponse immunitaire spécifique. Ainsi, quatre vecteurs spécifiques du transport de l'ADN plasmidique dans les muqueuses nasales ont été identifiés par analyse bibliographique. Trois d'entre eux sont de nature nanoparticulaire (le chitosan, le chitosan mannosylé et le PLGA-PEI). Le quatrième est un lipide cationique. La capacité de ces vecteurs à fixer l'ADN plasmidique et à permettre la transfection de cellules en culture a tout d'abord été évaluée. Toutes les formulations complexent l'ADN et permettent à cet ADN de transfecter *a minima* les cellules HEK293 qui sont des cellules qui se transfectent généralement très facilement. En ce qui concerne une lignée de cellules épithéliales respiratoires humaine, la transfection de l'ADN plasmidique est vecteur dépendante. Seuls le PLGA-PEI et le lipide cationique permettent dans nos conditions expérimentales la transfection de ces cellules. Puis ces vecteurs ont été évalués pour leurs capacités à permettre au vaccin à ADN contre le PrV d'induire une réponse immunitaire mucoale et systémique après une inoculation par voie intranasale. Pour l'instant, seuls 2 vecteurs ont été évalués : le

chitosan et le chitosan mannosylé. Même si des résultats préliminaires prometteurs ont été obtenus, les réponses immunitaires générées doivent être confirmées et approfondies. Par ailleurs, les 2 autres vecteurs vont être évalués sous peu.

P102

Évaluation de la sensibilité aux anticorps monoclonaux largement neutralisants des virus VIH-1 de clade CRF02_AG transmis en France
Karl Stefic^{1,2}, Mélanie Bouvin-Pley¹, Asma Essat³, Clara Visdeloup¹, Alain Moreau¹, Cécile Goujard³, Marie-Laure Chaix⁴, Martine Braibant¹, Laurence Meyer^{3,5,6}, Francis Barin^{1,2}

¹ Université de Tours, Inserm U1259, Tours, France

² Laboratoire de virologie et CNR VIH-Laboratoire associé, Centre hospitalier régional universitaire de Tours, Tours, France

³ Centre de recherche en épidémiologie et santé des populations, Inserm U1018, France

⁴ Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Laboratoire de virologie et CNR VIH, Hôpital Saint-Louis, Paris

⁵ Université Paris XI-Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

⁶ Service santé publique et épidémiologie, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France
<karl.stefic@univ-tours.fr>

Introduction. Les anticorps largement neutralisants ou *broadly neutralizing antibodies* (bN-Abs) sont des agents prometteurs contre l'infection par le VIH en thérapie et en prophylaxie. La diversité virale au sein de l'espèce impacte néanmoins leur efficacité pan-génotypique. Il est nécessaire d'évaluer l'efficacité de ces anticorps sur les virus circulants, en particulier les virus transmis. Peu de données sont disponibles concernant le clade CRF02_AG, l'un des plus répandus en Afrique de l'Ouest et le second en France.

Méthodes. Les échantillons plasmatiques ont été obtenus au moment de la primo-infection chez 33 individus inclus dans la cohorte ANRS PRIMO entre 1997 et 2012. Les tests de neutralisation ont été effectués à l'aide de virus pseudotypés porteurs des glycoprotéines d'enveloppe des virus étudiés. Les anticorps évalués ciblaient le site de liaison au CD4 (CD4bs), la région V1/V2, la région V3, la région MPER (région externe de la gp41 proche de la membrane virale), et l'interface gp120/gp41.

Résultats. Les anticorps ciblant le CD4bs étaient les plus puissants sur notre panel de pseudovirus de clade CRF02_AG. NIH45-46G54W et 3BNC117 avaient les CI50 (concentration inhibitrices 50) les plus basses (0.08 et 0.65 µg/mL, respectivement, $p < 0.05$). Une plus grande résistance aux anticorps ciblant les régions V1V2 (PG9, PGT145) et V3 (PGT121, 10-1074) était observée sur ce panel de virus CRF02_AG. Parmi les bNAbs en cours d'essais cliniques, le pourcentage de virus neutralisés à la concentration maximale testée (10 µg/mL) par PGT121, 10-1074, 3BNC117 et VRC01 étaient respectivement de 63 %, 70 %, 85 % et 84 %. La meilleure combinaison de bNAbs était NIH45-46G54W+10E8, neutralisant 100 % et 97 % des virus à 10 et 1 µg/mL, respectivement. L'augmentation de la diversité génétique parmi les séquences Env était corrélée avec le temps ($p < 0.0001$) et à l'augmentation de la résistance à plusieurs bNAbs, dont 3BNC117 ($p = 0.011$) et 10-1074 ($p = 0.034$).

Conclusion. Nous avons développé le plus important panel de virus pseudotypés HIV-1 de clade CRF02_AG, incluant des virus récemment transmis, permettant l'évaluation de leur sensibilité à la neutralisation par les bNAbs. Les anti-CD4bs sont les plus puissants contre ce clade mais des combinaisons d'anticorps seront probablement requises. Nous avons également confirmé l'augmentation de résistance du VIH aux anticorps neutralisants, comme précédemment observé pour les génotypes B et C.

P103

Molecular mechanisms driving alphavirus resistance to IMP dehydrogenase inhibitors

Nadia Rabah^{1,2}, Oney Ortega Granda, Gilles Quéirat³, Jaime Guillen, Etienne Decroly¹, Bruno Coutard¹

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB) Aix-Marseille Université : UMR7257, CNRS UMR7257, Marseille, France

² Université de Toulon (UTLN), Université de Toulon, La Garde, France

³ Unité des virus émergents (UVE), Aix-Marseille Univ, IRD 190, Inserm 1207, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

<nadia.rabah@univ-tln.fr>

<bruno.coutard@afm.univ-mrs.fr>

The emergence and the expansion of alphaviruses (genus of the family *Togaviridae*) are a serious public health and epizootic threat. The genome of alphavirus is a positive strand RNA molecule carrying two ORFs. The first one is directly translated into four non-structural proteins (nsP) named nsP1 to nsP4, they drive viral replication and host innate immunity shut-off. nsP1 is the viral capping enzyme characteristic of alphavirus genus. It catalyses three reactions: (i) transfer of a methyl group from S-adenosyl methionine (SAM) to a GTP forming m7-GTP; (ii) guanylation of the enzyme by forming the complex m7GMP-nsP1; (iii) RNA guanylation and formation of the m7GpppA cap. The 3D structure of the protein has not been determined yet and some key residues for the catalysis remain to be identified. Interestingly, compounds inhibiting the cellular inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and thereby decreasing the pool of GTP in the cell, impaired viral replication and led to the selection of resistance mutations in the 5' region of nsP1 coding sequence. In the study presented here, we investigated the positions where resistance mutations occurred on both recombinant nsP1 and in a reverse genetics system of VEEV. We characterised capping efficiency and viral infectivity of the mutants, in order to depict the molecular mechanisms driving drug resistance.

P104

Biophysical virus particle specific characterization to sharpen the definition of virus stability

Didier Clenet¹, Tatiana Vinit¹, Damien Soulet¹, Claire Maillet¹

Françoise Guinet-Morlot², Aure Saulnier¹

¹ Analytical RD Department, France Bioprocess RD Department, Sanofi Pasteur, Marcy l'Étoile, France

² RD Traveler Endemic Department, Sanofi Pasteur, Marcy l'Étoile, France

<aure.saulnier@sanofi.com>

Vaccine thermostability is key to successful global immunization programs as it may have a significant impact on the continuous cold-chain maintenance logistics, as well as affect vaccine potency. Modern biological and biophysical techniques were combined to in-depth characterize the thermostability of a formulated rabies virus (RABV) in terms of antigenic and genomic titer, virus particle count and aggregation state. Tunable resistive pulse sensing (TRPS) and nanoparticle tracking analysis (NTA) were used to count virus particles while simultaneously determining their size distribution. RABV antigenicity was assessed by NTA using a monoclonal antibody that recognizes a rabies glycoprotein (G protein) conformational epitope, enabling to specifically count antigenic rabies viruses. Agreement between antigenicity results from NTA and conventional method, as ELISA, was demonstrated. Additionally, NTA and ELISA showed mirrored loss of RABV antigenicity during forced degradation studies performed between 5 °C and 45 °C temperature exposure for one month. Concomitant with decreased antigenicity, emergence of RABV particle populations larger than those expected for rabies family viruses was observed, suggesting RABV aggregation induced by thermal stress. Finally, using a kinetic-based modeling approach to explore forced degradation antigenicity data (NTA, ELISA), a two-step model accurately describing antigenicity loss was identified. This model predicted a RABV shelf-life of more than 3 years at 5 °C; significant loss of antigenicity was predicted for samples maintained several months at ambient temperature. This thorough characterization of RABV forced degradation study originally provided a time-temperature mapping of RABV stability.

P105**Développement d'un nouveau système de criblage à haut débit visant à identifier un large spectre de molécules antivirales actives contre le virus de l'artérite équine afin d'élargir l'arsenal thérapeutique**

José Carlos Valle-Casuso¹, Delphine Gaudaire¹, Gaël Amelot², Patrick Dallemagne³, Stéphane Pronost⁴, Stefan Zientara⁵, Pierre-Olivier Vidalain⁶, Aymeric Hans¹

¹ Anses, Unité physiopathologie et épidémiologie des maladies équine, Laboratoire de santé animale, Unité Pheed, Site Normandie, Goustranville, France

² CHU Caen, Pôle de biologie, Service de virologie, Caen, France

³ CERMN, Université Caen Normandie, France

⁴ Labéo Frank Duncombe, Normandie Univ, UniCaen, Biotargen EA7450, Saint-Contest, France

⁵ Virologie UMR1161, INRA UR1161, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, Maisons Alfort, France

⁶ Chimie biologie, modélisation et immunologie pour la thérapie (CBMIT), Université Paris Descartes, CNRS UMR 8601, Paris, France
<aymeric.hans@anses.fr>

Les virus à ARN sont responsables de nombreuses infections chez les animaux. Le virus de l'artérite équine (EAV, famille : *Arteriviridae*, ordre : *Nidovirales*) est un virus lytique qui provoque des maladies respiratoires et reproductives des équidés. Certaines stratégies de traitement ont été explorées, mais l'arsenal thérapeutique vétérinaire est limité, et sont relativement inefficaces. Aujourd'hui, seuls les traitements *in vitro* avec des oligomères phosphorodiamidate morpholino ou des séquences de siRNA conçues contre le génome de l'EAV présentent un certain effet antiviral. Malheureusement, ces stratégies ne sont pas compatibles avec une utilisation *in vivo* chez le cheval. Ainsi, afin de disposer d'un traitement efficace contre cette maladie, nous avons conçu un système de criblage à haut débit (SCHD) qui nous permettra de tester des milliers de molécules. Dans un premier temps, nous avons concentré nos recherches sur les molécules antivirales à large spectre (ALS), molécules ayant au moins une activité antivirale contre plus de trois virus différents. La plupart des ALS ciblent des fonctions de la cellule hôte plutôt que le virus lui-même. C'est pourquoi notre test utilise des cellules dermiques équine (ED). Comme premières molécules à tester, nous avons sélectionné la ribavirine et le brequinar, molécules commerciales décrites comme des ALS et utilisées dans le traitement du virus respiratoire syncytial humain (VRSH), des fièvres hémorragiques virales (VHF) et de l'hépatite C notamment. Nous avons analysé deux plaques de 96 puits pour mesurer la concentration en ATP et avons récupéré le surnageant pour la quantification du génome viral pour chaque condition après 1 hpi, 24 hpi et 48 hpi. Sur la plaque N1, nous avons déterminé l'effet cytopathique et cytotoxique des molécules. Les cellules de la plaque N2 ont été infectées avec la souche Bucyrus de l'EAV et ont été utilisées pour déterminer la concentration inhibitrice des molécules testées. Nos résultats ont montré que la ribavirine altère l'infection par l'EAV à 2 µg/mL, réduisant ainsi la mort cellulaire, diminuant le nombre de génomes viraux dans le surnageant et réduisant de près de 3 log le pouvoir infectieux du virus (PFU/mL). Inversement, les résultats avec le brequinar étaient moins satisfaisants. Les résultats obtenus avec la ribavirine montrent pour la première fois l'effet anti-AVE d'une molécule non dérivée d'acide nucléique. Ces résultats valident notre SCHD et nous ont incités à élargir l'étude aux IPPA17-A04 et au GAC50, deux nouvelles molécules ALS décrites en 2016. Les nouveaux résultats ont montré une augmentation de la viabilité cellulaire, une réduction des copies du génome viral et 3 logs de réduction de PFU/mL sans aucun effet cytotoxique. Pour conclure, nous avons mis au point un nouvel essai de SCHD qui nous permettra (I) de pouvoir tester plusieurs milliers de molécules antivirales contre l'EAV ou un autre virus lytique infectant les cellules équine ; (II) d'étudier l'effet antiviral directement sur les souches virales collectées sur le terrain ; (III) et d'élargir l'arsenal thérapeutique vétérinaire contre les virus avec trois nouvelles molécules ALS qui sont efficaces *in vitro* contre l'EVA.

P106**Caractérisation de l'activité anti-Zika d'une nouvelle classe de petites molécules antivirales à large spectre, inhibitrices des cyclophilines**

Laurent Softic, Rozenn Brillet, Quentin Nevers, Nazim Ahnou, François Berry, Isaac Ruiz¹, Slim Fourati¹, Jean-François Guichou², Jean-Michel Pawlotsky^{3,4}, Abdelhakim Ahmed-Belkacem³

¹ Centre national de référence des hépatites virales B, C et Delta, Inserm : U955, Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne (UPEC), Créteil, France

² Centre de biochimie structurale (CBS), Inserm : UMR5048, France

³ Inserm U955, CHU Henri-Mondor, Créteil, France

⁴ Unité de virologie, Département de microbiologie, CHU Henri-Mondor, Créteil, France

<laurent.softic@inserm.fr>

<akim.ahmed-belkacem@inserm.fr>

Entre 2007 et 2017, le virus Zika, qui n'était jusque-là responsable que de cas sporadiques en Afrique et en Asie du Sud-Est, a été responsable de nombreuses épidémies, notamment en Amérique et plus particulièrement au Brésil où on a pu compter entre 440 000 et 1,5 millions de cas. Bien qu'asymptomatique dans 80 % des cas, les cas les plus sévères sont à associés à cas de syndrome de Guillain-Barré, de méningo-encéphalite et des cas de microcéphalies chez les nouveaux-nés de femmes infectées. Il n'existe actuellement aucun traitement et aucun vaccin contre le virus Zika. La dépendance de nombreux virus aux cyclophilines, une famille de 17 protéines chaperonnes humaines en ont fait une cible idéale pour le design d'un antiviral à large spectre. En collaboration avec une équipe de Montpellier (équipe du Pr Guichoux), le laboratoire a alors conçu des petites molécules inhibitrices de cyclophilines par FBDD (*Fragment Based Drug Design*) appelées *Small Molecules Cyclophilins Inhibitors* (SMCypI) (Ahmed-Belkacem A et al, *Nat Commun*). Toutes les expériences ont été réalisées avec la souche ancestrale du virus Zika, MR766, en infectant des cellules hu7. En mesurant l'ARN viral par RT-qPCR, nous avons pu montrer que certains SMCypI inhibent la réplication du virus Zika contrairement aux inhibiteurs connus des cyclophilines, la cyclosporine A et son dérivé non immunosuppresseur l'aliporivir. Plus particulièrement les composés F799 et F833 qui inhibent de plus de 100 fois la réplication du virus Zika à 25µM *in vitro*.

P107**Dimers of Peptide Nucleic Acid to inhibit viral HCV NS5B polymerase activity**

Reuben Ovadia¹, Barbara Selisko², Clémence Mondielli², Michel Ventura³, Stéphane Priet⁴, Pieter Leyssen⁵, Gilles Quéirat^{2,6}, Jean-Jacques Vasseur⁷, François Morvan^{7,8}, Bruno Canard², Carine Baraguey⁷, Vincent Delauzun², Karine Alvarez²

¹ LOBP, Emory University, School of Medicine, Atlanta, USA, États-Unis

² Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), Aix-Marseille Université : UMR7257, CNRS UMR7257, Marseille, France

³ Laboratoire MFP (CNRS UMR 5234), Université de Bordeaux, Bordeaux, France

⁴ EPV (AMU, IRD 190, Inserm 1207), Aix-Marseille Université, Marseille, France

⁵ Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven, Belgium, Belgique

⁶ Unité des virus émergents (UVE), Aix-Marseille Univ, IRD 190, Inserm 1207, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

⁷ Institut des biomolécules Max-Mousseron [Pôle Chimie Balard] (IBMM), CNRS UMR5247, Université de Montpellier, École nationale supérieure de chimie de Montpellier, Montpellier, France

⁸ Université Montpellier 2 (IBMM) ; CNRS : UMR5247, Université Montpellier I, Université Montpellier II-Sciences et techniques du Languedoc, Montpellier, France

<karine.alvarez@afmb.univ-mrs.fr>

In our search for efficient antivirals to control human infections originating from viruses, we have described 5'-GC-3' phosphoramidate dinucleosides

as HCV NS5B polymerase inhibitors [1, 2]. These active compounds were rationally designed to hence their inhibition properties by blocking the active site of the HCV polymerase. We applied this concept of « dimeric inhibitors » to Peptide Nucleic Acid (PNA) series. We developed a solution phase synthesis to obtain PNA monomers, dimers and chimeric PNA-RNA using microwave-promoted Ugi multicomponent reactions [3, 4]. The inhibitory effect of several di-PNA was evaluated *in vitro* on HCV NS5B polymerase and in HCV infected cell cultures. Target compounds were also evaluated for *in vitro* activity against a broad panel of RNA viruses.

Références

1. Zlatev I *et al.* *J Med Chem* 2008 ; 51 : 5745-57.
2. Priet S *et al.* *J Med Chem* 2010 ; 53 : 6608-17.
3. Ovadia R, *et al.* *Org Biomol Chem* 2015 ; 13 : 11052, 11071.
4. Ovadia R *et al.* *Eur J Org Chem* 2017 ; 469-75.

P108

HIV specific silencing agents for a potential functional cure

Cecilia Ramirez^{1,2}, Benoît Lacombe², Luisa Mori³, Susana Valente³

¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS UMR9198 Gif-Sur-Yvette, France

² Institut Cochin, Inserm, U1016, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³ The Scripps Research Institute, Florida, États-Unis
<cecilia.ramirez@i2bc.paris-saclay.fr>

While current antiretroviral treatment regimens have been extremely effective, issues of latency, associated toxicity, cost and resistance remain. There is a need for novel approaches and antiretroviral compounds to complement the existing therapy and for developing new strategies for inhibition of HIV infection. Transcription from the HIV promoter in the viral long terminal repeat is regulated by the combined activity of the host transcription machinery and the viral transactivator Tat protein. Recently, the Tat inhibitor didehydro-cortistatin (dCA) has been reported to prevent viral reactivation from latent reservoirs, resulting in a permanent state of latency or block-and-lock that could eventually culminate in a functional cure of HIV (Mousseau *et al.* 2015). When introduced to humanized mice models of HIV-1 infection, dCA stops the virus's production, activation, and the replenishment of other infected cells that would contribute to the spread and growth of HIV (Kessing *et al.* 2017), this work demonstrated the potential of block-and-lock cure strategies. We have discovered that spironolactone (SP) - an antagonist of aldosterone - specifically inhibits HIV infection of permissive T cells and reactivation of latently infected T cells (Lacombe *et al.* 2016). SP-induced inhibition is mediated by blocking transcription of HIV-1 and HIV-2 and the reactivation of transcription from latent HIV-1 promoters in latently infected cells. We have observed differences in the long-term effects of SP *versus* dCA, since SP promotes a quicker shutdown but does not lead to long lasting epigenetic marks. Conclusions: i) SP offers the advantages of being cheap and acting both in permissive cells as well as in reservoirs where the virus persists despite antiretroviral therapy. ii) HIV transcriptional inhibitors like dCA and SP that prevent infected cells from making viruses, stop the side effects of low-level virus production. iii) HIV specific silencing agents such as dCA and SP could be used as a strategy to reduced immune activation.

P109

Development of mouse and non-human primate models for non-clinical immunogenicity and efficacy assessment of purified inactivated Zika vaccine

Marie-Clotilde Bernard, Nadine Petiot, Catherine Berry, Sandrine Raynaud, Aymeric De Montfort, Nathalie Mantel, Vincent Pavot, Valérie Lecouturier
Sanofi Pasteur, Marcy l'Étoile, France
<Marie-Clotilde.Bernard@sanofi.com>

Zika virus (ZIKV) is an emerging mosquito-borne flavivirus that can lead to fetal microcephaly and other birth defects in infants and Guillain-Barré syndrome in adults. Sanofi Pasteur has collaborated with the Walter Reed Army Institute of Research in the development of an optimized purified inactivated Zika vaccine (ZPIV). To demonstrate its performance, the development of relevant non-clinical models is needed. Regarding mouse models, a dose-ranging immunogenicity schedule was primarily set up in BALB/c mice. For efficacy assessment, a challenge model was first established in BALB/c mice: 10 PFU of the recent wild type ZIKV PRVABC59 strain delivered *via* IV route allowed detection of viral RNA in blood. A more stringent infectivity model was then set up in the more permissive A129 mouse strain, knocked out in IFN type I receptors: 3 log₁₀ PFU of ZIKV PRVABC59 inoculated *via* SC route induced viral RNA in blood as well as in spleen, testes and brain. Regarding a non-human primate model, we demonstrated that Cynomolgus macaques were permissive to the PRVABC59 ZIKV strain. After inoculation of 5 or 6 log₁₀ PFU by either the IV or SC route, ZIKV RNA was detected in blood and occasionally in CSF samples. The highest peak and longest duration of viremia was achieved at 5 log₁₀ PFU. Although IV tended to generate slightly higher viremia levels than SC inoculation, the latter route was selected for practical reasons and because it better reflected natural virus delivery *via* a mosquito bite. These animal models were used to study the immunogenicity and efficacy induced by Zika vaccine candidates. This project has been funded in whole or in part with Federal Funds from the Department of Health and Human Services; Office of the Assistant Secretary for Preparedness and Response; Biomedical Advanced Research and Development Authority, under Contract No. HHSO1002016000039C. ©2017-2018, Sanofi Pasteur.

P110

The endonuclease domain of arenavirus L protein as a target for antivirals development

Sergio Hernandez¹, Clémence Mondilli¹, Th. Van Nguyen, Claudia Sepulveda², Cybele García², Juan Reguera¹, François Ferron¹, Karine Alvarez¹

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), Aix-Marseille Université : UMR7257, CNRS UMR7257, Marseille, France

² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica-Iquibicen (Conicet-UBA), Laboratorio de Virología, Argentina
<Sergio.Hernandez@afmb.univ-mrs.fr>

The *Arenaviridae* family is composed of negative single-stranded RNA viruses with a bisegmented genome and includes some of the world's deadliest human viruses as Lassa virus, responsible of 500.000 cases per year with a mortality rate up to 30 % in some cases. The lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), causing mild infections to central nervous system disease, congenital malformation, and choriomeningitis, is the prototypic virus of this family. The only licensed drug for the treatment of arenavirus infection is ribavirin, which reduces morbidity and mortality, but with mixed success and significant toxicities. With the spreading of Arenaviruses infections, therapeutic solutions have to be developed in order to avoid a serious issue of public health. Arenaviridae genome encodes for 4 proteins, among which the full length protein L is the large multifunctional protein including endonuclease (EndoN) and RNA polymerase (Pol) domains. EndoN is necessary for the transcription of viral mRNA *via* cap-snatching mechanism. Because this mechanism is specific to viruses, it has become an interesting target for development of antivirals, with successful results as demonstrated by the very recent FDA approval of Baloxavir, as inhibitor of the EndoN of influenza. Our team has developed a library of 80 ligands able to block the EndoN by chelating critical metal ions present in the catalytic active site. The ligands were selected by biophysical methods for their ability to bind the LCMV EndoN. The LCMV full length L protein was produced for the first time and used in an *in vitro* assay to evaluate the efficiency of the compounds. We also tested their antiviral activity in a LCMV minigenome assay and in cells

infected by the JUNIN virus. Some compounds display potent inhibition of EndoN activity and are active in infected cells indicating that they inhibit viral transcription and replication. Altogether, these data provide a proof of concept that the EndoN can be used as a target for anti-arenaviral drug design.

P111

Optimisation de la technique de Génétique Inverse pour l'obtention du virus Influenza : Comparaison des méthodes à 8 et 12 plasmides

Morgan Sarry¹, Isabelle Peubez¹, Julie Medina², Maryann Giel-Moloney³, Jean-Marc Guillaume¹, Jean Haensler¹, Isabelle Legastelois¹

¹ Research and NCS, Sanofi Pasteur, Marcy l'Étoile, France

² GeNeuro SA, Lyon, France³ Sanofi Pasteur, Cambridge, MA, États-Unis
<Isabelle.Legastelois@sanofi.com>

La technique de génétique inverse (« *reverse genetics* » en anglais, ou RG) permet, à partir de plusieurs plasmides codant les différentes protéines virales, de reconstituer un virus entier. Elle est utilisée pour les virus à ARN et en particulier les virus à ARN négatif, comme celui de la grippe. L'objectif de cette étude est de comparer les techniques de RG utilisant respectivement 8 et 12 plasmides. La méthode à 12 plasmides étant celle utilisée en routine depuis plusieurs années dans notre laboratoire (Medina *et al.* 2014), la technique à 8 plasmides étant théoriquement plus simple et souvent présentée comme plus efficace. Pour cela, un mélange de cellules CHO-K1 (cellules d'ovaire de hamster) et Vero (cellules de rein de singe vert) a été transfecté par nucléoporation avec soit 8, soit 12 plasmides. En théorie, les cellules Vero sont préférentiellement transfectées par les 8 ou 12 plasmides et permettent la production des premières particules virales, qui vont ensuite infecter les cellules CHO, mais aussi d'autres cellules Vero. Ces plasmides permettent la synthèse des 8 segments d'ARN viraux, et l'expression des 3 polymérases (PB1, PB2 et PA), ainsi que celle de la nucléoprotéine (NP) de la souche A/PR/8/34 (H1N1) du virus influenza. La reconstitution, dans la cellule, des 8 complexes ribonucléoprotéiques (RNP), contenant chacun un segment d'ARN viral, les polymérases et la nucléoprotéine, est nécessaire à la production de virions. Après transfection, la production virale a été mesurée dans le surnageant des cellules Vero/CHO par titrage UHA (unité hémagglutinante) traduisant la capacité du virus à agglutiner les globules rouges de dinde en se fixant à leur surface. Contrairement à ce qui était attendu, le système de RG à 8 plasmides ne semble pas plus efficace que le système à 12 plasmides pour la production du virus A/PR/8/34 (H1N1). Cependant, la méthode à 8 plasmides est plus simple à réaliser d'un point de vue technique puisqu'elle nécessite l'utilisation d'un moins grand nombre de plasmides. Une confirmation de cette tendance pourrait être réalisée en utilisant un autre virus grippal. Le virus A/PR/8/34 (H1N1) étant considéré comme un modèle pour ce genre d'expérimentation les résultats devraient être similaires. Il faudrait également reproduire ces expériences en ne transfectant non plus un mélange de cellules Vero/CHO, mais uniquement des cellules Vero, plus adaptées à la production de vaccins mais également plus difficiles à utiliser seules en RG.

P112

Induction d'une immunité protectrice contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift par vaccination à ADN optimisée

Tiphany Chrun^{1,2}, Sandra Lacote², Céline Urien¹, Joan Pujols³, Philippe Marianneau², Isabelle Schwartz-Cornil¹

¹ Virologie et immunologie moléculaire, Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UR892, Jouy-en-Josas, France

² Unité virologie, Anses, Lyon, France

³ CRESA, Barcelone, Espagne

<sandra.lacote@anses.fr>

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une arbovirose zoonotique dont l'agent étiologique est le virus FVR (vFVR). La maladie peut être

sévère chez l'homme avec des formes ictéro-hémorragiques ou méningo-encéphaliques. Chez le mouton, elle se caractérise par des fièvres, des avortements et un taux de mortalité élevé chez les jeunes animaux. Le développement de vaccins contre le vFVR est une priorité de l'OMS, en raison du risque d'émergence en Europe. Seuls des vaccins à usage vétérinaire sont commercialisés mais ils présentent soit une faible immunogénicité (virus inactivé) nécessitant plusieurs injections (coût élevé), soit un risque de réversion (virus atténué). Il n'y a donc ni traitement, ni vaccin sûr et efficace pour l'homme et les ruminants. La vaccination à ADN est une stratégie vaccinale intéressante. L'ADN présente l'avantage de pouvoir être produit rapidement à grande échelle et à coût abordable. Dans notre étude, nous avons développé une stratégie vaccinale innovante en combinant la vaccination à ADN avec le ciblage des cellules dendritiques (DC) chez le mouton, ainsi que dans le modèle murin pour étudier les mécanismes de protection conférée. L'antigène eGn du vFVR est directement adressé à des récepteurs à la surface des DC grâce à des scFv (*single chain fragment variable*) correspondant à la fusion des extrémités des anticorps dirigés contre les récepteurs candidats des DC. L'immunogénicité de l'ADN est par électroporation suite à une injection intradermique permettant d'augmenter le taux de transfection des cellules et la co-injection d'un plasmide adjuvant. Nous avons montré que les vaccins ADN codant pour eGn induisent une immunité protectrice totale chez la souris, et partielle mais substantielle chez le mouton. En revanche, le ciblage de eGn aux DC *via* des scFv a un effet négatif sur la protection induite contre le vFVR dans les deux modèles et cette stratégie induit des réponses immunitaires différentes dans les 2 espèces : la réponse cellulaire est améliorée chez le mouton et au contraire, inhibée dans le modèle murin. Néanmoins, dans nos deux modèles d'études, l'administration concomitante du plasmide codant l'eGn natif avec le plasmide adjuvant induit la meilleure protection clinique après une épreuve virale par rapport aux vaccins ciblant les DC, ainsi qu'une forte production d'anticorps spécifiques non neutralisants. Les analyses de corrélation réalisées à partir des données immunologiques et virologiques obtenues avant et après l'épreuve virale chez les moutons immunisés ont montré une corrélation entre la réponse anticorps anti-eGn, la réduction de la charge virale et la protection clinique. Nous avons par la suite confirmé le rôle protecteur des anticorps anti-eGn induits par notre vaccin codant l'eGn natif, par un transfert passif dans le modèle murin. L'hypothèse d'une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps non neutralisants comme mécanisme d'action reste encore à être déterminée dans cette protection. L'ensemble des expérimentations confirme le rôle important des anticorps dans la protection induite par le vaccin ADN et montre pour la première fois l'efficacité d'une vaccination à ADN contre le vFVR dans l'hôte naturel, le mouton.

P134

Évaluation de l'activité antivirale du mûrier, les extraits de plantes sur la voie des grandes questions

Inès Thabti, Stéphanie Philippot, Arnaud Risler, François Dupire, Brenda Westerhuis, Stéphane Fontanay, Thomas Kassab, Walid Elfalleh, Ali Aferchichi, Raphaël Duval, Mihayl Varbanov

Laboratoire lorrain de chimie moléculaire (L2CM), CNRS : UMR7565, Université de Lorraine : Faculté de Pharmacie, Vandœuvre-Lès-Nancy, France

<mihayl.varbanov@univ-lorraine.fr>

Les infections virales provoquent chaque année des maladies mortelles chez des millions de personnes et sont responsables d'épidémies dans le monde entier, représentant ainsi un problème extrêmement important pour la santé publique. En l'absence de traitements spécifiques contre les infections virales chez l'homme, les produits naturels offrent une alternative en termes de pharmacothérapie innovante. À la recherche de molécules bioactives efficaces, nous avons analysé les propriétés antivirales des feuilles et de l'écorce de tige du mûrier (*Morus* spp.), connu pour ses multiples activités biologiques. Dans notre étude, nous avons comparé l'activité antivirale de *Morus* spp. sur des virus enveloppés et non enveloppés, tels que le coronavirus humain (HCoV), le poliovirus humain (PV), le

paréchovirus humain (HPaV) et un modèle du norovirus (calicivirus félin-F9). L'activité antivirale de 12 extraits végétaux aqueux et hydro-alcooliques de feuilles et d'écorce de tige de trois espèces différentes de mûrier – *Morus alba* var. *alba*, *Morus alba* var. *rosa* et *Morus rubra* ont été évalués. Nos résultats ont montré que plusieurs extraits pouvaient réduire le titre viral et les effets cytopathogènes des virus. Curieusement, les extraits hydro-alcooliques de feuilles de *Morus alba* var. *alba* ont montré une activité antivirale maximale sur les virus enveloppés (HCoV), tandis que deux extraits hydro-alcooliques en particulier, l'un de l'écorce de tige de *Morus rubra* et l'autre des feuilles de *Morus alba* var. *rosa* étaient les plus efficaces sur poliovirus et sur le modèle du norovirus. D'autre part, l'impact antiviral sur HPaV était surtout associé à des extraits aqueux de feuilles et d'écorces de tige des trois espèces de mûrier testées. Notre analyse par HPLC a révélé la présence de différents composés polyphénoliques dans les extraits, les principaux étant la coumarine, les tanins, les triterpènes et les flavonoïdes. Nous avons en outre identifié des composés spécifiques présents dans les extraits les plus efficaces au niveau antiviral, tels que les alcaloïdes (1-déoxynojirimycine), les flavonoïdes prénylés (kuwanon) et les stilbénoides (mulberroside). Nos travaux actuels sont basés sur l'analyse des mécanismes moléculaires antiviraux de composés sélectionnés isolés à partir d'extraits de mûrier.

P137

MVL-RVF-eGn, un candidat vaccin prometteur contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Laetitia Boutin¹, Sandra Lacote², Fanny Jarjavall¹, Christophe Peyrefitte¹, Philippe Marianneau², Audrey Ferrier-Rembert¹

¹ Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), Service de santé des armées, Brétigny-sur-Orge, France

² Anses Lyon, Laboratoire de Virologie, Lyon, France
<audreyferrier@yahoo.fr>

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV), agent causal de la fièvre de la vallée du Rift (RVF), est un virus zoonotique transmis par les moustiques. Endémique en Afrique subsaharienne, RVF constitue une menace biologique pour l'homme et les ruminants. Une flambée de RVFV pourrait émerger dans des pays indemnes *via* des attaques bioterroristes ou les échanges commerciaux. L'introduction de RVFV en Europe, en Asie ou en Amérique aurait des conséquences désastreuses en santé publique et sur l'économie. Le virus peut contaminer les populations d'arthropodes, de ruminants, et l'homme, entraînant des maladies sévères et parfois mortelles, sans qu'il n'y ait de traitements adaptés ni de vaccins autorisés. Les vaccins atténués existants ne sont pas sûrs et les vaccins inactivés, très peu efficaces. Le développement de vaccins efficaces doit être envisagé. Dans un contexte de risque d'utilisation de la variole comme arme biologique, depuis son éradication en 1980 et l'arrêt de la vaccination, nous avons développé une stratégie prophylactique impliquant un candidat vaccin antivariolique. Le candidat vaccin MVL (*modified vaccinia lister*) a été développé sur la base d'un clone représentatif du vaccin antivariolique utilisé en France lors de la campagne d'éradication. Ce virus recombinant a été atténué par délétions ciblées de plusieurs gènes de virulence et utilisé comme vecteur d'antigènes. Deux candidats vaccins ont été développés contre le RVFV. Les candidats vaccins développés contiennent un gène synthétique complet de la nucléoprotéine du RVFV (NP) ou le gène de l'ectodomaine de la glycoprotéine N (eGn). Cette insertion dans le génome du MVL est réalisée par recombinaison homologue sur un des 3 sites de délétion du virus MVL. L'expression de la NP et de l'eGn par les virus recombinants MVL-RVF-NP et MVL-RVF-eGn, respectivement, a été montrée en culture cellulaire. Une étude de protection a été réalisée sur un modèle d'infection murin par le RVFV. Différents schémas vaccinaux ont été évalués ; une simple injection de candidat vaccin (MVL-RVF-eGn ou MVL-RVF-NP) ou une double injection homologue (MVL-RVF-eGn

ou MVL-RVF-NP) ou hétérologue (MVL-RVF-eGn et MVL-RVF-NP), à 30 jours d'intervalle. Les résultats montrent que l'injection en sous-cutané d'une simple dose (106 pfu) de candidat vaccin MVL-RVF-eGn, est suffisante pour protéger les souris contre une épreuve létale avec le RVFV 30 jours après la dernière immunisation. Le candidat vaccin MVL-RVF-NP n'est pas protecteur. Ces résultats préliminaires seront complétés par une étude d'immunogénicité humorale et cellulaire spécifique du RVFV. Ils démontrent déjà l'efficacité du candidat vaccin MVL-RVF-eGn et le potentiel du vecteur recombinant MVL comme vecteur vaccinal.

P138

Développement de Nanobodies et Diabodies pour lutter contre le virus Ebola

Allélé Boubou Coulibaly¹, Aline Desmyter¹, Magali Grange¹, Alexis Dogliani¹, Vincent Delaunay¹, Isabelle Imbert¹, Sylvain Baize^{2,3}, Alain Roussel¹

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB, UMR 7257), Aix-Marseille Université-AMU, CNRS Marseille, France

² CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

³ Unité de biologie des infections virales émergentes (Ubive), Institut Pasteur, France

<alain.roussel@afmb.univ-mrs.fr>

Le virus Ebola est un des agents pathogènes les plus virulents au monde. Il induit une fièvre hémorragique généralisée et une mortalité de 25 à 90 %. Depuis sa découverte, plusieurs épidémies ont été recensées. La plus désastreuse a été celle de 2014-2015 avec 28 000 cas détectés pour plus de 11 000 morts. Récemment en novembre 2018, l'épidémie a causé 186 morts en RDC. La maladie est plus souvent retrouvée en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale. Le virus Ebola appartient à la famille des Filoviridae. Il a un génome de 7 gènes qui codent pour 9 protéines. C'est un virus enveloppé, les seules molécules présentes à l'extérieur de la membrane sont les glycoprotéines (GP) servant à l'entrée du virus dans les cellules. Elles constituent donc les seules sources antigéniques pour séro-neutraliser ce virus. La GP d'Ebola, présente sous forme trimérique à la surface du virus, est constituée de deux domaines (GP1, GP2), relié par un pont disulfure. Le domaine GP1 possède une partie glycane et une partie mucine. La première étape de l'entrée du virus correspond à une reconnaissance non spécifique entre le domaine mucine de la GP et les récepteurs de type sucre situés sur la membrane de la cellule hôte. L'internalisation du virus dans la cellule se fait par macropinocytose. Suite à l'acidification de l'endosome, le domaine mucine est clivé libérant l'accès au site de liaison au récepteur. La reconnaissance du récepteur NPC1 entraîne la fusion de la membrane du virus avec celle de l'endosome libérant ainsi le génome viral dans le cytoplasme de la cellule. Les nanobodies sont les domaines variables des IgG ne comportant que la chaîne lourde trouvée chez les camélidés. Leurs avantages sont qu'ils ont une petite taille (15 kDa), qu'ils sont faciles à cloner et à exprimer, qu'ils ont une grande stabilité et résistance aux conditions physicochimiques extrêmes et qu'ils sont peu immunogènes. Les diabodies sont des molécules bispécifiques constituées de deux nanobodies reliés par un « linker ». Après immunisation d'un lama avec de la GP d'Ebola ne comportant pas de domaine mucine, 12 nanobodies ont été sélectionnés positivement. Malheureusement aucun nanobody testé par séro-neutralisation au laboratoire P4 de Lyon par l'équipe de Sylvain Baize ne donnait de réponse positive. Nous avons alors construit des diabodies en reliant un des nanobody reconnaissant la GP entière avec un des nanobodies reconnaissant la GP déléetée de son domaine mucine. Un des diabodies testés a donné un résultat positif de 60 % de neutralisation. Les diabodies semblent donc être une bonne voie pour la mise au point d'un traitement de la maladie du virus Ebola. Dans la suite du travail, nous allons construire d'autres diabodies en essayant différentes combinaisons de nanobodies avec différentes tailles de linker.