



HAL
open science

Construction et caractérisation d un clone infectieux du virus West Nile souche hautement virulente IS-98-ST1

Céline Bahuon, Sylvie Lecollinet, E. Mertens, Steeve Lowenski, Stéphane Zientara

► To cite this version:

Céline Bahuon, Sylvie Lecollinet, E. Mertens, Steeve Lowenski, Stéphane Zientara. Construction et caractérisation d un clone infectieux du virus West Nile souche hautement virulente IS-98-ST1. XIIIème Journées Francophones de Virologie, Apr 2011, Paris, France. pp.1, 2011. hal-02811471

HAL Id: hal-02811471

<https://hal.inrae.fr/hal-02811471>

Submitted on 6 Jun 2020

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

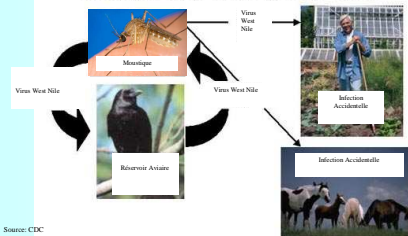
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Le clone infectieux du Virus West Nile, souche IS-98-ST1, comme outil pour étudier les déterminants moléculaires de la neurovirulence

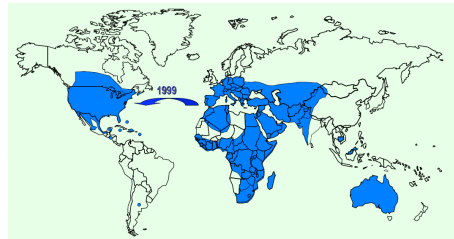
Céline BAHUON¹, Sylvie LECOLLINET¹, Muriel COULIER¹, Eva MERTENS², Stéphan ZIENTARA¹, Philippe DESPRES².
¹ UMR1161 Virologie, AFSSA, INRA, ENVA, 23 avenue du Général de Gaulle, 94703 MAISONS-ALFORT, France
² Unité Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôte, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS cedex 15, France

CONTEXTE :

Cycle de transmission du virus West Nile 2010



et Répartition géographique mondiale en



OBJECTIFS :

Les études portant sur les déterminants moléculaires de la neurovirulence utilisent des clones infectieux de souches hautement pathogènes New York 1999 (NY99) (Beasley et al., 2005), et peu virulentes d'origine africaine (956) (Yu et al, 2005) ou australienne (Kunjin) (Liu et al, 2003).

Or le contexte européen a sa propre spécificité et est peu étudié. Nous avons comme objectif de travailler sur un clone infectieux Israël 1998 (IS98), souche hautement pathogène à l'origine d'une épidémie importante dans le bassin méditerranéen.

Construction du clone infectieux IS98:

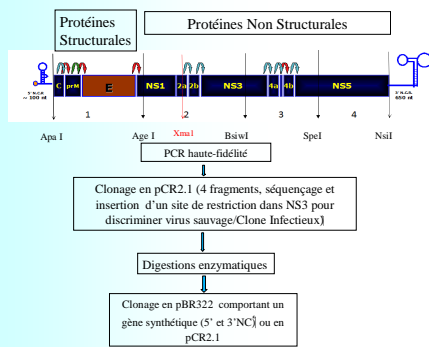


Figure 1: Stratégie de clonage du génome du VWN, IS-98-ST1. En noir, sites de restriction utilisés pour le clonage, en rouge site de coupure dans le fragment 2 utilisé pour la reconstitution du clone infectieux.

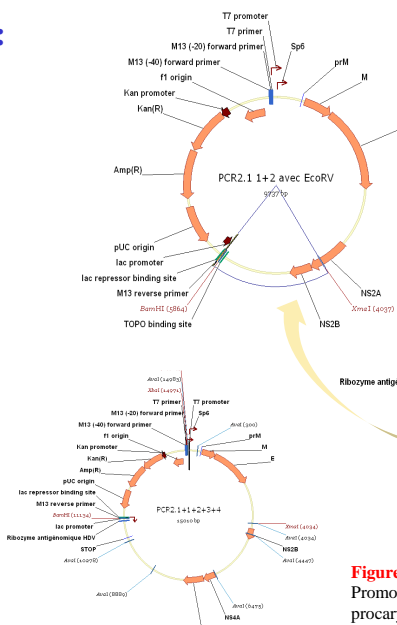


Figure 2: Constructions obtenues. A gauche: plasmide pCR2.1 avec les fragments 1 et 2. A droite: plasmide pBR322 avec les fragments 3 et 4, et la partie 3' du fragment 2.

Figure 3: Construction finale comprenant les fragments 1 à 4. Promoteur= Sp6/transcription *in vitro*, pas d'expression en système procaryote...Ribozyme HDV: fragments ARN arrêtés en 3'UTR

Production et validation du virus recombinant:

Figure 4: Linéarisation du plasmide par digestion enzymatique avec l'enzyme Bam HI. Transcription *in vitro* avec le Kit Sp6 MEGascript High yield transcription (Ambion).

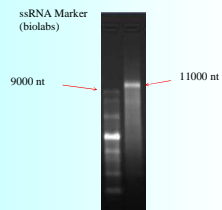


Figure 5: Transfection de cellules Vero avec le transcrit. FCS= Serum de veau fœtal. ECP = effet cytopathogène.

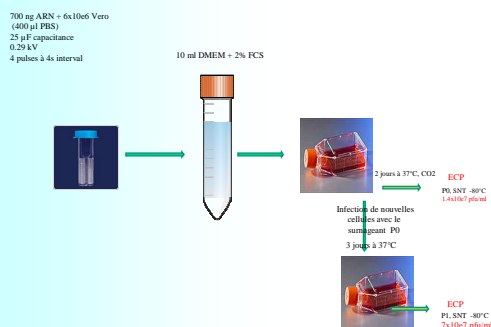


Figure 6: Un marquage par immunofluorescence avec un anticorps anti-NS1 a permis de montrer l'expression de la protéine virale sur des cellules Vero transfectées avec le virus P1 WN IS98 recombinant.

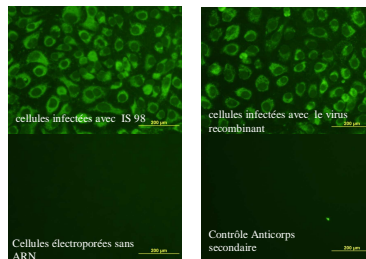


Figure 7: Cinétique d'infection sur cellules Vero. Les ARN viraux ont été extraits des cellules et amplifiés par RT-PCRq (Linke et al., 2007). Il n'y a pas de différence significative entre les deux virus (p<0.05).

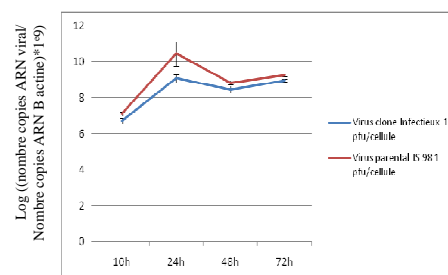
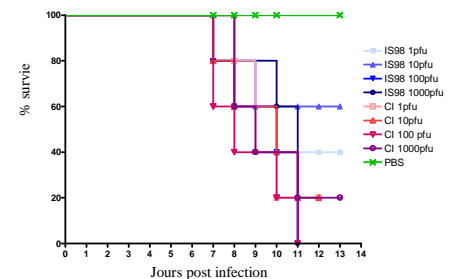


Figure 8: Courbes de survies des groupes de 5 souris balb/c de 6 semaines infectées en intra péritonéal à différentes doses de virus IS98 ou clone infectieux (CI). Il n'y a pas de différence significative entre les deux virus (p<0.05).



PERSPECTIVES:

Cet outil nous permettra de faire des mutants ou des chimères impactant sur la virulence du virus issu de ce clone infectieux, et ainsi préciser les déterminants moléculaires de la neurovirulence du virus West Nile.

Beasley, Whiteman, Zhang, Huang, Schneider, Smith, Gromowski, Higgs, Kinney and Barrett (2005). Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. J.Virol. p. 8339-8347 Vol. 79, No. 13

Liu, Chen, and Khromykh (2003). Molecular and Functional Analyses of Kunjin Virus Infectious cDNA Clones Demonstrate the Essential Roles for NS2A in Virus Assembly and for a Nonconservative Residue in NS3 in RNA Replication. J.Virol. p. 7804-7813 Vol. 77, No. 14

Yu and Markoff (2005). The Topology of Bulges in the Long Stem of the Flavivirus 3 Stem-Loop Is a Major Determinant of RNA Replication Competence. J.Virol. p. 2309-2324 Vol. 79, No. 4