

## INFECTION A VIRUS WEST NILE : AMELIORATION DES OUTILS DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE CHEZ LES CHEVAUX POUR L'EXPRESSION DE PROTEINES VIRALES RECOMBINANTES

Par :

• A-C. BREHIN<sup>1</sup>, G. DAUPHIN<sup>2</sup>, M-P. FRENKIEL<sup>1</sup>, J. LABIE<sup>2</sup>, J. MAINGAULT<sup>2</sup>, P. DESPRES<sup>1</sup> et S. ZIENTARA<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Institut Pasteur, Unité des Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes, 25 rue du docteur Roux 75015 Paris,

<sup>2</sup> Agence française de sécurité sanitaire des aliments, UMR 1161 de virologie (INRA/AFSSA/ENVA), 23 Avenue du Général de Gaulle, 94 703 Maisons-Alfort,

### Résumé

Grâce au système d'expression en cellules de drosophile S2, les protéines recombinantes NS1, E et le domaine III (DIII) de la protéine E du virus West-Nile ont été produites en quantités nécessaires pour réaliser des immunisations chez des lapins. Ces immunisations chez les lapins ont permis la production d'anticorps anti-WN et ceci à partir de deux injections. Les anticorps anti-WN de lapin ainsi que les protéines recombinantes produites en système S2 constituent des nouveaux outils importants pour la mise au point d'un test diagnostique équin rapide et sans danger pour l'expérimentateur. Les premiers résultats de mise au point d'un test ELISA de diagnostic des chevaux pour l'infection par le virus WN basé sur ces outils sont encourageants.

**Mots-clés :** West Nile, protéines recombinantes, outil diagnostique, innocuité, surveillance

### Summary

*To immunize rabbits, we produced large quantities of recombinant NS1 and E proteins and also the domain III (DIII) of the WNV E protein using a S2 drosophila cells expression system. Rabbits immunized with recombinant proteins developed anti-WN antibodies after only two injections. The rabbit anti-WN antibodies and the recombinant proteins produced by the S2 system are important novel tools that are safe for biosafety levels and manipulation and will be used to develop rapid diagnostic tests to identify WNV infected horses. The first ELISAs results using these recombinant proteins or the rabbit anti-WN antibodies to diagnose WNV infected horses are encouraging.*

**Key-words :** West Nile, recombinant proteins, diagnostic tools, safety, surveillance

## Introduction

Le virus de la fièvre du Nil occidental, un flavivirus transmis par des moustiques, est fortement étudié depuis quelques années, en raison des épidémies/épizooties qu'il a causées, en particulier sur le pourtour méditerranéen et sur le territoire nord-américain (figure 1) où sa dissémination a été fulgurante. La France n'est pas épargnée, en effet, des flambées touchant uniquement les chevaux ont été rapportées en Camargue en 2000 et 2004 [1]. En 2003, cette fois dans le département du Var (Fréjus et environs), 7 cas cliniques (aucun décès) humains et quatre cas neurologiques équins (dont 1 décès) ont été rapportés ; ces 7 cas constituent la première description de cas cliniques chez l'Homme depuis 1964. Enfin, en 2006, cinq cas équins ont été dépistés dans le département des Pyrénées Orientales [2,3].

Ce virus pouvant provoquer des maladies mortelles chez les Hommes et les chevaux, une surveillance active et/ou passive est menée à plusieurs niveaux du cycle de transmission en France et aux Etats-Unis : les moustiques, les oiseaux, les équidés et l'Homme. Cette surveillance vise à détecter précocement toute circulation virale et prendre ainsi des mesures appropriées d'information, de prévention et de lutte. L'épidémiologie de cette maladie étant encore mal connue, la plupart des flambées épidémiques restent imprévisibles et difficiles à contrôler.

De plus, le support du diagnostic de laboratoire est indispensable pour confirmer une infection par le virus WN car la symptomatologie est non spécifique et similaire à celle observée dans d'autres infections ou affections (encéphalite à virus herpès équin 1, maladie de borna, rage, leucoencéphalomalacie, encéphalopathie d'origine hépatique). Ainsi, la recherche sérologique permet la mise en évidence d'anticorps IgM et IgG spécifiques par tests ELISA [4].

En France, les analyses sérologiques de cette infection chez le cheval sont réalisées depuis 2004 à la fois par le LNR (Afssa) et par trois Laboratoires Vétérinaires Départementaux. Actuellement, les seuls réactifs (antigènes, anticorps totaux ou monoclonaux) commercialisés le sont aux Etats-Unis, à des prix prohibitifs. En France, les réactifs utilisés sont directement issus de cultures de cellules infectées par le virus West Nile. Ces réactifs sont non seulement difficiles à produire de manière standardisée et en grandes quantités, mais peuvent présenter un risque infectieux résiduel pour les manipulateurs [4].

Plus précisément, la production des réactifs pour le diagnostic sérologique de l'infection à virus West Nile chez le cheval impose de manipuler de grandes quantités de ce virus qui est dangereux pour l'homme (il est susceptible de provoquer des méningo-encéphalites mortelles). Grâce aux techniques de biologie moléculaire, il est possible d'obtenir de grandes quantités de protéines virales purifiées et non-infectieuses. C'est l'objectif de ce travail que de pouvoir disposer de tels réactifs. Ainsi, les extraits cellulaires actuellement utilisés pourraient être remplacés par des protéines virales recombinantes (produites par génie génétique) produites en systèmes d'expression adéquats.

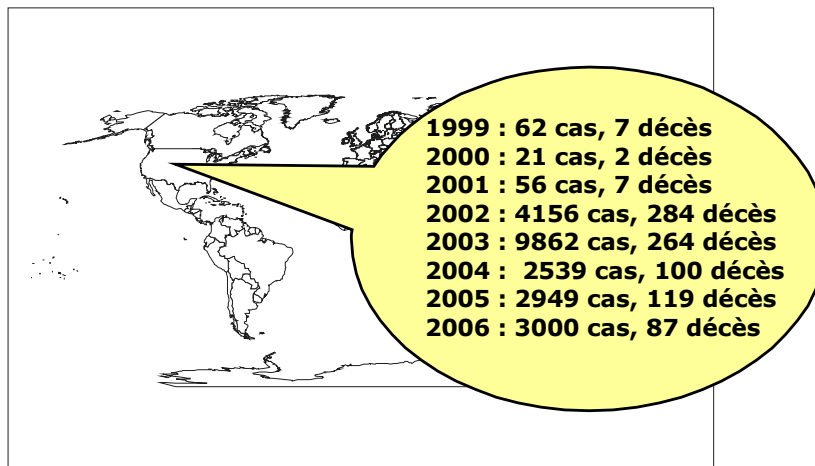
L'unité des Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes à l'Institut Pasteur a mis au point un système d'expression protéique virale dans le cas général des flavivirus. Ce système (matériel et « savoir-faire ») a été transféré à l'Afssa. Nous avons alors pu produire les protéines recombinantes E, NS1 et le domaine III (DIII) de la protéine E du virus WN en système d'expression de drosophile. Les gènes qui codent les protéines du virus West Nile sont insérés dans des vecteurs eux-mêmes transfectés dans des cellules hôtes (dans notre étude, des cellules d'insecte) qui vont ainsi produire en grandes quantités les protéines qui pourront facilement être purifiées.

Nous avons ensuite immunisé des lapins avec ces protéines afin de produire des anticorps anti-protéines recombinantes c'est-à-dire anti-WN et déterminé que deux injections suffisent à produire des anticorps en quantités importantes. Nous avons mis au point un test ELISA IgG basé sur l'utilisation de ces antigènes recombinants et commencé la mise au point d'un test IgM pour le diagnostic équin.

Les tests ELISA que nous voulons développer permettraient :

- d'utiliser des antigènes non dangereux pour les personnes de laboratoires,
- d'obtenir des résultats en quelques heures (au lieu de quelques jours pour la technique de neutralisation virale),
- de détecter les anticorps IgM, marqueurs précoces et spécifiques de l'infection par le virus.

Figure 1. Epidémies de West Nile qui ont sévi aux Etats-Unis entre 1999 et 2006 : 16 000 cas et 660 décès.

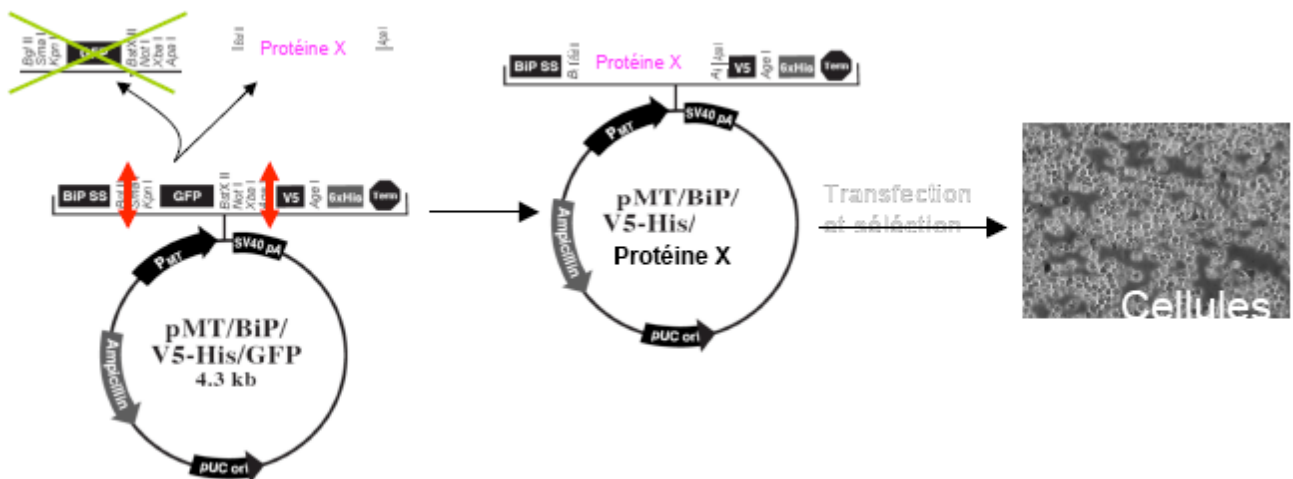


## 1. Matériels et méthodes

### 1.1. Expression des protéines recombinantes

Les lignées cellulaires S2-E WN, S2-NS1 WN et S2-DIII-E WN (Institut Pasteur, IMFH, Paris) permettant d'exprimer respectivement les protéines virales E (glycoprotéine E), NS1 et le sous-domaine DIII de la protéine E du virus WN ont été fournies par l'Unité des Interactions moléculaires Flavivirus-Hôtes dirigé par Philippe DESPRES à l'Institut Pasteur.

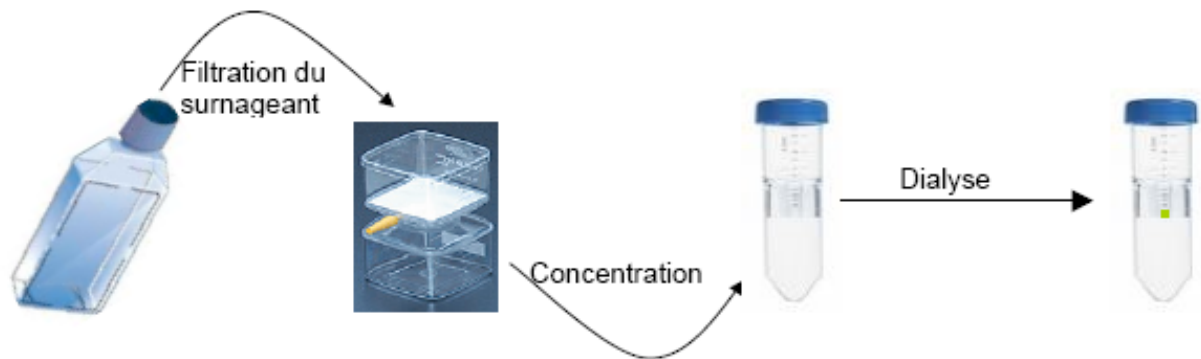
Figure 2. Principe de la construction des vecteurs utilisés dans le système d'expression de drosophile S2.



Les cellules de drosophile (S2) contenant les plasmides d'expression sont entretenues dans du milieu de Schneider's complet (10% SVF décomplémenté, Pénicilline (50U), Streptomycine (50 µg) et blasticidine (10mg/mL)).

Les cellules sont induites pendant 21 jours avec 5mM de sulfate de cuivre qui va permettre la production de la protéine d'intérêt. Cette protéine est relarguée dans le milieu extérieur grâce à la séquence « signal » BIP ancrée à la protéine. Après ces 21 jours, les surnageants sont clarifiés par une centrifugation de 5 min à 1200rpm, puis filtrés ( $0,22\mu$ ). Ces surnageants sont ensuite concentrés sur colonne VIVASPIN 10kDa puis dialysés 5 fois avec 20 mL de PBS/colonne.

Figure 3 : Etapes de traitement du surnageant afin d'obtenir les protéines d'intérêt concentrées.



Les concentrats ainsi obtenus contiennent la protéine d'intérêt en grande quantité ainsi que les protéines de drosophile également libérées dans le milieu extérieur. Les aliquots sont stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 1.2. Production de sérums hyperimmuns

Nous avons immunisé des lapins néozélandais albinos femelles de poids compris entre 2 et 2,5 kg (Statut sanitaire : IOPS) avec des protéines recombinantes produites en système drosophile ou avec le candidat vaccin TRIP (vecteur vaccinal dérivé des lentivirus. Les vecteurs lentiviraux non répliquatifs « TRIP » ont la capacité de transduire des cellules non-mitotiques, solutionnant ainsi un des principaux problèmes pour l'efficacité de transfert de gène lié aux vecteurs rétroviraux " classiques " dérivés du virus de Moloney) [4]:

- 3 lapins avec un candidat vaccin en cours d'étude à Pasteur : le vecteur TRIP contenant la protéine E du virus WN (TRIP-E), les deux rappels ayant été effectués avec la protéine E exprimée en système drosophile S2,
- 1 lapin avec 4 doses de 50  $\mu\text{g}$  de protéine NS1 non purifiée également produite en système S2 (50  $\mu\text{g}$ , non purifiée), un des lapin étant décédé en cours d'expérience.
- 3 lapins avec 4 doses de protéine E produite en système S2 (50  $\mu\text{g}$ , non purifiée).

Les procédures de manipulations des lapins ont été faites selon les règles en vigueur à l'AFSSA.

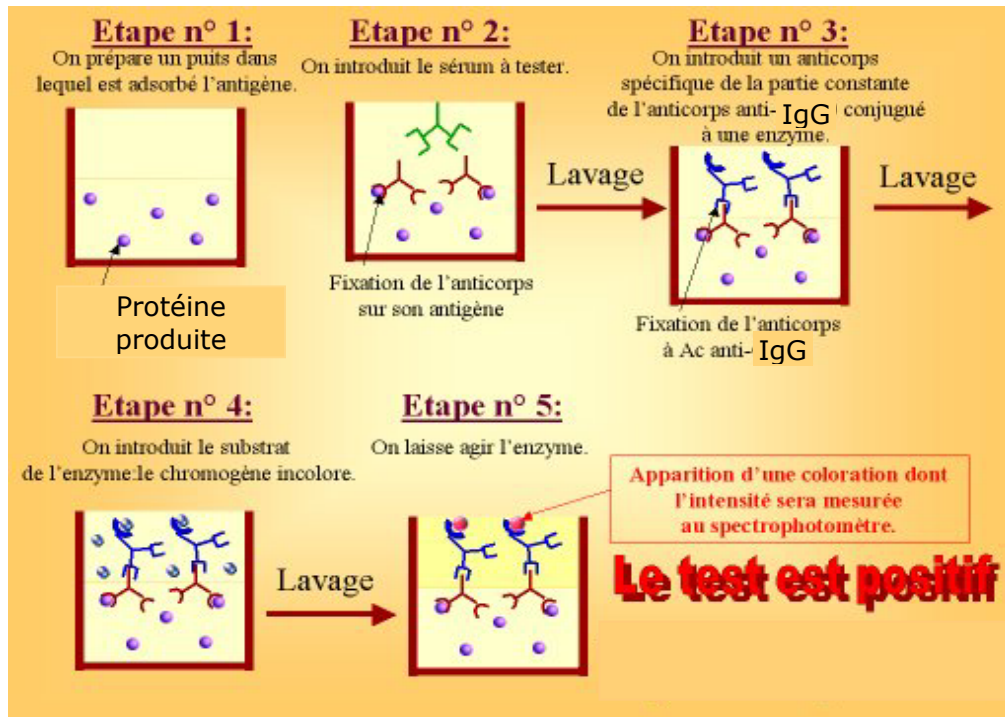
Tableau 1 : Identification des lapins, date et quantités de vecteur/protéine injectés par date.

N° lapin	Tatouage	protéine	Date et quantité 1 <sup>ère</sup> dose	Date et quantité 2 <sup>ème</sup> dose	Date et quantité 3 <sup>ème</sup> dose	Date et quantité 4 <sup>ème</sup> dose
6	544059	TRIP-E WN	08/03/06 200 ng (30 µl TRIP-E WN + 30µl DPBS, 0,2% BSA)	23/03/06 100 µl de protéine E recombinante concentrée + 35% d'Alugel	06/04/06 50 µl (µg) de protéine E recombinante concentrée + 35% d'Alugel	22/05/06 50 µg de protéine E recombinante concentrée + 25% d'Alugel
7	545728	TRIP-E WN				
8	545688	TRIP-E WN				
10	546980	NS1-WN	23/3/06 200 µl de protéine recombinante concentrée + 35% d'Alugel	06/04/06 50 µg de protéine NS1 recombinante concentrée + 45% d'Alugel	Mort le 20/04/06	
11	543806	NS1-WN			25/04/06 50 µg de protéine NS1 recombinante concentrée + 35% d'Alugel	22/05/06 50 µg de protéine NS1 recombinante concentrée + 25% d'Alugel
12	416979	E-WN	23/3/06 200 µl de protéine E recombinante concentrée + 35% d'Alugel	06/04/06 200 µl de protéine E recombinante concentrée + 35% d'Alugel	25/04/06 100 µl de protéine E recombinante concentrée + 40% d'Alugel	22/05/06 50 µg de protéine E recombinante concentrée + 45% d'Alugel
13	645724	E-WN				
14	545708	E-WN				

## VERIFICATION DE LA PRESENCE D'ANTICORPS ANTI-PROTEINES E ET NS1 PAR TESTS ELISA

Les lapins sont prélevés à J0, J15, J30 et J45. Les prélèvements sont centrifugés à 10000rpm pendant 5 min pour éliminer les hématies. Les sérums sont stockés à -20°C.

Figure 4 : Principe du test ELISA.



Les plaques MAXISORP sont sensibilisées la veille avec les différentes protéines recombinantes produites en système de drosophile et diluées au 1/1000<sup>ème</sup> en PBS1X (100µl/cupule) ou avec le virus IS-98 ST1 purifié à 10<sup>5</sup>pfu/cupule [5]. Les plaques sont lavées 3 fois en PBS1X tween 0,1% avant de réaliser l'étape de blocage avec 100µl/cupule de PBS1X lait 3% (BIO-RAD réf 170-6404) pendant 30 min. Les plaques sont lavées 3 fois en PBS1X tween 0,1% avant d'y ajouter les sérums dilués au 1/300<sup>ème</sup> en PBS1X tween 0,1% lait 1% incubés pendant 1h à 37°C sous agitation permanente. Les plaques sont alors de nouveau lavées 3 fois en PBS1X tween 0,1% avant d'ajouter l'anticorps anti-lapin (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> en PBS1X tween 0,1% lait 1% à raison de 100µl/cupule pendant 1h à 37°C sous agitation permanente. Les plaques sont enfin lavées 3 fois en PBS1X tween 0,1% et révélées par l'ajout de la solution V/V TBM peroxydase et TMB substrat solution B (KPL, réf 50-65-00 et 50-76-01). La solution est arrêtée avec un volume d'acide phosphorique H3PO4 (10,6 %). Les plaques sont lues à 450 nm.

### 1.3. Développement d'ELISA chevaux

#### 1.3.1 Les prélèvements

Dans le cadre du contrôle sanitaire de la monte publique, les laboratoires Frank Duncombe (Laboratoire vétérinaire départemental du Calvados) et l'AFSSA reçoivent des sérums équins séropositifs en vue d'une recherche virale. Les isolats décrits ci-dessous ont fait l'objet de notre étude (tableau 1).

Tableau 2 : Identification des isolats, origine et résultats préalables de détection d'anticorps anti-WN par test ELISA.

N°	Origine	Résultat ELISA IgG	Résultat ELISA IgM
55	Sanofi Pasteur	-	-
52	Sanofi Pasteur	-	-
214	Sanofi Pasteur	-	-
203	Sanofi Pasteur	-	-
195	Sanofi Pasteur	-	-
102	?	-	-
202	Sanofi Pasteur	-	-
197	Sanofi Pasteur	-	-
211	Sanofi Pasteur	-	-
11	Qatar	+	+
14	Qatar	+	+
16	Qatar	+	+
271	Camargue 2000	+	+
235	Camargue 2000	+	+
4076	Camargue 2000	+	-
4853	Camargue 2000	+	-
3635	Camargue 2000	+	-
3636	Camargue 2000	+	-
503	Var 2003	+	-
198	Var 2003	+	+
461	Var 2003	+	-
186	Var 2003	+	+
193	Var 2003	+	+
459	Var 2003	+	-
226	Martinique 2003	+	?
262	Martinique 2003	+	?
286	Martinique 2003	+	?
163	Martinique 2003	+	?

### 1.3.2. Tests de séroneutralisation

Le virus WN IS-98 ST1 [5] concentré puis purifié sur gradient de saccharose dilué en DMEM (Pénicilline (50U), Streptomycine (50 µg), 2% SVF) à une concentration de  $10^3$  pfu/ml est mis en contact avec les différents sérums à tester dilués au 1/20<sup>ème</sup>, 1/100<sup>ème</sup> ou 1/500<sup>ème</sup> pendant deux heures en rollers à 37°C. La solution de neutralisation est déposée sur des cellules VERO NK en plaques 6 cupules et laissée deux heures à 37°C. L'inoculum est ensuite retiré et 1mL de milieu DMEM (Pénicilline (50U), Streptomycine (50 µg), 2% SVF) + 1mL de CMC 1,6% sont ajoutés. Après 48h, la CMC est retirée, les cellules lavées trois fois en PBS1X puis fixées en PFA 3,2%. Les cellules sont perméabilisées avec 0,1% de Triton pendant 4 min puis lavées trois fois en PBS1X. L'ascite anti-WN (Institut Pasteur) dilué au 1/100<sup>ème</sup> est alors ajouté pendant 20 min à 37°C. Les cellules sont lavées trois fois en PBS1X puis incubées 1h avec l'anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/100<sup>ème</sup>. Les cellules sont lavées trois fois en PBS puis le titrage est révélé au DAB/urée (SIGMA).

### 1.3.3. Les tests ELISA

#### IgG chevaux

Les tests ELISA IgG ont été réalisés selon la Technique du CNR Arboviroses de l'INSTITUT PASTEUR (Dr Hervé ZELLER) adaptée par l'AFSSA LERPAZ pour le diagnostic équin.

Les plaques MAXISORP sont sensibilisées la veille avec l'anticorps anti-µ de cheval dilué en PBS1X (100µl/cupule) et laissées la nuit à +4°C. Les plaques sont lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% avant de réaliser l'étape de blocage avec 100µl/cupule de PBS1X lait 3% (BIO-RAD réf 170-6404) pendant 30 min. Les plaques sont lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% avant d'y ajouter les sérums dilués au 1/100<sup>ème</sup> en PBS1X tween 0,1% lait 1% incubés pendant 1h à 37°C sous agitation permanente. Les plaques sont alors de nouveau lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% avant d'ajouter l'anticorps anti-cheval (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/10 000<sup>ème</sup> en PBS1X tween 0,1% lait 1% à raison de 100µl/cupule pendant 1h à 37°C sous agitation permanente. Les plaques sont enfin lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% et révélées par l'ajout de la solution V/V TBM peroxydase et TMB substrat solution B (KPL, réf 50-65-00 et 50-76-01). La solution est arrêtée avec un volume d'acide phosphorique H3PO4 (10,6 %). Les plaques sont lues à 450 nm.

#### IgM chevaux

Les plaques MAXISORP sont sensibilisées la veille avec l'anti-IgM de cheval dilué en PBS1X (100µl/cupule) et laissées la nuit à +4°C. Les plaques sont lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% avant de réaliser l'étape de blocage avec 100µl/cupule de PBS1X lait 3% (BIO-RAD réf 170-6404) pendant 30 min. Les plaques sont lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% avant d'y ajouter les sérums équins dilués au 1/100<sup>ème</sup> en PBS1X tween 0,1% lait 1% incubés pendant 1h à 37°C sous agitation permanente. Les plaques sont alors de nouveau lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% avant d'ajouter l'anticorps anti-cheval (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/10000<sup>ème</sup> en PBS1X tween 0,1% lait 1% à raison de 100µl/cupule pendant 1h à 37°C sous agitation permanente. Les plaques sont enfin lavées trois fois en PBS1X tween 0,1% et révélées par l'ajout de la solution V/V TBM peroxydase et TMB substrat solution B (KPL, réf 50-65-00 et 50-76-01). La solution est arrêtée avec un volume d'acide phosphorique H3PO4 (10,6 %). Les plaques sont lues à 450 nm.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1 Expression des protéines recombinantes

Grâce au système d'expression en cellule de drosophile, nous avons pu produire des quantités importantes des protéines NS1, E et le DIII du virus WN, en raison de l'excellente productivité de ce système.

La figure 4 montre l'expression d'une protéine reconnue par l'ascite murin anti-WN par les cellules de drosophile en culture. La figure 5 confirme la présence des trois protéines à la taille attendue, également reconnues par l'ascite murin anti-WN.

La protéine E était également spécifiquement reconnue par un sérum équin positif WN (figure 6). La reconnaissance spécifique des protéines DIII et NS1 par les sérums équins était difficile à observer par Western blot, probablement en raison d'une reconnaissance conformationnelle des épitopes.

Figure 4 : Mise en évidence par immunofluorescence de l'expression par les cellules de drosophile des 3 protéines reconnues par l'ascite de souris anti-WN (1/1000<sup>e</sup>).

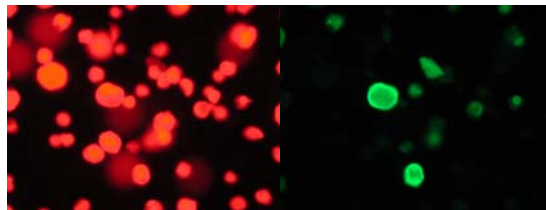


Figure 5 : Confirmation par Western blot de l'expression des protéines E, DIII et NS1 du virus West Nile. Dépôt de 16,25 µl du surnageant de culture de cellules S2, dialysé et concentré après 4, 6 et 7 jours d'induction de l'expression. Ascite de souris au 1/1000<sup>e</sup>

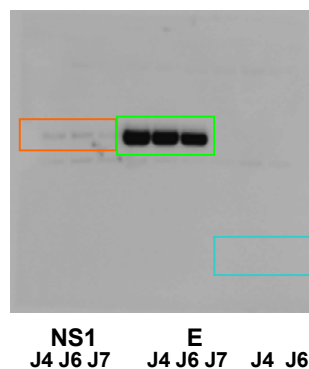
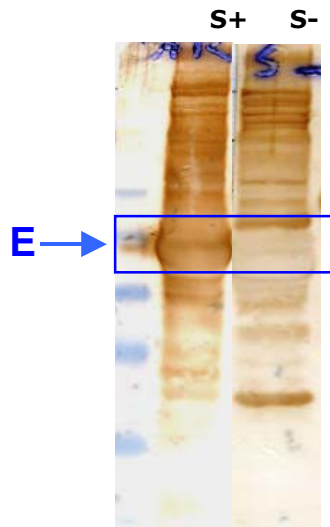




Figure 6 : Reconnaissance spécifique de la protéine E par un sérum équin séropositif WN.  
Sérums équins = 1/50<sup>e</sup>. Anti-CV au 1/5 000<sup>e</sup>



## 2.2. Production de sérums hyperimmuns

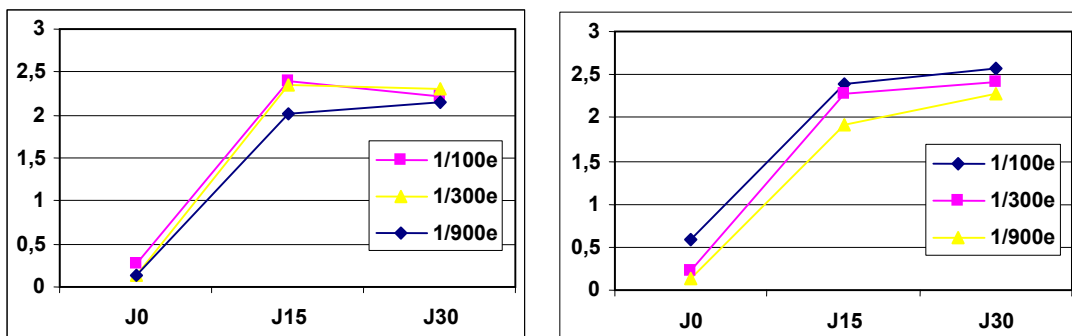
Les protéines recombinantes produites en système de drosophile nous ont permis de réaliser plusieurs immunisations chez les lapins. Le domaine III (DIII) de la protéine E n'étant pas immunogène, d'après les expérimentations précédentes réalisées à l'Institut Pasteur dans un modèle murin, aucune immunisation n'a été effectuée chez les lapins.

Les lapins ont été prélevés à intervalles réguliers afin de mesurer les quantités d'anticorps produits après chaque immunisation.

Nous avons pu voir que dès le 15<sup>ème</sup> jour, des anticorps sont présents chez tous les lapins.

Sur la figure 7 sont présentés les résultats de tests ELISA effectués avec le sérum d'un lapin immunisé avec 2 doses de protéine E du virus WN produite en système de drosophile.

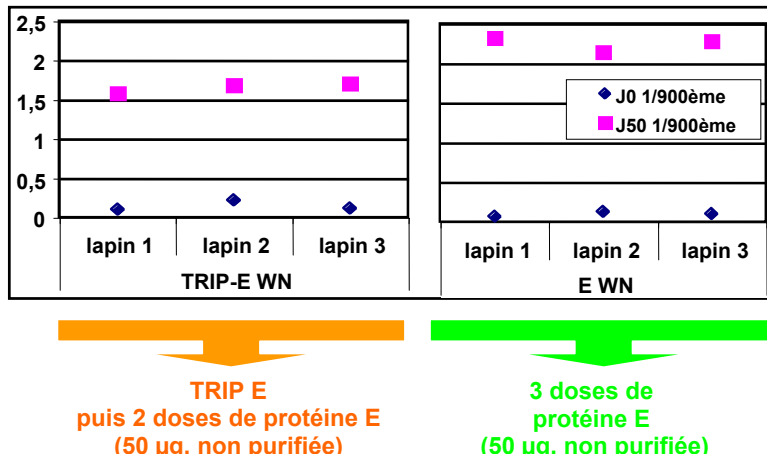
Figure 7 : Comparaison des valeurs de DO des sérums prélevés à J0, J15 et J30 pour un lapin immunisé avec 3 doses de protéine E.  
Sensibilisation des plaques avec la protéine E diluée au 1/1000<sup>e</sup> (figure de gauche) ou avec 10<sup>6</sup> pfu par cupule de virus WN purifié (figure de droite).



De plus, nous avons pu comparer les niveaux de réponses humorales chez des lapins immunisés avec la protéine E recombinante et ceux préalablement vaccinés avec le vaccin TRIP-E.

Comme le montre la figure 8, les réponses étaient tout à fait comparables, avec des titres en anticorps plus élevés pour les lapins immunisés avec la protéine E recombinante uniquement. Il est, cependant connu, d'après la littérature, que le vaccin TRIP induit davantage une réponse cellulaire [5,7].

Figure 8 : Comparaison des réponses humorales chez les lapins immunisés avec la protéine E recombinante et ceux préalablement vaccinés avec le vaccin TRIP-E.



En conclusion, ces sérums constituent des outils sérologiques très utiles pour le développement des techniques ELISA, d'immunofluorescence ou d'immuno-histochimie.

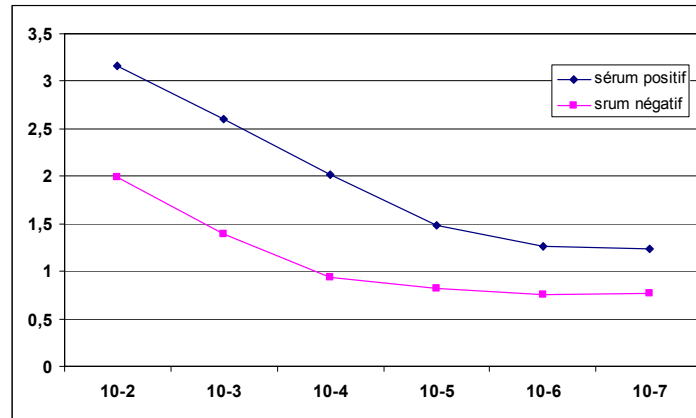
## 2.3. Développement d'ELISA chevaux

### 2.2.1. ELISA IGG

- Pour les tests sur sérums de lapins, les mêmes résultats (protocoles strictement identiques) ont été obtenus selon une sensibilisation des plaques avec du virus vivant purifié ou avec la protéine E (figure 7).
- Pour le diagnostic des sérums de chevaux, nous avons préalablement déterminé la dilution optimale pour la sensibilisation des plaques avec les différentes protéines recombinantes produites en système S2.

Sur la figure 9 sont présentées les valeurs de DO obtenues à partir de sérums de chevaux négatifs et positifs selon différentes sensibilisations de la plaque avec la protéine E.

Figure 9. Comparaison des valeurs de DO à partir de sérums de chevaux négatifs ou positifs. Sensibilisation des plaques avec la protéine E diluée du 1/100<sup>ème</sup> au 1/1000000<sup>ème</sup>.

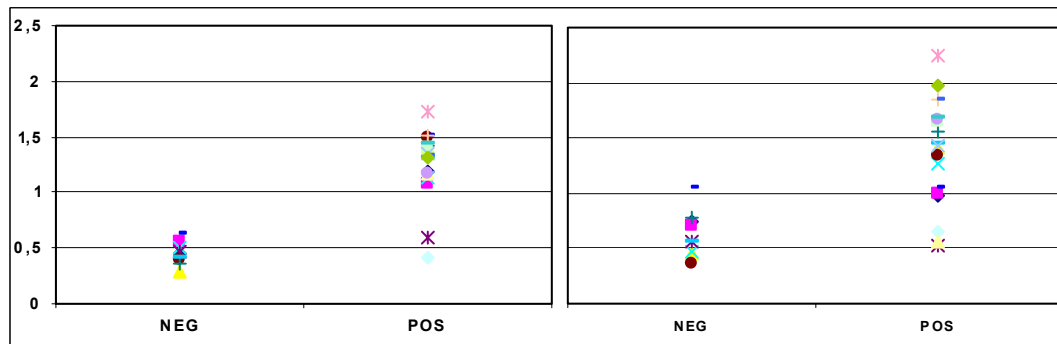


Les essais d'ELISA basés sur les trois antigènes exprimés ont permis d'obtenir des valeurs de DO plus élevées pour le sérum équin positif que pour le sérum négatif, mais avec un niveau de bruit de fond très important qui nécessite d'être amélioré.

Des tests ELISA IgG ont ensuite été réalisés sur un plus grand échantillon de sérums équins. Comme pour les sérums de lapin, nous avons comparé les valeurs de DO selon une sensibilisation des plaques avec la protéine E (précédemment déterminée) ou avec le virus WN purifié. La figure 8 montre que des résultats similaires ont également été obtenus. Ceci confirme la spécificité des antigènes recombinants exprimés et leur intérêt pour l'ELISA.

Figure 8. Comparaison des valeurs de DO des sérums de chevaux prélevés et préalablement identifiés comme négatifs ou positifs (par test ELISA).

Sensibilisation des plaques avec la protéine E diluée au 1/1000<sup>e</sup> (graphe de gauche) ou avec 10<sup>6</sup> pfu par cupule de virus WN purifié (graphe de droite). Sérum de chevaux dilués au 1/270<sup>ème</sup>.



Comme dit précédemment, le bruit de fond avec les sérums de chevaux (qui accrochent le plastique) est souvent un problème. Il serait intéressant d'envisager de développer des ELISA bicupules afin d'optimiser la technique.

### 2.3.2 ELISA IGM

L'ELISA IgM fait appel à la fois à du surnageant de cultures infectées par le virus WN et à de l'ascite de souris. Un nouvel ELISA devrait s'appuyer sur une protéine recombinante (E la plus immunogène) et sur des anticorps polyclonaux, de lapin ou souris immunisés ou infectés (souris uniquement).

Les essais effectués ont permis de mettre en évidence une utilisation possible des protéines recombinantes en substitution du virus purifié pour la sensibilisation des plaques. De plus, les résultats préliminaires montrent également que l'utilisation des sérums hyperimmuns de lapins (lapins immunisés avec les protéines recombinantes E-WN ou NS1-WN) est possible.

### 2.3.3. Validation de l'ELISA chevaux sur un panel de sérums positifs/négatifs et comparaison des techniques

Des tests de séroneutralisation ont été réalisés pour vérifier que les sérums testés par ELISA comme contenant des IgG ou M possédaient bien des anticorps neutralisants, ces derniers étant les plus répandus lors d'infections virales. Les résultats concordent en général avec les résultats des ELISA. Les quelques différences observées sont probablement dues à la présence d'anticorps non neutralisants. Le cheval 461, quant à lui, présente un titre de séroneutralisation de 1/20 ce qui correspond à la limite de détection du test. Le fait que le test ELISA avec le virus purifié soit positif et que celui avec la protéine recombinante E soit négatif peut vouloir dire que ce cheval présente un très faible taux d'anticorps qui se trouve probablement à la limite du seuil.

Tableau 3. Récapitulatifs des résultats obtenus avec les tests de séroneutralisation et d'ELISA.

N°	Origine	Résultat ELISA IgG	Résultat ELISA IgM	Résultat SN (TITRES)	Résultat ELISA IgG (virus purifié)	Résultat ELISA IgG (E)
55	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
52	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
214	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
203	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
195	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
102	?	-	-	NEG	-	-
202	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
197	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
211	Sanofi Pasteur	-	-	NEG	-	-
11	Qatar	+	+	1/50	+	+
14	Qatar	+	+	NEG	+	+
16	Qatar	+	+	1/50	+	+
271	Camargue 2000	+	+	1/20	+	+
235	Camargue 2000	+	+	1/20	+	-
4076	Camargue 2000	+	-	1/100	+	+
4853	Camargue 2000	+	-	1/100	+	+
3635	Camargue 2000	+	-	1/100	+	+
3636	Camargue 2000	+	-	1/100	+	+
503	Var 2003	+	-	NEG	-	-
198	Var 2003	+	+	1/500	+	+
461	Var 2003	+	-	1/20	+	-
186	Var 2003	+	+	1/250	+	+
193	Var 2003	+	+	1/500	+	+
459	Var 2003	+	-	NEG	+	+
226	Martinique 2003	+	?	1/500	+	+
262	Martinique 2003	+	?	1/500	+	+
286	Martinique 2003	+	?	1/500	+	+
163	Martinique 2003	+	?	1/20	+	+

## Discussion – Conclusion

Nous avons pu produire de grandes quantités de protéines recombinantes E, domaine III (DIII) de E et NS1 de WN grâce au système d'expression de drosophile qui est un procédé calibré.

Nous avons immunisé des lapins avec 50 µg de chacune des protéines afin de produire des anticorps anti-protéines recombinantes c'est-à-dire anti-WN et déterminé que deux injections suffisent à produire des anticorps en quantités importantes.

Nous avons pu montrer que ces protéines recombinantes ont également un intérêt important pour les ELISA car l'utilisation de protéine recombinante pour sensibiliser les plaques donne des résultats similaires à ceux obtenus en utilisant le virus purifié. La manipulation de virus étant assujettie à l'utilisation du laboratoire de confinement 3, les expériences s'en verront considérablement allégées en termes de temps et de risque sans pour autant diminuer la spécificité du test de façon très importante.

Nous avons donc mis au point un test ELISA IgG basé sur l'utilisation de ces antigènes recombinants et commencé la mise au point d'un test IgM pour le diagnostic équin. Ces tests ont été validés par séroneutralisation sur un panel d'environ 30 sérums équins.

Les tests de séroneutralisation ont, en effet, montré qu'en général les sérums équins testés positifs en ELISA possédaient des anticorps neutralisants. Certains sérums présentent néanmoins des résultats positifs en ELISA et négatifs en séroneutralisation ce qui suppose que ces chevaux aient développé une immunité humorale non neutralisante. De plus, nous avons pu voir que la sensibilité de détection des plaques sensibilisées avec les protéines recombinantes est moindre que celle des plaques sensibilisées avec le virus purifié, cependant, la sensibilité des plaques contenant les protéines recombinantes est suffisante pour détecter la présence d'anticorps dans le sérum d'un animal infecté par le virus WN.

Les tests ELISA IgG et IgM ont été réalisés en utilisant la protéine recombinante ainsi que du sérum hyperimmun de lapin non purifiés. Il serait donc intéressant d'affiner le test en purifiant la protéine recombinante ainsi qu'en isolant les anticorps anti-protéine recombinante produits chez le lapin afin de diminuer le bruit de fond. Il serait également nécessaire de coupler ces derniers à une molécule telle que la streptavidine afin de diminuer les étapes de révélation et ainsi de diminuer le bruit de fond. Nous pouvons également envisager l'utilisation de tests ELISA bicupules, c'est-à-dire sensibilisation des plaques avec un anticorps anti-V5 ou anti-hist (ou polyclonaux de lapins) puis antigène recombinant, ce test étant basé sur la différence de DO observée entre les cupules Ag+ et Ag-. Enfin, si le bruit de fond persiste pour le test ELISA IgM, il est à envisager de modifier le protocole de blocage des plaques sensibilisées avec une autre solution que le lait, celui-ci étant parfois impliqué dans des réactions croisées.

## Bibliographie

Murgue B., Murri S., Zientara S. "West Nile in France in 2000: the return after 25 years". *Emerg Inf Dis.* 2001 ; 7 : 692-6.

Murgue B, Zeller H, Deubel V. "The Ecology and Epidemiology of West Nile in Africa, Europe and Asia". *Curr Topics Microbiol: Japanese Encephalitis and West Nile Viruses* 2002 ; 267 : 195-222.

Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B. "West Nile: worldwide current situation in animals and humans". *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004 ;27 :343-55.

Dauphin G, Zientara S. 2006. "West Nile: recent trends in diagnosis and vaccine development". *Accepted Vaccine.*

Iglesias MC, Frenkiel MP, Mollier K, Souque P, Despres P, Charneau P. « A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus ». *J Gene Med.* 2006 Mar;8(3):265-74.

Lucas M, Frenkiel MP, Mashimo T, Guenet JL, Deubel V, Despres P, Ceccaldi PE. « The Israeli strain IS-98-ST1 of West Nile virus as viral model for West Nile encephalitis in the Old World ». *Virology*. 2004 Nov 18;1:9.

Rohrlich PS, Cardinaud S, Lule J, Montero-Julian FA, Prodhomme V, Firat H, Davignon JL, Perret E, Monseaux S, Necker A, Michelson S, Lemonnier FA, Charneau P, Davrinche C. « Use of a lentiviral vector encoding a HCMV-chimeric IE1-pp65 protein for epitope identification in HLA-Transgenic mice and for ex vivo stimulation and expansion of CD8(+) cytotoxic T cells from human peripheral blood cells ». *Hum Immunol*. 2004 May;65(5):514-22.