

UNE MODIFICATION DE LA PROTEINE NON-STRUCTURALE NS1 D'UN VIRUS INFLUENZA AVIAIRE ACCROIT SA VIRULENCE ET SON POUVOIR REPLICATIF

Trapp Sascha¹, Soubieux Denis¹, Marty Hélène¹, Esnault Evelyne¹, Lion Adrien¹,
Kut Emmanuel¹, Quéré Pascale¹, Larcher Thibaut², Naffakh Nadia³, Marc Daniel¹

¹INRA, UMR1282, Centre Val de Loire, 37380 NOUZILLY,

²INRA, UMR 703-Oniris 44307 NANTES

³Institut Pasteur, 75015 PARIS

Daniel.marc@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Plusieurs déterminants de virulence et d'adaptation modulent le pouvoir pathogène des virus influenza, ainsi que leur capacité à s'installer durablement chez une ou plusieurs espèces hôtes, parmi lesquelles les volailles domestiques ou les mammifères. Ces déterminants sont distribués sur l'ensemble du génome viral, et nous nous intéressons particulièrement à ceux portés par la protéine non-structurale NS1 du virus. Depuis l'an 2000, tous les virus H5N1 hautement pathogènes circulant en Asie ont acquis une modification de la protéine NS1, consistant en un raccourcissement de la région flexible liant le « RNA-binding domain » au domaine effecteur. Nous avons voulu savoir si cette mutation (une délétion de cinq acides aminés) procurait un avantage sélectif au virus, y compris en dehors du contexte des virus H5N1. Nous avons introduit par génétique inverse cette mutation (NSdel8084) dans un virus influenza aviaire H1N1, et nous avons comparé les phénotypes des virus muté et sauvage, *in vivo* dans un modèle expérimental de poulets, et *in vitro* en culture de cellules épithéliales de poumon de poulet. Chez les poulets infectés expérimentalement, le virus NSdel8084 montre une réplication accrue et un pouvoir pathogène augmenté. Ce phénotype *in vivo* est corrélé à une meilleure réplication du virus dans une lignée de cellules épithéliales de poulets ainsi que dans l'oeuf embryonné. Nos résultats, joints au fait que le segment porteur de cette mutation, provenant de virus H5N1, a depuis été retrouvé en Asie chez des virus non-H5N1, démontrent que l'avantage sélectif que procure cette mutation n'est pas limité aux virus H5N1. Il pourrait être judicieux de rechercher l'existence de cette mutation dans les virus influenza aviaires circulants.

ABSTRACT

Modifying the non-structural protein NS1 of an avian influenza virus increases its pathogenicity and replication potential

Several virulence determinants of avian influenza viruses shape their pathogenicity and their capacity to sustainably circulate in a panel of avian or mammalian hosts. Since year 2000, all highly pathogenic H5N1 viruses have acquired a modification in their non-structural protein NS1, consisting in a five-amino acid deletion in the linker region between the RNA-binding- and effector-domains of the protein. In order to investigate whether this deletion could modify the viral fitness, even in non-H5N1 viruses, we genetically engineered two variants of an avian H1N1 virus: the linker region of NS1 remained unchanged in the wt-virus, while the NSdel8084-virus harboured the five-amino acid deletion. The two viruses were compared *in vivo*, using an experimental model of influenza virus infection in chickens, and *in vitro* in a chicken lung epithelia cell line. In experimentally-infected chickens, the NSdel8084 virus replicated to higher titres in the lung and in the upper respiratory tract, when compared to its wt-counterpart. It also induced an increased pathogenicity. This *in vivo* phenotype was correlated with an increased replication potential *in vitro*, both in chicken lung epithelia cells and in embryonated eggs. Our results, combined to the fact that NS segments harbouring this modification have since been found in non-H5N1 viruses, show that the increased fitness conferred by this small deletion is not limited to H5N1 viruses. This genetic feature is therefore a virulence determinant that may be systematically searched in circulating avian influenza viruses.

INTRODUCTION

Après l'éradication des virus H5N1 apparus à Hong-Kong en 1997, plusieurs nouveaux génotypes de virus aviaires H5N1 hautement pathogènes ont émergé dans la région de Hong-Kong au début des années 2000. (Guan et al., 2002; Li et al., 2004), caractérisés par une pathogénicité élevée pour le poulet et pour la souris, ainsi que par une capacité à infecter le système nerveux central (Guan et al., 2002). Ces virus ont notamment acquis une mutation dans le segment NS, produisant une délétion des acides aminés 80 à 84 dans la région non-structurée liant le RNA-binding domain de NS1 à son domaine effecteur. Tous les virus H5N1 portent maintenant ce segment modifié, et ce dernier a aussi été transmis par réassortiment à des virus non-H5N1 (Munir et al., 2013).

La protéine non-structurale NS1 est l'acteur majeur qui permet au virus de contrer la réponse antivirale de la cellule. La mécanique moléculaire de son fonctionnement n'est pas parfaitement élucidée, et l'étude de cette modification pourrait contribuer à une meilleure connaissance de son mode d'action. La persistance de ce segment muté dans les virus H5N1 et sa diffusion à d'autres sous-types suggèrent que cette modification procure un avantage sélectif au virus, indépendamment de son sous-type. Pour tester cette hypothèse, nous avons introduit cette modification dans le génome d'un virus aviaire faiblement pathogène de sous-type H1N1, et comparé *in vitro* et *in vivo* le phénotype des virus sauvage et muté.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Production des virus parental et muté par génétique inverses

Un système de génétique inverse avait été mis au point pour A/Mallard/Marquenterre/ Z237/83 (MZ), un virus H1N1 isolé à partir d'un canard sauvage (Munier et al., 2010). La délétion de 15 nucléotides correspondant aux codons 80 à 84 de NS1 a été introduite grâce au kit QuikChange II (Stratagene). Les deux virus recombinants (wt-MZ et NSdel8084) obtenus par génétique inverse ont subi deux cycles d'amplification sur oeuf embryonné, suivis de deux cycles supplémentaires sur cellules MDCK.

1.2. Cultures cellulaires

Des cellules épithéliales de poumon de poulet (CLEC213), cultivées en flacons de 75cm² (Esnault et al., 2011), ont été infectées à une multiplicité d'infection de 0.001 PFU/cellule puis entretenues en milieu DMEM contenant 0.4 µg/ml de trypsine (Worthington). Le titre viral dans les échantillons de surnageant prélevés à 12, 24, 48, 60 et 72 h. post-infection, a été déterminé par la méthode des plaques.

1.3. Infection expérimentale de poulets

Des poulets Leghorn blanc histocompatibles B13/B13 de statut EOPS ont été inoculés à 4 semaines d'âge par voie intra-trachéale avec 2×10^7 EID₅₀ de virus dans 0.2ml de PBS, puis élevés en isolateurs. Trois à cinq animaux de chaque groupe ont été euthanasiés et autopsiés à J+1, J+2, J+3, J+4 et J+7 après inoculation. La charge virale a été mesurée par qRT-PCR (nombre de copies d'ARN viral par mg de tissu ou par écouvillon) dans le poumon, les écouvillons oro-trachéaux et les reins. Des échantillons de poumon ont été traités pour une analyse histologique ainsi que pour la quantification par qRT-PCR d'ARN messagers de cytokines.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. La délétion 80-84 de NS1 accroît la réplication virale *in vivo*

Nous avons produit par génétique inverse deux variants du virus A/Mallard/Marquenterre/Z237/83. Le virus wt-MZ porte un segment 8 identique à celui du virus sauvage, alors que le virus NSdel8084 porte un segment 8 modifié codant pour une NS1 délétée des acides aminés 80-84. Les deux virus ont été comparés après inoculation de poulets EOPS histocompatibles B13/B13 âgés de 4 semaines. Tous les animaux contrôles sont restés négatifs pour la présence d'ARN viraux. Chez les animaux inoculés, les charges virales les plus élevées ont été observées à J+2 et J+3 (Fig. 1). A ces deux temps, les charges virales dans le poumon étaient significativement plus élevées chez les animaux inoculés avec le virus NSdel8084 ($P = 0.015$ pour les valeurs groupées J+2 et J+3). Aux temps plus tardifs J+4 et J+7, les charges virales dans le poumon étaient similaires pour les deux virus. Ainsi, la réplication du virus NSdel8084 dans les poumons semble accélérée par rapport à celle du virus wt-MZ. Cette réplication pulmonaire accrue du virus NSdel8084 s'accompagne d'une excrétion virale augmentée : entre J+2 et J+4, du virus NSdel8084 est retrouvé dans 8/12 des écouvillons trachéaux, contre 2/12 pour le virus sauvage. Les charges virales dans le rein, résultant probablement de transport du virus par voie systémique, sont fortement corrélées aux charges virales mesurées dans le poumon : entre J+2 et J+4, le virus NSdel8084 est retrouvé dans le rein de 9/12 animaux, contre seulement 2/12 pour le virus sauvage.

2.2. L'inoculation avec le virus NSdel8084 induit plus de lésions pulmonaires

Les lésions pulmonaires, observées seulement chez les animaux infectés, sont plus fréquentes et plus intenses avec le virus NSdel8084, et consistent en des foyers de cellules inflammatoires mononucléées infiltrées dans le parenchyme pulmonaire (Fig. 2). Ces

lésions persistent plus longtemps chez les animaux inoculés avec le virus NSdel8084. Nous avons aussi observé des lésions de bronchite et de parabronchite, consistant en l'accumulation d'exsudat fibrineux et d'hétérophiles dégénérés dans la lumière des voies aériennes. Des lésions étendues de nécrose de l'épithélium bronchique ont été observées chez tous les animaux inoculés avec le virus NSdel8084 dès J+1, alors que seulement quelques animaux inoculés avec le virus sauvage montrent, à partir de J+3, la présence de quelques débris de cellules épithéliales.

2.3. Le virus NSdel8084 induit une réponse inflammatoire accrue

L'expression des ARN messagers de cytokines a été mesurée par qRT-PCR dans les poumons des poulets autopsiés. Nous avons observé une surexpression des ARN messagers de l'interféron alpha et de l'IL-6. Pour les points J+2 à J+4, nous avons représenté les niveaux d'expression d'ARNm de l'IL-6 en fonction des niveaux d'ARNm de IFN- α , afin de montrer leur corrélation (Fig. 3). Les deux groupes de poulets infectés constituent deux nuages de points distincts, traduisant le fait que les animaux infectés par le virus NSdel8084 montraient les valeurs les plus élevées des ARNm des deux cytokines. Entre J+2 et J+4, les niveaux d'ARNm de l'IFN- α sont 100 à 1000 fois plus élevés chez les animaux infectés par le virus NSdel8084 ($P < 10^{-4}$). Nous avons aussi observé que, à J+2 et J+3, les niveaux élevés d'expression d'IFN- α sont fortement corrélés aux charges virales mesurées dans le poumon.

2.4. Réplication accrue du virus NSdel8084, *in ovo* et en culture cellulaire.

Nous avons voulu examiner si la réplication accrue *in vivo* du virus NSdel8084 s'observait aussi *in vitro*. Un test de réplication virale réalisé dans la lignée CLEC213 de cellules épithéliales de poumon de poulet (Esnault et al., 2011) a révélé que le virus NSdel8084 se réplique à des niveaux 3 à 10 fois plus élevés que le virus sauvage (Fig. 4). Ce pouvoir réplcatif plus élevé du virus NSdel8084 s'observe aussi en œuf embryonné, se traduisant par des titres d'hémagglutination plus élevés d'une unité en moyenne ($P < 0.01$).

CONCLUSION

La délétion des acides aminés 80-84 dans la région inter-domaines de NS1 accroît la réplication du virus *in vitro* et chez l'animal infecté et augmente la pathogénicité virale, même chez un virus non-H5N1. En utilisant un système différent basé sur un virus réassortant WSN/H5N1, Long et al. (2008) avaient également montré que la délétion 80-84 accroît la pathogénicité virale, chez la souris et chez le poulet. L'ensemble de ces résultats, joints au fait que le segment porteur de cette mutation, provenant de virus H5N1, a depuis été retrouvé en Asie chez des virus non-H5N1, démontrent que l'avantage sélectif conféré par cette mutation n'est pas limité aux virus H5N1. Il pourrait être judicieux de rechercher l'existence de cette mutation dans les virus influenza aviaires circulants.

REMERCIEMENTS.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier de la DGAL (Fonds de Recherche sur l'Influenza Aviaire, projet FRIA-008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Esnault, E., Bonsergent, C., Larcher, T., Bed'hom, B., Vautherot, J. F., Delaleu, B., Guigand, L., Soubieux, D., Marc, D. & Quere, P., 2011. *Virus Res.*, 159 : 32-42.
2. Guan, Y., Peiris, J. S., Lipatov, A. S., Ellis, T. M., Dyrting, K. C., Krauss, S., Zhang, L. J., Webster, R. G. & Shortridge, K. F., 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 : 8950-8955.
3. Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G. J., Xu, K. M., Duan, L., Rahardjo, A. P., Puthavathana, P., Buranathai, C. & other authors, 2004. *Nature* 430 : 209-213.
4. Long, J. X., Peng, D. X., Liu, Y. L., Wu, Y. T. & Liu, X. F., 2008. *Virus Genes* 36 : 471-478.
5. Munier S., Larcher T., Cormier-Aline F., Soubieux D., Su B., Guigand L., Labrosse B., Cherel Y., Quere P., Marc D., Naffakh N., 2010. *J. Virol.*, 84 : 940-52.
6. Munir, M., Zohari, S., Iqbal, M., Abbas, M., Perez, D. R. & Berg, M. 2013. *Virulence* 4 : 612-623.
7. Trapp S, Soubieux D, Marty H, Esnault E, Hoffmann TW, Chandenier M, Lion A, Kut E, Quéré P, Larcher T, Ledevin M, Munier S, Naffakh N, Marc D., 2014. *J Gen Virol.*, 95 : 1233-43.

Les figures sont extraites de l'article Trapp et al., 2014, J. Gen. Virol. 2014 **95**:1233-43. doi: 10.1099/vir.0.063776-0.

Figure 1. Charge virale dans les tissus des poulets infectés. Les charges virales (triangles blancs : virus sauvage, triangles rouges : virus NSdel8084) sont exprimées en \log_{10} du nombre de copies d'ARN viral par mg de tissu (ou par écouvillon).

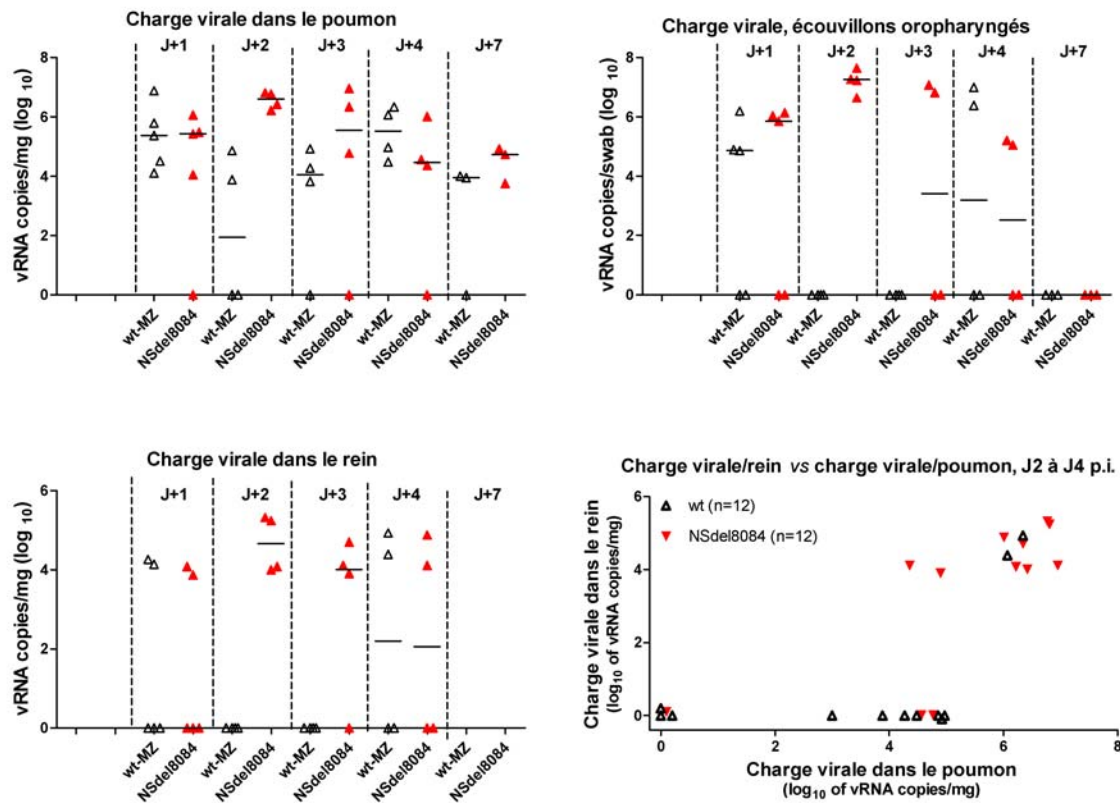


Figure 2. Lésions histologiques observées à J+1 dans les poumons des poulets témoins (A) ou infectés (B, C). (B) De larges foyers de pneumonie péribronchiolaire intersticielle sont observés chez les animaux infectés. Des cellules inflammatoires occupent les voies aériennes et infiltrent le parenchyme. (C) De large foyers coalescents de pneumonie intersticielle sont observés. Les voies aériennes sont envahies de fibrine et le parenchyme est massivement infiltré par des cellules inflammatoires.

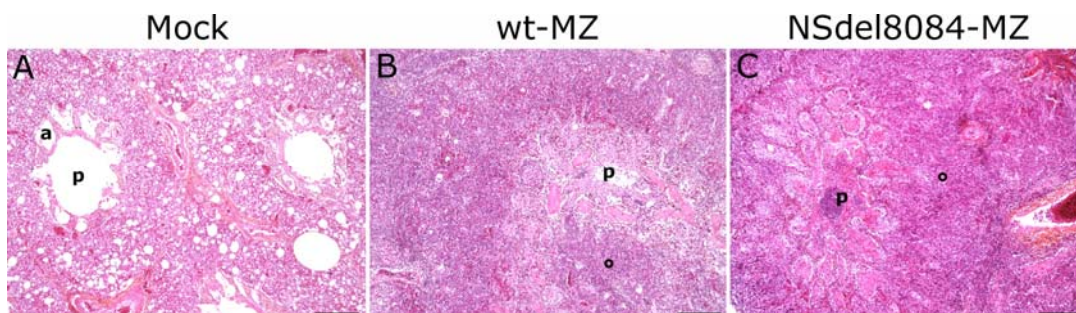


Figure 3. Expression des ARNm d'interféron alpha (IFN- α) et interleukine 6 (IL-6) dans le poumon des animaux infectés, entre J+2 et J+4 post-infection (n=12 animaux dans chaque groupe). Les niveaux d'ARNm sont exprimés en log10 des valeurs normalisées (normalisation sur les ARNm de GAPDH, G10 et ubiquitine). Les valeurs d'IL-6 sont exprimées en fonction des valeurs d'IFN- α (vert : wt-MZ, rouge : NSdel8084). La taille des symboles reflète la charge virale mesurée dans le poumon (points : $< 10^4$ copies d'ARN viral par mg ; cercles : 10^4-10^6 ; cercles avec point central : $> 10^6$ copies d'ARN viral par mg).

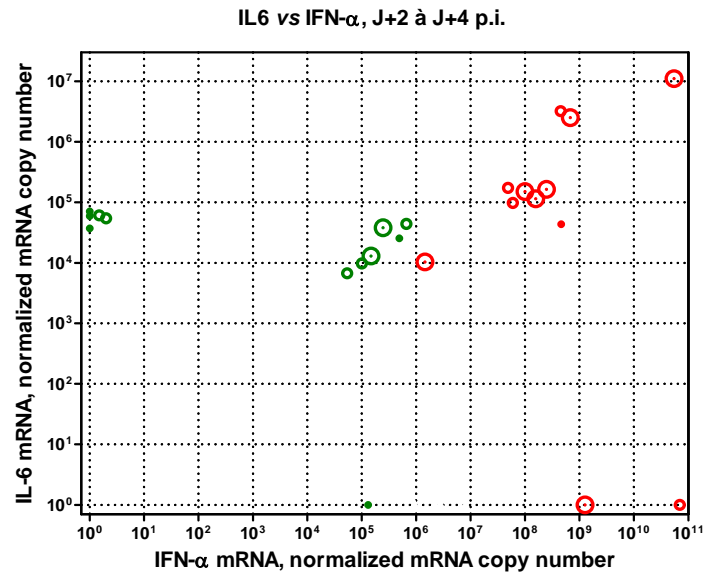


Figure 4. Courbes de croissance virale sur cellules CLEC213, et production virale sur œuf embryonné.

