

Élaboration d'un Modèle Souris pour le Virus West Nile (Souche Mor/1996)

G. HANAFI HOUOITEN¹, I. EL BERBRI¹, S. FELLAHI¹, H. ALYAKINE², M. EL HARRAK³, F. KICHOU¹, O. FASSI FIHRI¹

(Reçu le 04/09/2023; Accepté le 23/11/2023)

Résumé

La présente étude a pour objectif l'élaboration et la validation d'un modèle souris pour l'infection *in vivo* du virus de la West Nile (WNV). Pour ce faire, 90 souris albinos natives non vaccinées ont été réparties en trois lots selon trois modes d'inoculation, à savoir: Intracérébral (IC), Sous-cutanée (SC) et Intrapéritonéale (IP). Chaque lot a été composé de 25 animaux challengés et cinq témoins. Après inoculation, des observations quotidiennes de symptômes cliniques ont été réalisées selon un tableau de scoring préétabli sur une période de 2 mois. Après la mort des animaux, une autopsie et une décérébration ont été réalisées, en vue d'une analyse histo-pathologique, et un test RT-PCR. Les résultats ont montré que le tableau clinique le plus complet était observé chez les animaux inoculés par voie IP et SC, à savoir: ataxie, amaigrissement, une déshydratation, signes de constipation, une fasciculation et une cécité. Cependant, pour la voie IC, la majorité des souris sont mortes d'une mort foudroyante sans manifester de signes cliniques en dehors de l'ataxie. Le taux de mortalité parmi les animaux inoculés était de 96% pour la voie IC, 56% pour la voie IP et 44% pour la voie SC. L'examen histo-pathologique a montré des signes non pathognomoniques mais bien marqués comme: une gliose discrète à modérée, focale périvasculaire et une dégénérescence et nécrose neuronale discrète à modérée. En revanche, tous les échantillons testés par RT-PCR ont été positifs au WNV. Par ailleurs, le calcul de la DL50 a révélé des valeurs de $10^{4.3}$ et de $10^{4.8}$ respectivement pour les IC et IP. Il ressort de la présente étude que les voies d'inoculation validées pour le modèle souris de l'infection avec le virus du Nil occidental (WNV), sont les voies IP et SC.

Mots-clés: West Nile, Modèle-souris, Challenge, RT-PCR

Development of Mice Model for the West Nile Virus (Strain Mor/1996)

Abstract

The present study aims to develop and validate a mouse model for *in vivo* infection with West Nile Virus (WNV). To achieve this, 90 non-vaccinated native albino mice were divided into three groups according to three modes of inoculation: Intracerebral (IC), Subcutaneous (SC), and Intraperitoneal (IP). Each group consisted of 25 challenged animals and five controls. After inoculation, daily observation of clinical symptoms was conducted based on a predetermined scoring chart over a period of 2 months. After the animals' deaths, autopsy and decerebration were performed for histopathological analysis and an RT-PCR test. The results showed that the most comprehensive clinical presentation was observed in animals inoculated via the IP and SC routes, including ataxia, weight loss, dehydration, signs of constipation, fasciculation and blindness. However, for the IC route, the vast majority of mice suddenly died without exhibiting clinical signs, apart from ataxia. The mortality rate among inoculated animals was 96% for the IC route, 56% for the IP route and 44% for the SC route. Histopathological examination revealed non-pathognomonic but well-marked signs such as discrete to moderate focal perivascular gliosis and mild to moderate neuronal degeneration and necrosis. On the other hand, all samples tested by RT-PCR were positive for WNV. Furthermore, the calculation of the LD50 revealed values of $10^{4.3}$ and $10^{4.8}$ for IC and IP routes respectively. It results from this study that the validated inoculation routes for the mouse model of West Nile virus infection are the IP and SC routes.

Keywords: West Nile, Mice- Model, Challenge, RT-PCR

INTRODUCTION

Des modèles rongeurs ont été étudiés pour comprendre le modèle d'action du Virus West Nile (WNV). L'utilisation des souris comme modèle pour les maladies virales permet une meilleure compréhension des mécanismes d'infection virale, des réponses immunitaires et des interactions hôte-virus. Cela peut aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et à développer de nouveaux traitements et vaccins pour les maladies virales. Les souris ont été largement utilisées pour étudier l'influenza, y compris la grippe aviaire et la grippe pandémique. Les souris ont également été utilisées pour étudier l'hépatite virale. Elles ont été modifiées génétiquement pour exprimer les récepteurs humains pour le VIH, ce qui permet l'étude de l'infection par le VIH. Elles ont été utilisées pour étudier la fièvre de la vallée du Rift (Malnoy *et al.*, 1998), et les maladies à arbovirus transmises par les moustiques, telles que la dengue et le virus Zika (Vouga *et al.*, 2016).

Chez la souris, le WNV se réplique très vite dans les tissus périphériques, avec un pic virémique à 3-4 jours post

infection (Diamonds *et al.*, 2003). C'est pendant le pic virémique que le virus commence à envahir le cerveau, avec une charge virale détectable dès le 5^{ème} jour post infection. Au bout de 6 jours, le virus n'est plus détecté dans le sang et les organes et pénètre dans le système nerveux central (Samuel et Diamonds 2006). Le virus entre via la voie neuronale (Samuel *et al.*, 2007) par l'infection des neurones olfactifs et/ou par transport axonal rétrograde à partir des neurones périphériques (Wang *et al.*, 2009) ou voie circulatoire (Samuel et Diamond 2006) et infecte les motoneurones (Wang *et al.*, 2009).

Les objectifs de la présente étude sont de: 1) valider un modèle souris permettant des essais *in vivo* avec la souche Marocaine du virus West Nile (Mor, 1996); 2) définir la voie et le titre viral permettant l'apparition de la maladie chez la souris blanche albinos; 3) définir le tableau clinique chez la souris en fonction des différentes voies d'inoculation du WNV; et enfin de 3) déterminer les lésions anatomopathologiques au niveau du cerveau des souris infectées expérimentalement.

¹ Département de Pathologie et Santé Publique Vétérinaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

² Département de médecine, chirurgie et reproduction, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

³ Département Recherche et Développement, Industrie Multi-Chimique Santé Animale, Mohammadia, Maroc

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les Animaux

Les animaux utilisés dans cette expérimentation sont des souris blanches albinos de race suisse natives, de 3 semaines d'âge (environ 21 g) fournies par le Laboratoire Régional de Contrôle de Rabat (DPIV) pour les premiers lots, puis un élevage de souris albinos a été conduit au sein de l'animalerie de l'unité de Microbiologie, Immunologie et Maladies Contagieuses (MIMC), de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.

Avant le début de l'expérimentation, une désinfection et désinsectisation totale de l'animalerie ont été effectuées. En outre, des lampes anti-moustiques et des chauffages ont été installés.

Les souris ayant atteint l'âge requis ont été sexées en visualisant la distance ano-génitale (chez les souris mâles, la distance ano-génitale est plus grande que chez les femelles) et chez le mâle adulte la présence des testicules est évidente. Par la suite les animaux ont été répartis en deux groupes, un où les animaux ont été inoculés avec le virus WN et un servant de groupe témoin. Les deux groupes ont été séparés dans deux salles différentes. Chaque groupe a été réparti en trois lots, selon la voie d'inoculation (intracérébrale, intrapéritonéale et sous-cutanée), dans des cages individuelles identifiées (Numéro, sexe, poids date et voie d'inoculation) (Figure 1). Les lots avec les animaux inoculés, ont été composés de 25 souris chacun et ont reçu une injection de virus, et les groupes témoins ont été composés de 5 souris chacun et ont reçu une injection de sérum physiologique. Ainsi chaque voie d'inoculation a concerné 30 souris albinos.



Figure 1: Cages individuelles avec étiquettes d'identification (Numéro, Sexe, Voie d'inoculation du virus WN et date d'inoculation) (Hanafi Houoiten G.)

Protocole d'inoculation

La souche virale du WNV utilisée dans cette étude, est l'Isolat West Nile Maroc 1996 souche Bouznika P5 BSK P4 Vero, isolée par El Harrak *et al.* (1996). Cette souche appartient à la lignée 1, clade 1a du virus du Nil occidental (Schuffenecker *et al.*, 2005).

Trois voies d'inoculation ont été explorées: la voie intracérébrale, la voie intrapéritonéale et la voie sous-cutanée. Chaque voie a été testée sur deux lots (challengé et témoin) des six lots de l'étude.

Par ailleurs, ces séries d'expérimentation ont permis de déterminer la DL50 pour cette souche WN sur les souris albinos. Le calcul de la DL50 est fait par extrapolation à partir du titre viral testé ayant provoqué le plus faible taux de mortalité, et le titre viral testé ayant provoqué le taux de mortalité le plus élevé. Pour ce faire, deux expérimentations ont été réalisées en utilisant deux titres différent du virus.

Dans une première partie de l'expérimentation, la suspension de Virus West Nile utilisée était titrée à 10^4 . Trois lots de souris blanches albinos ont été testés comme suit:

- **Lot 1:** 25 souris ont été inoculées par voie Intra Cérébrale avec 10 μ l de la suspension de virus vivant et 5 souris ont reçu un placebo (10 μ l de sérum physiologique).

- **Lot 2:** 25 souris ont été inoculées par voie Sous Cutanée avec 30 μ l de la suspension de virus vivant et 5 souris ont reçu un placebo (30 μ l de sérum physiologique).

- **Lot 3:** 25 souris ont été inoculées par voie Intra Péritonéale avec 30 μ l de la suspension de virus vivant et 5 souris ont reçu un placebo (30 μ l de sérum physiologique) (Figure 2).

Les souris inoculées avec le virus WNV ont été observées quotidiennement et pesées afin de notifier toute modification. Les modifications ont été notées en fonction d'un tableau de scoring pré-établi. Ainsi, des points ont été attribués, à savoir: 2 points pour une attitude normale, 1 point pour une modification, 0 pour une absence. Une note journalière sur 20 a été obtenue permettant d'évaluer quotidiennement l'état clinique de l'animal, et ainsi de déterminer la durée d'apparition des symptômes en post inoculation. Les souris mortes ont subi une autopsie et une décérébration. Vingt cerveaux de ces souris ont été prélevés, une moitié de chaque cerveau a été placée dans du formol en vue d'une analyse histo-pathologique, et l'autre moitié a été placée dans un cryotube stérile et à -80°C en vue d'un examen par RT-PCR pour détection virale et une confirmation de l'origine de la mortalité.

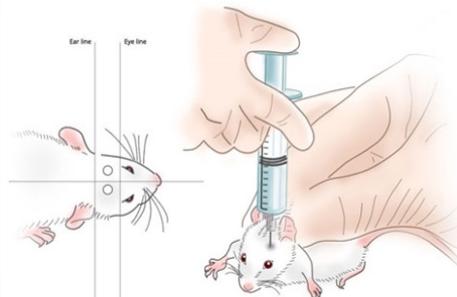


Figure 2: Technique d'inoculation Intrapéritonéale (Hanafi Houoiten G.) Inoculation Intracérébrale (Encapsula Nano Sciences) et inoculation Sous-Cutanée (Kay Stewart)

Dans la deuxième partie de l'expérimentation, la suspension de Virus West Nile utilisée était titrée à 10⁵.

Trois lots de souris blanches albinos ont été testés comme suit:

- **Lot 1:** 25 souris ont été inoculées par voie Intra Cérébrale (IC) avec 10 µl de la suspension de virus vivant, et 5 souris ont reçu un placebo (10 µl de sérum physiologique).

- **Lot 2:** 25 souris ont été inoculées par voie Sous Cutanée (SC) avec 30 µl de la suspension de virus vivant, et 5 souris ont reçu un placebo (30 µl de sérum physiologique).

- **Lot 3:** 25 souris ont été inoculées par voie Intra Péritonéale (IP) avec 30 µl de la suspension de virus vivant, et 5 souris ont reçu un placebo (30 µl de sérum physiologique).

Les souris ont été observées quotidiennement, deux fois par jour, afin de remplir la fiche de scoring (Tableau 1), selon la même notation que la première expérimentation. L'expérimentation pour la voie IC a été reconduite 3 fois pour confirmation du modèle.

- Une première fois avec un lot de 22 souris pour l'épreuve challenge et 3 souris pour le placebo.

- Une deuxième et troisième fois avec 10 souris pour l'épreuve challenge et 2 souris pour le placebo.

Calcul de la DL50

La DL50 (dose létale 50) pour le virus West Nile a été calculée selon les deux titres administrés lors des deux expérimentations en observant le nombre de décès résultant de chaque titre. Et ce, en utilisant une méthode statistique pour calculer par extrapolation la dose qui a tué 50% des animaux, à savoir:

$$DL50 = 10(A + (B - A) \times (50 - Y)/(Z - Y))$$

A = log du titre viral le plus faible testé (=10⁴)

B = log du titre viral le plus élevé testé (=10⁵)

Y = pourcentage de décès le plus bas observé

Z = pourcentage de décès le plus élevé observé

Tableau 1: Tableau de scoring par observation des souris

| Critères évalués | Scoring |
|--------------------------|---------|
| Apparence générale | /2 |
| Poids* | /2 |
| Posture | /2 |
| Qualité du Poil | /2 |
| Consommation Alimentaire | /2 |
| Consommation Hydrique | /2 |
| Activité | /2 |
| Mobilité | /2 |
| Respiration | /2 |
| Démarche | /2 |
| TOTAL | |

*Perte de Poids: note de 1. Prise de poids: note de 2.

Prélèvement des échantillons

Les souris mortes ont été décérébrées et leur cerveau prélevé (Figure 3), une moitié placée dans du formol en vue d'un examen histo-pathologique, et l'autre moitié placée dans un cryo-tube stérile et à -80°C en vue d'un examen par RT-PCR pour détection virale et une confirmation de l'origine de la mort.

Examen Histopathologique

Les souris mortes ont été autopsiées et des prélèvements de tissus du SNC (cerveau, bulbe, cervelet et moelle épinière) ont été réalisés puis fixés au formol tamponné à 10% en vue de l'examen histopathologique. Les tissus ainsi fixés ont été préparés selon les techniques histologiques usuelles. Brièvement, les tissus ont été déshydratés à l'aide d'une série de bains d'alcool, éclaircis à l'aide de bains de toluène et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été confectionnées, montées entre lames et lamelles puis colorées par la technique hématoxyline et éosine. Les coupes histologiques ainsi préparées ont été examinées sous microscope optique pour la recherche des lésions microscopiques, leur description et la caractérisation de leur nature, étendu et sévérité.

Analyse RT-PCR en temps Réel

L'analyse par RT-PCR a été basée sur la quantification de l'ARN viral du Virus West Nile dans les cerveaux des souris mortes par infection expérimentales.

a) L'extraction de l'ARN viral

Elle représente est une étape préliminaire à la RT-PCR et se fait à partir des échantillons de cerveaux de souris mortes suite à l'inoculation par voie IC du VWN. Le kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit d'Invitrogen utilisé, est un kit permettant l'extraction d'ARN génomique à partir de différents types d'échantillons, tels que des cellules, des tissus et des cultures bactériennes. Il utilise une technologie



Figure 3: Décérébration d'une souris albinos morte à la suite de l'inoculation expérimentale par le virus West Nile MOR1996 (Hanafi Houoiten G.)



Figure 4: PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen™, Kit utilisé dans notre étude pour l'extraction virale des cerveaux de souris morte par infection expérimentale au WNV (Hanafi Houoiten G.)

de colonne de purification basée sur la chromatographie d'affinité, et permet une extraction rapide et efficace de l'ARN génomique purifié. Il est recommandé de broyer les morceaux de cerveaux dans des mortiers et manche de mortier stérilisés et congelés à -80°C , les tissus congelés étant alors plus faciles à broyer et l'extraction plus efficace. La procédure de purification est conçue pour purifier l'ARN génomique en utilisant une centrifugation basée sur une colonne de spin en un temps total de 10 à 15 minutes. Toutes les étapes de centrifugation sont décrites dans le protocole du kit et ont été réalisées à température ambiante.

b) Amplification de l'ARN Viral

Le protocole de la RT-PCR utilisé est une RT-PCR one step qui associe la transcription inverse de l'ARN (RT, reverse-transcriptase) à l'amplification génétique (PCR, polymérase chain reaction). Les deux réactions enzymatiques ont été réalisées successivement au niveau d'un Thermocycleur en temps réel, le Light Cycler 480 (LC480) qui est conçu pour la réalisation de PCR en temps réel sur un format de 96 échantillons.

L'ARN récupéré lors de l'extraction a été soumis à une amplification enzymatique en deux étapes du génome virale en présence de la sonde (Taq-Man). L'ADNc obtenu a été amplifié par la PCR sous l'activité de l'ADN polymérase, les amorces et une sonde Taq-Man marquée en 5' par un agent fluorescent FAM et en 3' par TAMRA.

Les séquences des primers et la sonde utilisées pour la détection du virus de la WN lors de l'amplification sont consignées dans le tableau 2.

Tableau 2: Amorces utilisées pour la RT-PCR pour identifier le WNV (OIE Terrestrial Manual 2013)

| Virus | 5' -> 3' |
|----------------|-----------------------------------|
| Forward primer | GGG-CCT-TCT-GGT-CGT-GTT-C |
| Reverse primer | GAT-CTT-GGC-YGT-CCA-CCT-C |
| Probe | FAM-CCA-CCC-AGG-TCC-TTC-GCA-A-BHQ |

RÉSULTATS

Signes cliniques et mortalités survenus à la suite de l'inoculation des souris avec le WNV

Durant de la première expérimentation utilisant le titre viral de 10^4 , seulement 8 souris était mortes sur les 90 souris inoculées. Les cerveaux de ces souris ont été testés par RT-PCR. Elles étaient positives au WNV. Sur les souris restantes, seulement quatre ont manifesté quelques symptômes d'ataxie mais se sont vite rétablies le lendemain.

L'expérimentation 2 a été reconduite avec un titre viral plus élevé de 10^5 , le taux de mortalité parmi les animaux inoculés était de 96% pour la voie IC, 56% pour la voie IP et 44% pour la voie SC. Alors que parmi les lots témoins, aucun cas de mortalité n'a été enregistré.

La plupart des souris (24/25) inoculées par voie intra-cérébrale sont mortes à partir du 8^{ème} jour post inoculation et la dernière (1/25) mortalité est survenue le 12^{ème} jour. Toutes ces souris sont mortes d'une mort foudroyante sans manifester de signes cliniques en dehors de l'ataxie.

Les souris inoculées par voie intrapéritonéale sont mortes à partir du 10^{ème} au 12^{ème} jour pour un premier groupe, un deuxième groupe plus résistant est mort entre le 21^{ème} et 36^{ème} jour post inoculation. Ces souris ont présenté un tableau clinique plus complet avec des signes de déshydratation, d'amaigrissement, un mauvais pelage, des tremblements, une ataxie, et une léthargie. Des cas de cécité (3 souris) et de constipation (6 souris) ont également été relevés.

Les souris inoculées par voie sous cutanées ont connu la même évolution sur le plan clinique que le second groupe de mortalité pour l'inoculation par voie IP. Les mortalités ont démarré au bout du 21^{ème} jour post inoculation jusqu'au 36^{ème} jour post inoculation.

Le tableau de scoring est une aide au diagnostic et permet ainsi de définir le pronostic de la maladie. Un animal ayant une note entre 18 et 20 est un animal normal sans modification physiologique observable. Un animal ayant obtenu une note située entre 10 et 18 est un animal présentant des modifications physiologiques importantes et manifestant

Tableau 3: Taux de mortalité des souris en fonction des différentes voies d'inoculation (Titre de virus 10^4)

| VOIE D'INOCULATION (WN à 10^4) | MORT | VIVANT | Total | Mortalité |
|-----------------------------------|------|--------|-------|-----------|
| Intracérébrale | 6 | 19 | 25 | 24% |
| Intrapéritonéale | 2 | 23 | 25 | 8% |
| Sous-cutanée | 0 | 25 | 25 | 0% |
| TOTAL | 8 | 67 | 75 | 10,6% |

Tableau 4: Taux de mortalité des souris en fonction des différentes voies d'inoculation (Titre de virus 10^5)

| VOIE D'INOCULATION (WN à 10^5) | MORT | VIVANT | Total | Mortalité |
|-----------------------------------|------|--------|-------|-----------|
| Intracérébrale | 24 | 1 | 25 | 96% |
| Intrapéritonéale | 14 | 11 | 25 | 56% |
| Sous-cutanée | 11 | 14 | 25 | 44% |
| TOTAL | 49 | 26 | 75 | 65,3% |

les signes cliniques de la maladie: le pronostic est réservé. Un animal ayant obtenu une note en dessous de 10 est un animal en détresse et le pronostic est engagé.

Les tableaux 3 et 4 suivants résumant les taux de mortalité des souris et les dates de la mort des souris en fonction des différentes voies d'inoculation.

Le tableau clinique de la maladie était similaire chez toutes les souris de l'expérimentation.

Pour la voie Intra cérébrale, au cours des 5 premiers jours de l'expérimentation tout semblait normal, aucune modification de comportement n'a été relevée. Le 6^{ème} jour, les animaux sont devenus ataxiques et léthargiques et sont morts quelques heures après l'apparition de ces symptômes.

Concernant les voies intra-péritonéale et sous-cutanée, un tableau clinique plus complet a été relevé (Tableau 5). Les animaux ont d'abord présenté un amaigrissement (72% des cas), la consommation en eau a diminué (32% des cas), ainsi que l'activité de toilettage. Le pelage semblait ébouriffé et terne (40% des cas). Puis les animaux ont commencé présenter des signes d'apathie et à s'isoler dans un coin de la cage tête contre la paroi, suivi de tremblements musculaires (64%), de signes neurologiques d'ataxie (98%), puis de léthargie et paralysie (66%).

Certains cas de cécité ont également été relevés (8%), ainsi que des cas de constipation (16%). Les souris ayant survécu n'ont manifesté aucun signe résiduel.

Le tableau 6 résume le nombre de souris selon les différents signes cliniques observés suite à l'inoculation avec le WNV par la voie intra-péritonéale et sous-cutanée dans les conditions de notre protocole expérimental.

Calcul de la DL50

A l'issue des deux expérimentations, à des titres viraux différents, 10^4 et 10^5 , il a été possible de déterminer la DL50 pour les voies d'inoculation IC et IP. Ainsi, le volume utilisé pour la voie IC est 10 μ l de suspension virale, virus vivant MOR1996 et 30 μ l pour les voies IP et SC. La DL50 est obtenue par extrapolation à partir des taux de mortalités pour les différents titre viraux (Tableau 7).

Examen Histopathologique pour la voie IC et IP

L'examen histo-pathologique effectué sur les cerveaux de souris autopsiées (49 animaux morts) a révélé l'existence de nombreuses lésions au niveau du Cortex Cérébral (coupe réalisée au niveau du cortex occipital et des cornes d'Ammon) (Figure 5), du Bulbe Rachidien (Figure 6) ainsi que du mésencéphale (Figure 7). Les lésions observées sont une gliose discrète à modérée, focale périvasculaire. Une dégénérescence et nécrose neuronale discrète à modérée, associée ou non à une satellitose et/ou de neuronophagie a également été relevée. Une dégénérescence était visible sous forme de neurones hypertrophiés avec un contour arrondi et un cytoplasme dense à éosinophile. La nécrose correspondait à des neurones soit complètement désintégrés, avec un noyau pycnotique ou avec une chromatolyse centrale. Il a également été relevé la présence de manchons lymphocytes et/ou péricytes péri-vasculaires discrets à modérés. Il est à noter que nous n'avons pas relevé d'hémorragie et d'œdème au niveau des différentes coupes observées. Enfin, le cervelet et la moelle épinière n'ont montré aucun des changements décrits ci-dessus.

Tableau 5: Date de la mort des souris en fonction des différentes voies d'inoculation

| VOIE D'INOCULATION (WN à 10^5) | DATE DE LA MORT | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--|
| Intracérébrale | 100%: 6 à 12 jours | |
| Intrapéritonéale | 28,5% entre 10 et 12 jours (4 souris) | 71,5% entre 21 et 36 jours (10 souris) |
| Sous-cutanée | 100% : 21 à 36 jours | |

4 souris ont présenté des signes de cécité (voie IP et SC).

8 souris ont présenté des signes de constipation (voie IP et SC).

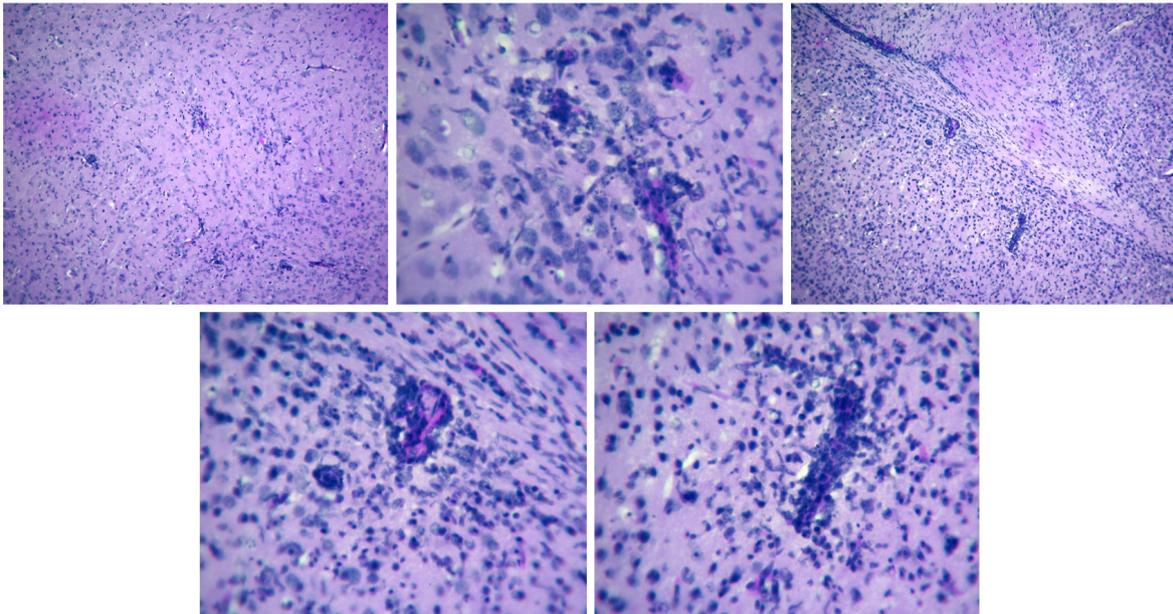
100% des souris mortes ont présenté des symptômes d'ataxie (voie IC, IP et SC)

Tableau 6: Symptômes manifestés par les souris inoculées avec le VWN Mor1996

| Symptômes | Amaigrissement | Déshydratation | Poils ébouriffés | Tremblement | Paralysie | Ataxie |
|-------------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-----------|--------|
| Nombre de cas | 36 | 16 | 20 | 32 | 33 | 49 |
| Taux de mortalité | 72% | 32% | 40% | 64% | 66% | 98% |

Tableau 7: DL50 obtenue pour le VWN Mor1996 sur souris albinos par voie IC et IP

| Voie d'inoculation | Taux de mortalité pour le Titre viral 10^4 | Taux de mortalité pour le Titre viral 10^5 | DL50 |
|--------------------|--|--|---|
| IC | 24% | 96% | $10^{4.3}$ |
| IP | 8% | 56% | $10^{4.8}$ |
| SC | 0 | 44% | Voie qui n'a pas été retenue pour l'étude |



Figures 5: Coupes Histologiques du Cortex de souris albinos morte par infection expérimentale au WNV par voie IC et IP montrant la présence d'une dégénérescence, d'une nécrose neuronale modérée, d'une satellitose et d'une gliose focale

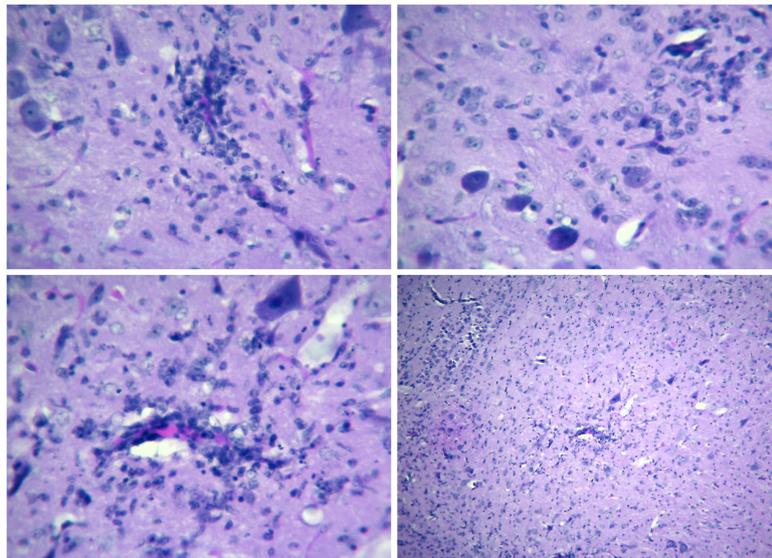


Figure 6: Coupes Histologiques du bulbe de souris albinos morte par infection expérimentale au WNV par voie IC et IP montrant la, présence d'une dégénérescence et d'une nécrose neuronale modérée et d'une gliose focale

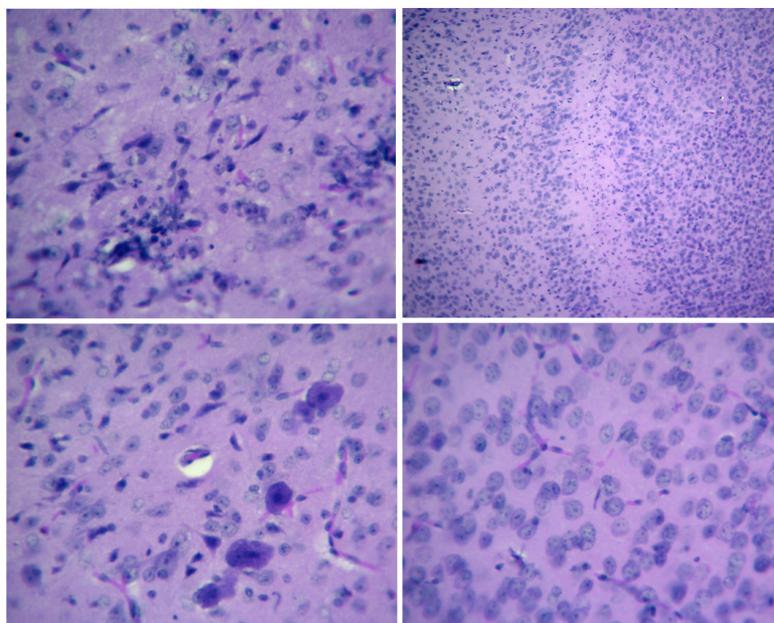


Figure 7: Coupes Histologiques du Mésencéphale de souris albinos morte par infection expérimentale au WNV par voie IC et IP montrant la, présence d'une dégénérescence, d'une nécrose neuronale modérée et d'une gliose focale

Le tableau 8 suivant résume le nombre de souris affectées à différents niveaux de l'encéphale (Mésencéphale, Cortex/CA et Bulbe/Cervelet) ainsi que des lésions de l'encéphale des souris morte suite à l'infection expérimentale au WNV par voie IC.

Résultats de l'analyse par RT-PCR

Tous les prélèvements testés par RT-PCR, provenant des 49 animaux morts suite à l'inoculation avec le WNV durant la deuxième expérimentation, ont été positifs aux virus avec des Ct relativement élevés notamment pour la voie IC, à savoir de 14-21.

DISCUSSION

Ce travail constitue une étude détaillée de la symptomatologie relative à une infection expérimentale de souris albinos de race suisse par le WNV et ainsi l'élaboration d'un modèle souris pour la souche virale WNV MOR/1996. Les souris de notre étude inoculées par voie intracérébrale n'ont présenté aucun symptôme en dehors de l'ataxie qui s'est manifestée quelques heures avant une mort foudroyante survenue entre le 6^{ème} et le 12^{ème} jour post inoculation (96% de mortalité). Les souris inoculées par voie intrapéritonéale et sous cutanée, ont quant à elles présenté un tableau clinique plus complet avec une apparition des symptômes à partir du 10^{ème} jour post inoculation, à savoir un amaigrissement, une déshydratation, des signes de constipation, une fasciculation, des cas de cécité ont été relevés (16% des cas), une ataxie, coma et mort. Par ailleurs, les lésions relevées lors de l'examen histopathologique, bien que marquées, à savoir une gliose discrète à modérée, focale périvasculaire, et une dégénérescence et nécrose neuronale discrète à modérée; ne sont pas pathognomoniques. Observation qui a été également rapportée par plusieurs études (Hayes, 2005; Kumar *et al.*, 2003). L'analyse par RT-PCR a révélé que tous les échantillons testés étaient positifs au WNV, ceci associé aux signes cliniques, aux lésions nerveuses ainsi qu'au fait qu'aucun cas de mortalité n'a été enregistré parmi les animaux témoins, confirment que la cause principale responsable du développement des signes cliniques et la mort des animaux est bien l'infection par le virus de la West Nile.

Par ailleurs, selon plusieurs études (Diamond *et al.*, 2003; Shrestha *et al.*, 2008; Suthar *et al.*, 2013), la validation d'un modèle clinique pour une infection donnée, repose essentiellement sur la capacité de ce modèle à reproduire répétitivement les caractéristiques et les différents signes

cliniques de la maladie. Lors de notre étude, il n'y a que les voies IP et SC qui ont abouti à un tableau clinique plus au moins complet de la maladie de la West Nile. Alors qu'avec la voie IC, la mort des animaux est survenue sans presque aucun signe clinique mis à part l'ataxie. En effet cette voie a été déconseillée par plusieurs études pour le modèle souris de l'infection avec le WNV. Les voies d'inoculation couramment utilisées et validées pour infecter les souris avec le WNV étant la voie intraveineuse ou la voie intrapéritonéale. En effet, ces voies, à l'opposé de la voie IC, permettent une infection systémique et une propagation du virus dans l'organisme de la souris (Ben-Nathan *et al.*, 2003; Shrestha *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2006; Suthar *et al.*, 2013). D'autres études, recommandent également d'autres voies d'inoculation qui peuvent être utilisées pour simuler des voies naturelles d'infection du virus telles que l'inoculation sous-cutanée ou intranasale (Shrestha *et al.*, 2003; Shrestha *et al.*, 2004; Daffis *et al.*, 2008).

Ainsi, selon les conditions de la présente étude les voies IP et SC sont les voies valides pour l'inoculation du modèle souris d'infection avec le virus de la West Nile.

CONCLUSION

Il ressort de la présente étude, qui a comme objectif l'élaboration et la validation d'un modèle souris pour l'infection *in vivo* du virus de la West Nile que:

- Le tableau clinique le plus complet de la maladie de la West Nile a été observé chez les souris inoculées par les voies IP et SC, à savoir: l'ataxie, l'amaigrissement, la déshydratation, des signes de constipation, une fasciculation, et également la cécité;
- L'examen d'histopathologie, réalisé à la suite de l'autopsie des animaux morts, a révélé des lésions nerveuses non pathognomoniques mais bien marquées comme: une gliose discrète à modérée, focale périvasculaire, et une dégénérescence et nécrose neuronale discrète à modérée;
- Le calcul de la DL50 a révélé des valeurs de $10^{4.3}$ et de $10^{4.8}$ respectivement pour les IC et IP;
- Les voies d'inoculation validées pour le modèle souris à l'infection avec le virus du Nil occidental (WNV), sont les voies IP et SC;
- Les voies d'inoculation validées, lors de la présente étude pour infecter les souris avec le virus du Nil occidental (WNV), sont les voies IP et SC.

Tableau 8: Tableau Récapitulatif du nombre de souris affectées à différents niveaux de l'encéphale suite à l'infection expérimentale au WNV par voie IC

| Lésions microscopiques | Nombre de souris affectés à différents niveaux de l'encéphale | | |
|---|---|-----------|----------------|
| | Mésencéphale | Cortex/CA | Bulbe/Cervelet |
| Dégénérescence & nécrose neuronale | 6/9 | 5/8 | 8/9 |
| Manchons lymphocytaires péri-vasculaires (MLPV) | 6/9 | 5/8 | 8/9 |
| Œdème localisé/diffus (OL/OD) | 1/9 | 1/8 | 8/9 |
| Congestion C/Hémorragies H | 1/9 | 1/8 | 8/9 |
| Neuronophagie/Satellitose | 6/9 | 5/8 | 8/9 |
| Gliose X focale (MF) ou diffuse (D) | 6/9 | 5/8 | 8/9 |

RÉFÉRENCES

- Ben-Nathan, D., Lustig, S., Tam, G., Robinzon, S., Segal, S., Rager-Zisman, B. (2003). Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile virus infection in mice. *J. Infect. Dis.*, 188: 5-12.
- Daffis S., Samuel M.A., Suthar M.S., Gale M.J., Diamond M.S. (2008). Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *J. Virol.*, 82:10349-10358.
- Diamond, M.S, Shrestha, B., Mehlhop, E., Sitati, E., Engle, M. (2003). Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol.*, 16:259-278.
- Keller, B.C, Fredericksen, B.L., Samuel M.A., Mock, R.E., Peter, W.M., Diamond, S., Gale, M.J. (2006). Resistance to alpha/beta interferon is a determinant of West Nile virus replication fitness and virulence. *J. Virol.*, 80:9424-9434.
- Kumar, M. (2003). Transcriptional analysis of West Nile virus infection in the mouse brain. *Virology*, 314: 415-423.
- Shrestha, B., Diamond, M.S. (2004). Role of CD8⁺ T cells in control of West Nile virus infection. *J. Virol.*, 78:8312-8321.
- Shrestha, B., Zhang, B., Purtha, W.E. (2008). Vaccine-induced protection against West Nile virus acute infection is mediated by humoral immunity and CD4⁺ T cells. *J. Virol.*, 82:8676-8685.
- Shrestha, B., Gottlieb, D., Diamond, M.S. (2003). Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. *J. Virol.*, 77:13203-13213.
- Suthar, M.S., Diamond, M.S., Gale M.J. (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1:115-128.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.*, 10:1366-13.