

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

2017

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 7 septembre 2017, à POITIERS
par Mademoiselle CHESSA Céline

**Etude de l'action immunomodulatrice et antivirale
de la cathélicidine humaine LL-37 et de la bêta-défensine humaine de type 3
au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains
par le virus West Nile**

Composition du jury :

Président : - Monsieur le Docteur BODET Charles

Membres : - Madame le Professeur IMBERT Berthe-Marie
- Madame le Docteur GARCIA Magali

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur LEVÊQUE Nicolas

PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, pharmacie clinique PU-PH
- MARCHAND Sandrine, pharmacocinétique PU-PH

- CARATO Pascal, chimie thérapeutique PR
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie PR
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie PR
- IMBERT Christine, parasitologie PR
- OLIVIER Jean Christophe, galénique PR
- PAGE Guylène, biologie cellulaire PR
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique PR
- SARROUILHE Denis, physiologie PR
- SEGUIN François, biophysique, biomathématiques PR

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, immunologie-hématologie MCU-PH
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique MCU-PH
- RAGOT Stéphanie, santé publique MCU-PH
- THEVENOT Sarah, hygiène et santé publique MCU-PH

- BARRIER Laurence, biochimie MCF
- BODET Charles, bactériologie MCF
- BON Delphine, biophysique MCF
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie MCF
- BUYCK Julien, microbiologie, MCF
- CHARVET Caroline, physiologie MCF
- DEBORDE-DELAGÉ Marie, sciences physico-chimiques MCF
- DEJEAN Catherine, pharmacologie MCF
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique MCF
- FAVOT-LAForge Laure, biologie cellulaire et moléculaire MCF
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie, MCF

- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie MCF
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique MCF
- INGRAND Sabrina, toxicologie MCF
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile pharmacochimie MCF
- PAIN Stéphanie, toxicologie MCF
- RIOUX BILAN Agnès, biochimie MCF
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacochimie MCF
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire MCF
- WAHL Anne, chimie analytique MCF

Maîtres de Conférences Associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

Attaché Temporaire d'Enseignement et de recherche (ATER)

FERRU-CLEMENT Romain, biochimie et biologie moléculaire

Professeur 2nd degré - anglais

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - anglais

- DHAR Pujasree

Contractuel enseignant - anglais

- ELLIOTT Margaret

Le Doyen,

Année universitaire 2016 - 2017

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (**surnombre jusqu'en 01/2017**)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (en détachement au 01/12)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
- FEIGERLOVA Eva, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- FRASCA Denis, anesthésiologie – réanimation
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- HURET Jean-Loup, génétique
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Maître de conférences des universités de médecine générale

- BOUSSAGEON Remy

Professeur associé des disciplines médicales

- ROULLET Bernard, radiothérapie

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard
- GIRARDEAU Stéphane
- GRANDCOLIN Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- DHAR Pujasree, maître de langue étrangère
- ELLIOTT Margaret, contractuelle enseignante

Professeurs émérites

- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2017)
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)
- POURRAT Olivier, médecine interne (08/2018)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2018)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- DORE Bertrand, urologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

REMERCIEMENTS

Au Président du jury,

Monsieur le Docteur Charles Bodet,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Merci également de m'avoir encadré et conseillé au cours de mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

Au Directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Nicolas Lévêque,

Je vous remercie de m'avoir accompagné au cours du master 2 puis de la thèse. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre équipe. Merci également pour votre confiance et vos encouragements. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci de m'accueillir dans votre service pour ces six derniers mois. Veuillez trouver ici le témoignage de ma vive reconnaissance.

A Madame le Docteur Magali Garcia,

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci de m'avoir formé au travail dans le NSB3, pour ton aide et tous tes conseils. Merci aussi de m'avoir encouragé à poursuivre dans la recherche.

Au Professeur Jean Claude Lecron

Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de votre équipe.

A Vincent

Merci pour ton aide très précieuse pour arriver à ces résultats et pour le soutien moral au cours du master.

A Martine, Nicolas et Marie

Merci à Martine, pour m'avoir formé à la culture des kératinocytes, pas toujours très compliants... Merci à Nico et Marie pour leur aide. Enfin merci à vous trois pour votre bonne humeur.

Aux techniciens du laboratoire de Virologie du CHU de Poitiers

Merci pour vos conseils et pour votre aide.

Aux biologistes des laboratoires de Virologie des CHU de Poitiers et de Nantes et à mes cointernes

Merci pour m'avoir permis de me dégager du temps pour pouvoir terminer ce travail.

A tous ceux qui m'ont soutenu au cours ce travail

Merci

ABREVIATIONS UTILISEES

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

AI : Avant Infection

ARN : Acide RiboNucléique

CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CNR : Centre National de Référence

Ct : Cycle seuil

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-Integrin

DICT : Dose Infectieuse en Culture de Tissu

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGF : Facteur de croissance épidermique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EP : Extrait Pituitaire

ET : Ecart Type

GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase

hBD : Bêta-Défensine humaine

hCAMP : human Cathelicin AntiMicrobial Protein

HNP : Human Neutrophil Peptide

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

IFN : Interféron

ISGs : Interferon Stimulated Genes

IL : Interleukine

kb : kilobase

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

MDA5 : Melanoma-Differentiation-Associated gene 5

MEM : Milieu essentiel Minimum de Eagle

Moy. : Moyenne

NK : Natural Killer

NS : Non Structural

PAM : Peptide AntiMicrobien

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PBS : Tampon phosphate salin

PI : Post-Infection

PKR : Protéine Kinase R

Poly (I:C) : Acide polyinosinique-polycytidylique

PRR : Pattern Recognition Receptor

qPCR : « Polymerase Chain Reaction » quantitative

(RT)-PCR : « Retro Transcription »-« Polymerase Chain Reaction »

RE : Reticulum Endoplasmique

RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene I

RLR : Retinoid-inducible helicase

SFM : Milieu sans sérum

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T0 : Moment de l'infection

TAM : TYRO3, AXL and the MER

TIM : T-cell Immunoglobulin and Mucin domain

TLR : Toll Like Receptor

UTR : Région terminale non codante

WNV : Virus West Nile

TABLE DES MATIERES

Généralités.....	1
I. Le Virus West Nile	1
a. Classification et structure	1
b. Cycle de réplication	3
c. Historique, Epidémiologie et Transmission.....	4
d. Manifestations cliniques	6
e. Diagnostic	7
f. Traitement et Prévention.....	8
II. Rôles de la peau et des kératinocytes au cours de l'infection par le virus West Nile..	9
a. Physiopathologie de l'infection par le WNV	9
b. Structure de la peau.....	9
c. Le kératinocyte est une cellule cible de l'infection par le WNV	10
d. Le kératinocyte est une cellule immunitaire de première ligne	11
III. Les peptides antimicrobiens du kératinocyte	13
a. La LL-37	14
b. Les β -défensines.....	14
c. Autres PAMs cutanés.....	15
d. Activité antivirale des PAMs cutanés	16
e. Activité immunomodulatrice des PAMs cutanés.....	17
IV. Conclusion	18
V. Objectif.....	19
Matériel et méthodes	20
I. Le matériel	20
a. Les cellules.....	20
b. Le virus	21
c. Les peptides antimicrobiens et le poly (I:C)	21

II.	Les méthodes.....	22
a.	Stimulation et infection des kératinocytes	22
b.	Mesure des niveaux d'expression des marqueurs de la réponse inflammatoire	23
c.	Mesure des niveaux de sécrétion des marqueurs de l'inflammation.....	25
d.	Quantification de la charge virale	25
e.	Détermination du titre infectieux	26
f.	Mesure de l'activité antivirale directe des PAMs	27
g.	Analyses statistiques	28
	Résultats	29
I.	Etude des effets immunomodulateurs des peptides antimicrobiens.....	29
a.	Evaluation de l'activité pro-inflammatoire de la LL-37 et d'hBD-3 sur des kératinocytes primaires humains à l'état basal.....	29
b.	Evaluation de l'activité pro-inflammatoire du poly (I:C) sur les kératinocytes primaires humains	30
c.	Evaluation de l'action immunomodulatrice des PAMs sur la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C).....	31
d.	Etude de la sécrétion de CXCL-8 par les kératinocytes stimulés par le poly (I:C) en présence de LL-37 et d'hBD-3.....	35
e.	Evaluation de l'action immunomodulatrice des PAMs sur la réponse inflammatoire du kératinocyte induite par l'infection par le WNV.....	37
II.	Etude des effets antiviraux de LL-37 et d'hBD-3 sur le virus West Nile.....	42
a.	Etude des effets antiviraux au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains par le WNV	42
b.	Etude des effets antiviraux par pré-incubation du WNV en présence de LL-37 et d'hBD-3 suivi d'un titrage sur cellules Vero	43
	Discussion	45
	Références	53
	Annexes.....	57

GENERALITES

I. Le Virus West Nile

a. Classification et structure

Le virus du Nil Occidental, ou virus West Nile (WNV), fait partie de la famille des *Flaviviridae* qui comprend quatre genres : *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* et *Pegivirus* (Stapleton et al., 2011). Le genre *Flavivirus*, auquel appartient le WNV, rassemble environ 70 espèces (Poidinger et al., 1996). Ces espèces étaient initialement regroupées en 8 sérogroupes : encéphalite à tique, Rio Bravo, encéphalite japonaise, Tyulenyi, Uganda S, Ntaya, Dengue et Modoc (Calisher et al., 1989). Le WNV fait partie du séro groupe du virus de l'encéphalite japonaise (Poidinger et al., 1996). En fonction de la séquence génétique codant les protéines d'enveloppe, le WNV est lui-même subdivisé en sept lignages dont les principaux impliqués en pathologie humaine sont les lignages 1 et 2 (Berthet et al., 1997, Mackenzie and Williams, 2009). Les souches appartenant au lignage 1 sont isolées en Afrique Centrale et du Nord, en Amérique Centrale et du Nord, en Australie (virus de Kunjin : souche de WNV avec une virulence naturellement atténuée, qui n'engendrait pas de cas d'encéphalite équine jusqu'à une épidémie en 2011 (Prow, 2013)), en Europe, en Inde, en Israël, en Colombie et en Argentine. Les espèces du lignage 2 sont enzootiques à Madagascar et en Afrique Australe et Centrale (West Nile Fever, 2013).

Les particules virales sont de petite taille, environ 50 nm de diamètre, enveloppées, avec une capsid de symétrie icosaédrique (Brinton, 2002). Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 11 kb. Cet ARN est composé d'un seul cadre ouvert de lecture codant trois protéines structurales, constitutives de la capsid (protéine C) et de l'enveloppe (prM/M et E) virales, et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) nécessaires aux étapes de traduction et de réplication du génome viral (Quicke and Suthar, 2013, Hoover and Fredericksen, 2014). Les régions non codantes (UTR) en positions 5' et 3' ont leur importance dans le cycle de réplication du virus. En effet, ces régions présentent des structures secondaires (tiges-boucles) très conservées qui

permettent des interactions ARN-ARN, entraînant ainsi la cyclisation de l'ARN viral et la réplication du génome. L'ARN génomique présente une coiffe dans la région 5' UTR, à l'instar des ARNm cellulaires, qui le protège de l'action des 5' exoribonucléases de la cellule hôte, permet l'initiation de la traduction et l'échappement à la réponse immunitaire innée médiée par le récepteur cytosolique MDA5 (Brinton, 2013) (Figure 1 et 2).

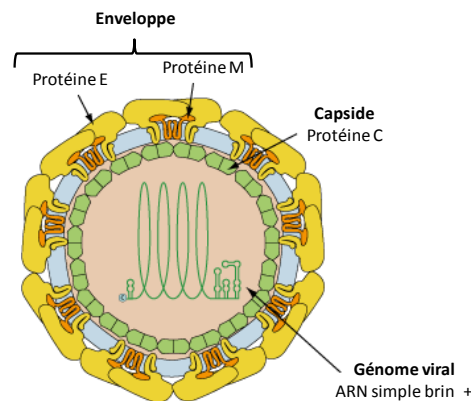


Figure 1 : Structure d'un virion du genre *Flavivirus* (adapté de ViralZone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics, <http://viralzone.expasy.org>) Le virus West Nile est un virus enveloppé comportant deux glycoprotéines d'enveloppe E et M intervenant dans l'attachement à la cellule cible. A l'intérieur de la particule virale, se trouve la protéine C constituant la capside qui renferme le génome viral formé par un brin d'ARN de polarité positive.

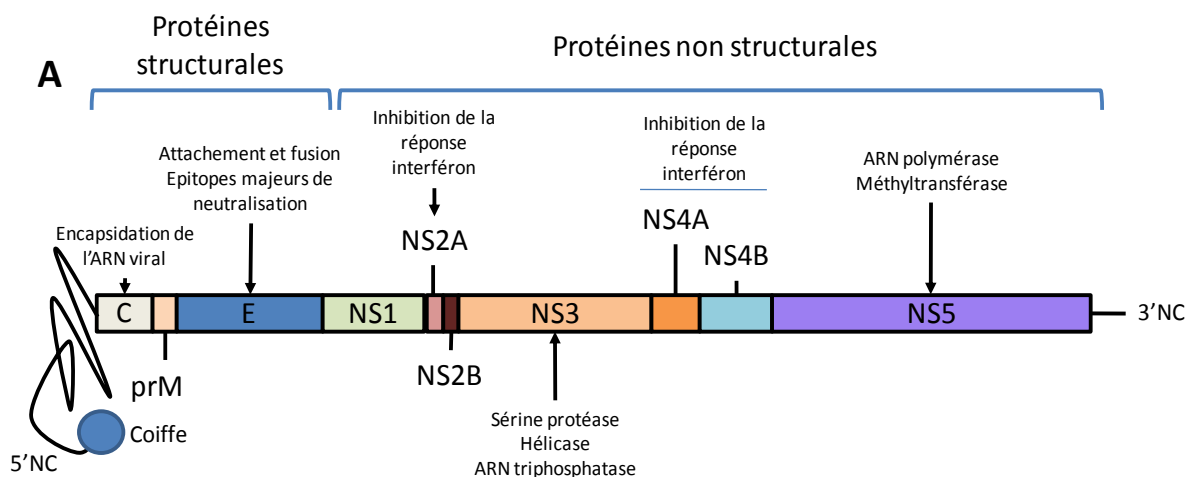


Figure 2 : Schéma du génome du virus West Nile. Le virus West Nile est un virus à ARN simple brin de polarité positive. L'ARN comprend un seul cadre ouvert de lecture codant, en 5', les trois protéines structurales (protéine de capside (C), protéines d'enveloppe (prM/M et E)), puis les sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Le génome viral comporte une coiffe à l'extrémité de la région 5' et également des structures secondaires très conservées en 5' et 3' UTR permettant des interactions ARN-ARN longue distance.

b. Cycle de réplication

Le cycle de réplication débute par la liaison du virus, grâce aux protéines de l'enveloppe, à son récepteur à la surface de la cellule cible. Le récepteur cellulaire du WNV n'est pas précisément connu mais plusieurs candidats cellulaires tels que le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-Integrin) et les protéines TIM (T-cell Immunoglobulin and Mucin domain) et TAM (TYRO3, AXL and the MER) ont été décrits comme impliqués dans l'attachement du virus à la surface cellulaire (Hamel et al., 2015, Perera-Lecoin et al., 2013). Après internalisation du virus par endocytose, vraisemblablement dépendante des puits tapissés de clathrine, médiée par le récepteur, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane de l'endosome à pH acide libérant la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire. La décapsidation intervient alors, permettant la traduction et la réplication de l'ARN viral au niveau d'usines de réplication constituées par un réarrangement des membranes cellulaires, et plus particulièrement du réticulum endoplasmique (RE) (Brinton, 2002). La réplication du génome viral débute par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité négative, formant avec l'ARN génomique une forme répllicative double-brin (Brinton, 2013). Le brin d'ARN de polarité négative ainsi synthétisé sert à son tour de matrice à la synthèse simultanée de multiples brins d'ARN génomique de polarité positive, constituant des intermédiaires de réplication partiellement bicaténaires. Formes répliquatives et intermédiaires de réplication constituent les principaux PAMPs viraux dont les interactions avec les senseurs cellulaires de la réponse immunitaire innée sont largement décrites dans la revue intitulée *Skin innate immune response to flaviviral infection*, acceptée pour publication dans European Cytokines Network en 2017 (Brinton, 2013, Shipley et al., 2012, Westaway et al., 1999, Garcia et al., 2017). Assemblage et bourgeonnement des virions néosynthétisés se produisent ensuite au niveau du RE avant libération dans le milieu extracellulaire par exocytose (Chambers et al., 1990) (Figure 3).

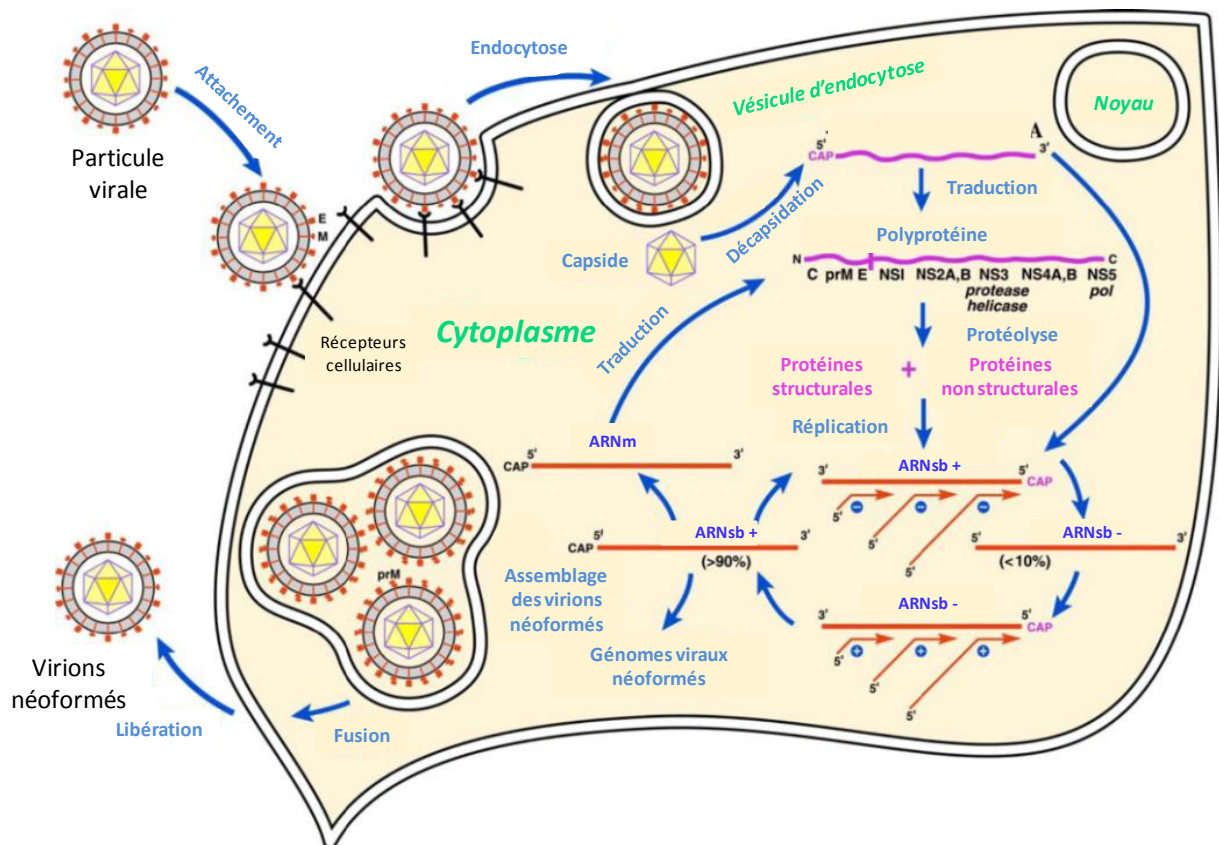


Figure 3 : Cycle de réplication du virus West Nile (adapté de SAMUEL, 2002)

c. Historique, Épidémiologie et Transmission

Le WNV a été isolé pour la première fois en 1937, en Ouganda, dans le district West Nile chez une femme présentant une fièvre inexplicée (Smithburn, 1940). Il a été ensuite retrouvé de façon endémique dans différentes régions d'Afrique (Egypte), du Moyen-Orient (Israël), d'Asie et d'Australie (WHO, 2011).

A partir des années 1990, l'épidémiologie du WNV change avec l'émergence du virus en Europe de l'Est, émergence associée à une augmentation des complications neurologiques constatées lors de l'infection. En 1999, le WNV fait son apparition sur le continent américain, à New York d'abord, puis, en moins de dix ans, dans 48 états des Etats-Unis et dans certaines régions du Canada, du Mexique, des Caraïbes jusqu'en Amérique du Sud (WHO, 2011).

Les premiers cas confirmés d'infection à WNV en France remontent à 1962. Depuis, quelques épizooties ont eu lieu sur le territoire français pouvant parfois être à l'origine de cas humains autochtones, comme en 2000. Le dernier cas humain a été observé en 2015, dans le sud de la France (Gard) (Gossner et al., 2017, Dauphin et al., 2004).

Le WNV est un arbovirus ce qui signifie qu'il a besoin d'un vecteur arthropode pour sa transmission. Ce vecteur est un moustique du genre *Culex*, notamment *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* et *C. tarsalis*. Dans la nature, le cycle se fait entre l'hôte aviaire, les oiseaux migrateurs constituant le réservoir du WNV, et le moustique vecteur. La femelle moustique hématophage se contamine en piquant un oiseau infecté pour se nourrir. Le virus se multiplie ensuite dans le tube digestif du moustique et migre jusqu'aux glandes salivaires de l'insecte. Lors des repas sanguins suivants, le moustique pourra ainsi transmettre le virus à un oiseau sain, *via* la salive contaminée (Hoover and Fredericksen, 2014) (Figure 4).

La plupart des espèces aviaires peuvent être infectées par le virus mais toutes ne vont pas développer l'atteinte neurologique qui conduira ensuite à la mort de l'animal. Lors de l'émergence du virus sur le continent nord américain, le WNV a entraîné des épidémies chez des oiseaux domestiques et des oiseaux sauvages en captivité (Canada, USA). En Europe, des cas d'atteinte neurologique chez des oiseaux sauvages ont également été rapportés (West Nile Fever, 2013).

Le maintien du virus dans la population de moustiques se fait aussi de façon verticale, par transmission de la femelle aux œufs (Hoover and Fredericksen, 2014) (Figure 4).

Un moustique infecté peut également transmettre le virus à un hôte humain ou à un autre mammifère. Il s'agit alors d'hôtes accidentels représentant un cul-de-sac évolutif pour le virus. En effet, la virémie induite lors de l'infection virale chez les mammifères n'est pas suffisante pour réinfecter un moustique et renouveler le cycle (Hoover and Fredericksen, 2014) (Figure 4).

L'hôte mammifère privilégié du virus est le cheval. L'incubation chez l'hôte équin est comprise entre 3 et 15 jours. La plupart des équidés infectés sont asymptomatiques mais ceux qui développent la maladie présentent une ataxie plus ou moins sévère, accompagnée de fièvre, de douleurs musculaires et d'une atteinte des nerfs crâniens. L'infection est fatale dans un cas sur trois (West Nile Fever, 2013). En France, les chevaux servent de sentinelles pour la mise en évidence de la circulation du virus. En effet, la surveillance saisonnière et régionale des équidés, dans le sud de la France suite à l'épizootie de 2000, est basée sur la déclaration obligatoire des encéphalites équines et sur la recherche du WNV chez les chevaux infectés (West Nile Virus, 2005).

Le virus peut également se transmettre d'Homme à Homme par contact direct avec des fluides ou des tissus contaminés. Un nombre réduit d'infections humaines se sont produites après transfusion sanguine, transplantation d'organe ou allaitement maternel (WHO, 2011) (Figure 4).

Des cas d'infections acquises au laboratoire, lors de la manipulation du virus, ont également été décrits. En effet, le WNV est un agent biologique pathogène du groupe 3, c'est-à-dire pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs. Le WNV nécessite donc une manipulation en laboratoire sécurisé NSB3 (WHO, 2011, West Nile Fever, 2013, West Nile Virus, 2005, Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes, 1994).

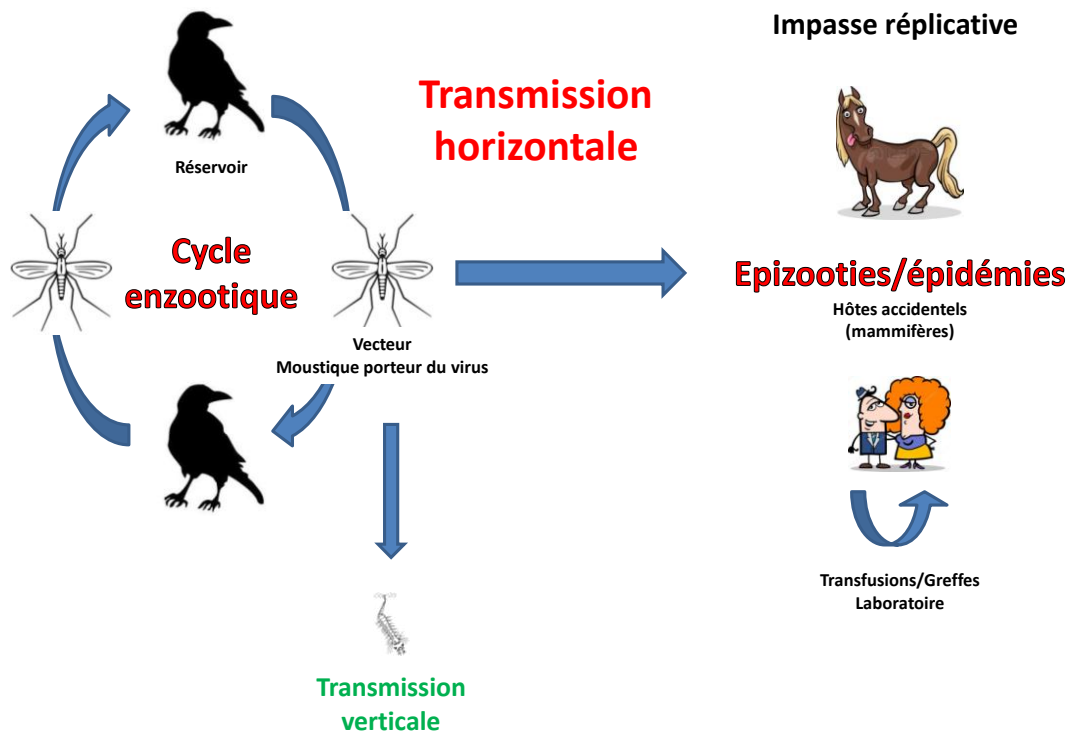


Figure 4 : Cycle de transmission du virus West Nile.

d. Manifestations cliniques

Les cas humains apparaissent généralement dans les pays tempérés entre le milieu et la fin de l'été, concomitamment à la circulation des moustiques vecteurs (Petersen et al., 2013). Les infections à WNV sont majoritairement asymptomatiques (80%) ou se manifestent sous la forme d'un syndrome pseudo-grippal, la fièvre du Nil Occidental (20%). Cependant, il existe des formes graves de l'infection avec un tableau d'encéphalite, de méningite ou de paralysie antérieure flasque (0,6%). Les personnes de plus de 50 ans, ou les immunodéprimés, sont plus susceptibles de développer une forme grave (WHO, 2011).

Depuis 1999, l'introduction du virus dans les populations naïves du continent américain a entraîné une augmentation du nombre de cas et de la sévérité de l'infection. Entre 1999 et 2013, 17000 cas présentant des complications neurologiques (méningites, encéphalites) ont été rapportés aux Etats-Unis, ainsi que 1600 décès (Hoover and Frederickson, 2014, WHO, 2011). Le WNV constitue désormais la première cause d'encéphalite épidémique aux Etats-Unis (CDC).

e. Diagnostic

Le diagnostic des infections humaines à *Flavivirus* peut se faire de façon directe ou indirecte.

Le diagnostic direct consiste à mettre en évidence la présence du virus dans les prélèvements des patients (sang total, sérum, liquide céphalo-rachidien (LCR)). Ceci est généralement fait par détection du génome viral par RT-PCR (De Filette et al., 2012, Linke et al., 2007). La biologie moléculaire permet de détecter les acides nucléiques du virus par une RT-PCR classique, nichée ou temps réel, quelque soit le lignage auquel appartient la souche virale (West Nile Fever, 2013).

Chez l'Homme, la virémie est de courte durée et peu importante. Le plus souvent, lorsque les symptômes apparaissent, la charge virale est trop faible pour que la virémie soit détectée, ce qui rend le diagnostic direct de l'infection à WNV difficile (Barzon et al., 2013). Pour avoir une chance de mettre en évidence le virus, les prélèvements doivent être faits le plus précocement possible ; idéalement dans les 5 jours suivant l'apparition des signes cliniques. Il est également possible de mettre en évidence le virus dans les urines (Barzon et al., 2013, Barzon et al., 2014).

Passé ce délai de 5 jours, le diagnostic de l'infection reste malgré tout possible. En effet, l'apparition des anticorps, 5 à 7 jours après le début des signes cliniques, permet également le diagnostic indirect de l'infection. Les IgM apparaissent dans les 2-3 jours après le début des symptômes, sont détectables généralement à partir du 5^e jour et disparaissent dans les 6 à 8 semaines. Le IgG apparaissent quelques jours après les IgM et persistent très longtemps (Rizzoli et al., 2015).

Le diagnostic est fait sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques dans le sérum ou le LCR du patient (De Filette et al., 2012). La présence d'IgM sériques isolés est en faveur d'une infection aiguë et un contrôle sur sérum, trois semaines après le premier prélèvement, permet de confirmer le diagnostic avec mise en évidence d'une séroconversion IgG.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour le diagnostic sérologique : ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), ImmunoFluorescence Indirecte (IFI) sur cellules infectées, immunocapture (IgM spécifiques) et inhibition de l'hémagglutination. Ces techniques sont assez sensibles mais manquent de spécificité. En effet, il existe de nombreuses réactions sérologiques croisées entre les différentes espèces du genre *Flavivirus*, qui, souvent, ne permettent pas le diagnostic d'espèce. Seule la séroneutralisation permet un diagnostic sûr de l'espèce incriminée mais il s'agit d'une technique difficile à mettre en œuvre limitée au Centre National de Référence (CNR) (CNR des Arbovirus, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Unité des Arbovirus, HIA Laveran, Marseille) (West Nile Fever, 2013).

D'autres méthodes, utilisées de façon plus anecdotique par les centres spécialisés ou les laboratoires de recherche, existent pour la mise en évidence du virus.

Les particules virales infectieuses peuvent être mises en évidence sur culture cellulaire. Le virus peut se répliquer dans différents types cellulaires que ce soit des lignées de cellules mammifères (Vero, RK-13), aviaires (œufs embryonnés de poulet) ou de moustiques (C6/36). Les oiseaux infectés sont des spécimens de choix pour isoler des particules virales infectieuses car le virus est retrouvé dans de nombreux tissus, notamment le cerveau, le cœur ou le foie. Dans une moindre proportion, les souches virales peuvent être récupérées à partir de moustiques ou de biopsies d'encéphale de mammifères infectés (West Nile Fever, 2013).

Enfin l'immuno-histochimie peut être utilisée pour mettre en évidence le virus dans les tissus aviaires après fixation au formol. La spécificité par rapport aux autres *Flavivirus* dépend des anticorps choisis. Dans le tissu nerveux des chevaux infectés, cette méthode a une faible sensibilité (West Nile Fever, 2013).

f. Traitement et Prévention

Il n'existe pas de traitement antiviral spécifique pour lutter contre l'infection. La prise en charge des personnes infectées repose sur le traitement symptomatique.

Depuis 2003 aux Etats Unis, des vaccins sont utilisés pour la protection des chevaux. Pour l'Homme, aucun vaccin n'existe à ce jour. La prévention repose sur la surveillance du réservoir (oiseaux) et des chevaux, et sur la lutte anti vectorielle (De Filette et al., 2012, West Nile Fever, 2013, West Nile Virus, 2005).

II. Rôles de la peau et des kératinocytes au cours de l'infection par le virus West Nile

a. Physiopathologie de l'infection par le WNV

Lors de l'infection, le WNV est inoculé dans le derme et l'épiderme, par le moustique vecteur, où le virus va se répliquer dans les kératinocytes de l'épiderme et les fibroblastes du derme, montrés *in vitro* et *in vivo* comme permissifs à l'infection. Cette réplication provoque le recrutement de cellules immunitaires, notamment des polynucléaires neutrophiles et des cellules de Langerhans. Les cellules immunitaires participent ensuite à la dissémination virale en transportant le virus au niveau des ganglions lymphatiques au sein desquels se poursuit la réplication virale. Enfin, le virus se propage par voie virémique aux différents organes cibles (foie, rate, cœur, rein et système nerveux central) (Hoover and Fredericksen, 2014).

La peau, porte d'entrée du virus, constitue un élément essentiel pour limiter sa dissémination dans l'organisme car elle est le premier rempart de défense lors de l'infection par le WNV.

b. Structure de la peau

La peau est une barrière physique qui constitue la première ligne de défense de l'organisme face aux agressions externes. Il s'agit d'un organe complexe composé de trois compartiments qui sont, du plus profond au plus superficiel, l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 5). L'hypoderme est un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé, constitué majoritairement par les adipocytes. Le derme est un tissu conjonctif composé de fibres de collagène, de fibronectine et de fibres élastiques. Ce compartiment hétérogène regroupe une grande diversité de cellules immunitaires, notamment des cellules dendritiques, des lymphocytes T CD4⁺ helper, des lymphocytes $\gamma\delta$, des lymphocytes Natural Killer, des macrophages et des mastocytes, ainsi que des fibroblastes. Dans ce compartiment, se trouvent également les vaisseaux sanguins et lymphatiques de la peau et l'innervation cutanée (Briant et al., 2014).

L'épiderme est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé composé à plus de 90% par les kératinocytes. Il se divise en quatre couches : la plus profonde est la couche basale où se trouvent les kératinocytes indifférenciés. Au fur et à mesure de leur maturation et de leur

différenciation, les kératinocytes remontent à la surface jusqu'à se transformer en cornéocytes, formant ainsi le *stratum corneum*. Les kératinocytes assurent la cohésion de l'épiderme, ont une fonction de barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur et protègent contre les radiations lumineuses. L'épiderme héberge également les mélanocytes, des cellules immunocompétentes (cellules de Langerhans, quelques lymphocytes T) et les cellules de Merkel (Briant et al., 2014, Prost-Squarcioni et al., 2005).

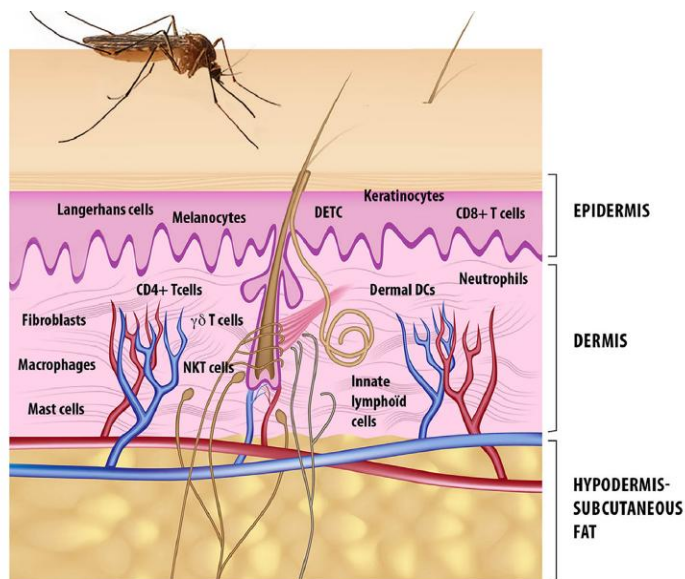


Figure 5 : Structure de la peau (BRIANT *et al*, 2014) : Schéma du tissu cutané où sont représentés les trois compartiments : l'hypoderme constitué majoritairement par les adipocytes, le derme où se trouvent les terminaisons vasculaires et nerveuses et de nombreuses cellules intervenant dans la réponse immune, et à la surface, l'épiderme composé surtout de kératinocytes, de quelques mélanocytes et de rares cellules dendritiques et lymphocytes.

c. Le kératinocyte est une cellule cible de l'infection par le WNV

Les kératinocytes sont ainsi parmi les premières cellules exposées au WNV. Il a été démontré qu'ils peuvent supporter un haut niveau de réplication virale et sont considérés comme un réservoir précoce du virus lors de l'infection (Hoover and Fredericksen, 2014). Les kératinocytes ont été identifiés à la fois *in vitro*, en culture primaire, et *in vivo*, sur des coupes histologiques réalisées chez l'Homme et la souris, comme permissifs à l'infection par le WNV (Lim et al., 2011, Paddock et al., 2006).

d. Le kératinocyte est une cellule immunitaire de première ligne

Le rôle du kératinocyte comme cellule de première ligne de défense de l'organisme au niveau cutané, capable d'initier la réponse immunitaire innée, est désormais acquis. Les kératinocytes possèdent en ce sens tout un arsenal pour détecter et combattre l'infection qu'elle soit virale ou bactérienne.

Les kératinocytes disposent de récepteurs impliqués dans la détection des pathogènes, les PRRs (Pattern Recognition Receptors), tels que les récepteurs de type RLH (RIG-I-like Helicases), RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene-I) et MDA-5 (Melanoma Differentiation Associated gene 5), la protéine-kinase R (PKR) et de nombreux récepteurs Toll-like (TLR) (TLR -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9 et -10), constituant des senseurs intracytoplasmiques (RIG-I et MDA5), extracellulaires (TLR -1 et -2) ou endosomaux (TLR-3, -7, -5 et -9), nécessaires à la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques caractéristiques des pathogènes, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Kalali et al., 2008).

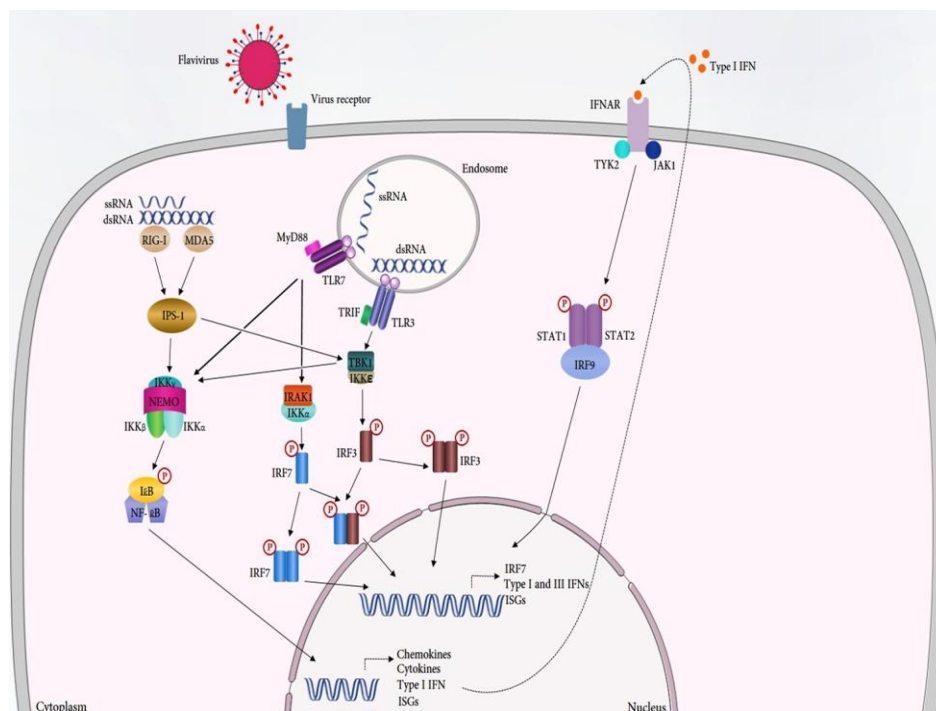


Figure 6 : Récepteurs et voies de signalisation impliqués dans la détection des *Flavivirus* lors de l'infection des kératinocytes (Garcia et al, 2017, in press). Reconnaissance des ARN viraux simple et double-brins par les récepteurs cytosoliques (MDA5 et RIG-I) et endosomaux (TLR-3 et -7), entraînant la synthèse de médiateurs inflammatoires impliqués dans la lutte contre l'infection virale.

RIG-I et MDA-5 reconnaissent ainsi les ARN double-brins présents dans le cytoplasme tandis que les TLR-3 et -7 détectent les ARN exogènes bi- et monocaténares au sein des endosomes, déclenchant la cascade de signalisation aboutissant à la synthèse d'interférons. L'implication des RLH et TLR dans la réponse antivirale au cours de l'infection par les arbovirus des tissus extra-cutanés chez l'Homme et du tissu cutané chez la souris est décrite (Aguirre et al., 2012, Welte et al., 2009).

En réponse à la détection du virus, les kératinocytes produisent de nombreuses chimiokines et cytokines (CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, CXCL-20, TNF α , IL-1 α et β , IL-6, IL-10, IL-18, IL-23 et IL-33), stimulant le recrutement de cellules inflammatoires, et sécrètent des peptides antimicrobiens (PAMs) doués de propriétés anti-infectieuses et immunomodulatrices (Nestle et al., 2009).

III. Les peptides antimicrobiens du kératinocyte

Plus de 1300 peptides antimicrobiens ont été découverts chez un grand nombre d'espèces vertébrées, invertébrées et végétales. Les peptides antimicrobiens sont de petites molécules cationiques ayant un caractère amphotère. Ils ont des structures variées, appartiennent à différentes familles et peuvent avoir des propriétés variables, notamment anti-tumorales, anti-oxydantes, insecticides, spermicides, cicatrisantes et d'inhibition enzymatique (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), mais ils ont la capacité commune de directement tuer ou inhiber la croissance des micro-organismes. Leur spectre d'activité est large. Ils sont actifs sur les bactéries, les champignons et les virus. Ils sont également impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire, innée et adaptative, et interviennent en tant que modulateurs dans l'inflammation (Lai and Gallo, 2009). Ils sont classés selon différents critères : leur origine, leur structure tridimensionnelle, l'existence de liaisons covalentes intramoléculaires, leurs propriétés, leurs fonctions biologiques ou encore leurs cibles biologiques (Wang et al., 2016).

Une vingtaine de peptides antimicrobiens ont été identifiés dans la peau chez l'Homme. Les principaux sont la cathélicidine humaine LL-37, les défensines (β -défensines 1, 2, 3), la dermcidine et des ribonucléases (RNase 7, S100A-7, -8/9, -15). Certains PAMs sont synthétisés de façon constitutive au sein du tissu cutané (dermcidine, RNase7, S100A7), d'autres sont induits en présence de stimuli (LL-37, β -défensines) tels que l'inflammation, la cicatrisation ou l'exposition aux UV. Les PAMs sont synthétisés par les différentes cellules cutanées : kératinocytes, sébocytes, monocytes-macrophages, lymphocytes T, mastocytes et cellules circulantes (polynucléaires neutrophiles, ...) (Daher et al., 1986, Niyonsaba et al., 2017).

Les kératinocytes ont la capacité de synthétiser sept peptides antimicrobiens en fonction des conditions physiopathologiques : la cathélicidine humaine LL-37, les β -défensines humaines de type 2 et de type 3, la psoriasine S100A7, la calprotectine S100A8/9, la koebnerisine S100A15 et la RNase 7 (Lai and Gallo, 2009). Leur expression au niveau de la peau est induite lors d'infection ou de blessure (Braff et al., 2005). La cathélicidine humaine LL-37 et la bêta défensine humaine de type 3 font l'objet de cette étude.

a. La LL-37

Chez l'Homme, il n'existe qu'un seul gène pour les cathélicidines, *human cathelicin antimicrobial protein* (hCAMP), codant un précurseur inactif qui est clivé par des sérines protéases (Lai and Gallo, 2009). Les cathélicidines sont composées de trois domaines : un peptide signal en position N-terminale, un domaine cathéline très conservé et un domaine C-terminal qui correspond au peptide antimicrobien. La cathélicidine humaine LL-37 a une structure en hélice α (Braff et al., 2005).

Dans un contexte d'inflammation cutanée, la sécrétion de LL-37 est induite dans les granules des mastocytes, des polynucléaires neutrophiles, des cellules *Natural Killer* (NK), dans les glandes sudoripares et dans les kératinocytes (Di Nardo et al., 2003, Frohm et al., 1997). LL-37 a une activité antimicrobienne directe et a également des propriétés chimio-attractives auxquelles sont sensibles les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T. De plus, elle stimule la prolifération des cellules endothéliales (Braff et al., 2005).

b. Les β -défensines

Les défensines sont de petites molécules peptidiques de 24 à 42 acides aminés. Leur structure est généralement en feuillet β et présente six résidus cystéine qui vont entraîner la formation de ponts disulfures. La structure et le nombre de ces ponts disulfures caractérisent trois familles de défensines : les α -, les β - et les θ -défensines. Il existe 6 α -défensines et jusqu'à 31 β -défensines humaines. Aucune θ -défensine n'a été identifiée chez l'Homme. Les β -défensines comportent trois ponts disulfures reliant les résidus cystéines 1-5, 2-4 et 3-6 (Figure 7). Il existe plus de 90 gènes différents chez l'Homme codant les β -défensines, elles sont synthétisées sous la forme d'un précurseur activé après clivage (Wilson et al., 1999).



Figure 7 : Séquence primaire de la bêta-défensine de type 3 (FENG et al, 2013)

Les principales β -défensines humaines, hBD-1 à -4, sont retrouvées dans de nombreux épithéliums, notamment cutanés et muqueux. Elles sont également exprimées par certaines cellules impliquées dans l'immunité innée : monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Au sein de l'épithélium cutané, seules hBD-1, -2 et -3 sont présentes. L'expression de hBD-1 est constitutive dans la peau, tandis que celle de hBD-2 et -3, faible au niveau physiologique, est fortement induite lors de maladies inflammatoires cutanées ou lors d'infections (Braff et al., 2005, Wilson et al., 2013).

c. Autres PAMs cutanés

La famille des protéines S100 regroupe 25 PAMs parmi lesquels certains sont retrouvés au niveau de la peau (Zhu et al., 2013). Certains sont produits par les kératinocytes comme S100A7, S100A8/9 ou encore S100A15. La psoriasine (ou S100A7) est retrouvée dans un contexte d'inflammation cutanée, notamment en cas de psoriasis, c'est d'ailleurs de là qu'elle tire son nom (Celis et al., 1990). La calprotectine S100A8/9 est un hétérodimère composé des calgranulines A (S100A8) et B (S100A9). Son expression dans les kératinocytes est induite lors de processus inflammatoires comme la cicatrisation (Thorey et al., 2001). La calprotectine a un rôle chimiotactique et, lorsqu'elle est surexprimée, elle limite la prolifération, la différenciation et la survie des kératinocytes (Voss et al., 2011, Ryckman et al., 2003). De même, la koebnerisine (S100A15), surexprimée dans le psoriasis, est connue pour son activité pro-inflammatoire et chimioattractive (Wolf et al., 2011).

La dermcidine est un PAM anionique, exclusivement présent au niveau des glandes sudoripares et sécrété *via* le canal sudoripare à la surface de la peau. La dermcidine est retrouvée uniquement chez l'Homme et ne présente pas d'homologie avec d'autres PAMs connus à ce jour (Rieg et al., 2004, Niyonsaba et al., 2017).

La RNase 7 appartient à la famille des RNase A et est exprimée de façon constitutive dans la peau. Son expression est induite dans un contexte d'inflammation ou d'infection (Harder and Schroder, 2002, Firat et al., 2014, Simanski et al., 2013).

d. Activité antivirale des PAMs cutanés

L'activité antivirale de différents PAMs cutanés a déjà été étudiée. Les PAMs peuvent avoir une action antivirale extra- ou intracellulaire (pré- ou post-fusion), directe sur la particule virale ou indirecte par modification de la cellule cible.

L'activité antivirale des défensines a été mise en évidence dans plusieurs études (Wilson et al., 2013). L'action antivirale extracellulaire des défensines se produit par interaction avec les composants de l'enveloppe virale (glycoprotéines, lipides), avec la capside du virus ou encore en entraînant une agrégation des particules virales, diminuant ainsi la capacité du virus à pénétrer dans la cellule cible (Quiñones-Mateu et al., 2003). L'activité antivirale d'hBD-3 vis-à-vis de différents virus (virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1), virus Respiratoire Syncytial (VRS), virus *Herpes simplex* (HSV) de type 2, virus de la grippe et virus de la Varicelle et du Zona (VZV)) est ainsi le fait d'un phénomène d'agrégation des particules virales, empêchant le virus d'interagir avec le récepteur cellulaire (Crack et al., 2012, Hazrati et al., 2006, Kota et al., 2008). Une autre façon, pour les défensines, d'empêcher l'entrée du virus dans la cellule cible est la fixation du peptide sur le récepteur cellulaire ou bien la modulation de son expression à la surface cellulaire. Ce mode d'action a été décrit pour HSV en présence des β -défensines 5 et 3, et des α -défensines 1 et 3 (Hazrati et al., 2006, Yasin et al., 2004). De même, il a été démontré qu'hBD-2 et hBD-3 étaient capables d'induire l'internalisation du co-récepteur CXCR-4 empêchant ainsi l'infection des lymphocytes T CD4+ par le VIH (Quiñones-Mateu et al., 2003).

Il a été montré que l'activité antivirale de la LL-37 était due à plusieurs mécanismes : (i) perforation de l'enveloppe du VIH, du VRS, du VZV, des virus de la grippe et du virus de la vaccine, (ii) inhibition de la fusion de l'enveloppe du VIH à celle de la cellule cible et (iii) diminution de l'expression membranaire d'un co-récepteur du VIH, le CXCR-4 (Quiñones-Mateu et al., 2003, Seidel et al., 2010, Wilson et al., 2013). La LL-37 peut également inhiber l'infection par le VIH-1 en interagissant avec la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase du virus bloquant le cycle intracellulaire de réplication (Wong et al., 2011). Récemment, une étude a démontré que la LL-37 semblerait inhiber l'entrée du virus de la Dengue dans la cellule (Alagarasu et al., 2017).

e. **Activité immunomodulatrice des PAMs cutanés**

Les peptides antimicrobiens peuvent également agir contre l'infection virale par immunomodulation. Les PAMs sont dotés de propriétés chimio-attractives vis-à-vis des cellules de l'immunité innée. En effet, ils sont capables de recruter ces effecteurs cellulaires grâce à leur caractère chimio-attractif propre ou bien de façon indirecte en favorisant la sécrétion de chimiokines. Par exemple, les α -défensines humaines, HNP -1 et HNP-2 (Human Neutrophil Peptide), permettent le recrutement des monocytes au site de l'inflammation, hBD-2, hBD-3 ou hBD-4 agissent plutôt sur les mastocytes (Niyonsaba et al., 2002, Yang et al., 2002, Territo et al., 1989). LL-37 a également un effet chimiotactique sur les lymphocytes T mémoires, les cellules dendritiques, les PNN et les monocytes (Yang et al., 2001).

Les PAMs ont aussi la capacité de moduler la réponse inflammatoire induite lors d'infection. Plusieurs études récentes ont montré la capacité de la LL-37 à moduler la réponse immunitaire innée antivirale. Ainsi, aux concentrations élevées rencontrées au cours de l'inflammation, la cathélicidine LL-37 potentialise la production de cytokines pro-inflammatoires et antivirales, telle que l'IFN β , induit par la détection d'ADN viral par le TLR-9, ou d'ARN bicaténaire par le TLR-3 (Takiguchi et al., 2014). La LL-37 a également la capacité d'augmenter l'expression d'IL-6 et de CXCL-8 dans des cellules bronchiques et les kératinocytes (Lai et al., 2011, Filewod et al., 2009). A l'inverse, aux concentrations physiologiques, elle altère la réponse du kératinocyte et des macrophages aux stimuli pro-inflammatoires tels que l'incubation des cellules en présence de poly (I:C), un analogue des intermédiaires de réplication viraux (Hasan et al., 2011, Filewod et al., 2009).

Pour ce qui est des β -défensines humaines, leur activité pro-inflammatoire propre a déjà été démontrée dans une étude. En effet, lorsque des kératinocytes humains étaient incubés en présence d'hBD-3, une induction de l'expression de l'IL-6, IL-10, IP-10, MCP-1 et CCL-5 était observée (Niyonsaba et al., 2007).

IV. Conclusion

Le kératinocyte de l'épiderme est une des premières cellules cibles de l'infection par le WNV, suite à son inoculation per-cutanée par le moustique vecteur, mais représente, paradoxalement, la première ligne de défense de l'organisme par la mise en œuvre d'une réponse immunitaire innée antivirale. Parmi les acteurs de cette réponse antivirale se retrouvent des peptides antimicrobiens doués de propriétés antivirales et immunomodulatrices mais dont le rôle n'a jusqu'ici jamais été étudié dans le contexte de l'infection par le WNV.

V. Objectif

L'objectif de ce travail était d'étudier les propriétés antivirales directes et indirectes immunomodulatrices de deux peptides antimicrobiens synthétisés par le kératinocyte humain, la cathélicidine humaine LL-37 et la β -défensine humaine de type 3, vis-à-vis du virus West Nile, un arbovirus autochtone en France métropolitaine et susceptible d'émergence. L'identification de nouvelles molécules disposant d'une activité anti-WNV est en effet susceptible de servir de base à de nouvelles stratégies thérapeutiques par la conception de nouveaux analogues thérapeutiques contre l'infection, curatifs ou prophylactiques, ou *via* le recours à des agonistes capables de stimuler spécifiquement leur synthèse soit localement dans la peau, pour empêcher l'établissement de l'infection, ou à distance du site d'inoculation, pour renforcer la réponse immunitaire innée de l'hôte dans le contexte d'une arbovirose déjà établie.

L'activité immunomodulatrice des PAMs du kératinocyte a tout d'abord été étudiée dans le contexte d'une stimulation de la réponse inflammatoire du kératinocyte humain par le poly (I:C), un analogue synthétique des ARN bicaténaires produits au cours du cycle de réplication virale. La cathélicidine humaine LL-37, dont les propriétés pro-inflammatoires ont déjà été démontrées dans ce contexte, a alors servi de témoin positif. Ces expérimentations ont ensuite été renouvelées au cours de l'infection des kératinocytes par le WNV permettant d'explorer les propriétés immunomodulatrices des deux PAMs étudiés jusqu'ici inconnues dans un contexte infectieux. Enfin, les propriétés antivirales de la LL-37 et d'hBD-3 ont été évaluées au cours d'une cinétique d'infection de kératinocytes primaires humains avec ajout séquentiel du peptide (avant, simultanément ou post-infection) et par incubation d'un mélange peptide-virus suivi d'une mesure du titre infectieux résiduel.

MATERIEL ET METHODES

I. Le matériel

a. Les cellules

En collaboration avec le service de chirurgie plastique du CHU de Poitiers, le LITEC récupère de la peau saine provenant des déchets opératoires de plasties abdominales ou mammaires.

Afin de récupérer les kératinocytes primaires, le tissu adipeux est d'abord retiré de la peau. La peau est ensuite rincée dans du tampon phosphate salin (PBS) stérile, découpée et placée dans la dispase à 25 U/mL, pendant une nuit à 4°C. L'épiderme est ensuite séparé du derme puis traité avec de la trypsine 1X (Gibco, ThermoFisher Scientific) pendant 15 min à 37°C. Les cellules sont filtrées (porosité de 280 µm), récupérées dans du « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) (Gibco, ThermoFisher Scientific) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et centrifugées 10 min à 450 g. Le culot de kératinocytes est récupéré dans du milieu SFM (milieu sans sérum) spécifique aux kératinocytes (Gibco, ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 25 µg/mL d'extrait pituitaire (EP) bovin (Gibco, Thermo Scientific), 0,25 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF) (Gibco, ThermoFisher Scientific) et 50 µg/mL de gentamycine (Panpharma) et mis en culture en flasque. Lorsque le tapis cellulaire a atteint 90% de confluence, les cellules sont congelées dans du milieu SFM supplémenté avec 20% de SVF (Gibco, ThermoScientific) et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde) (Sigma-Aldrich), et conservées dans de l'azote liquide.

La lignée de cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe vert africain (*Chlorocebus sp.*)), utilisée pour les titrages viraux, a été fournie par le laboratoire de virologie du CHU de Lyon. Les cellules sont entretenues en flasque dans du milieu essentiel minimum de Eagle (MEM) (Eurobio) tamponné avec de l'HEPES (17 mM) (Sigma-Aldrich) et supplémenté avec 5% de SVF et 1% de D-Glutamine (Eurobio), et incubées à 37°C. Pour la conservation dans l'azote liquide, les cellules sont mises dans un milieu de congélation composé de MEM tamponné avec de l'HEPES et supplémenté avec 10% de SVF et 8% de DMSO.

La lignée de cellules de moustique C6/36 ATCC CRL 1660, utilisée pour l'amplification de la souche virale, est entretenue à 28°C en culture dans du milieu Leibowitz (Gibco, ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 5% de SVF. Pour la conservation dans l'azote liquide, les cellules sont congelées dans du milieu Leibowitz supplémenté avec 7% de SVF et 8% de DMSO.

b. Le virus

La souche de virus West Nile, utilisée dans cette étude, a été isolée à partir d'une biopsie cérébrale prélevée chez un patient en 1997, en Tunisie. Cette souche appartient au lignage 1. Elle nous a été fournie par le CNR des Arbovirus de Marseille.

Le virus a été produit sur la lignée de cellules de moustique C6/36 cultivées dans du milieu Leibowitz supplémenté avec 5% de SVF. La suspension virale dont le titre infectieux a été déterminé par la méthode de Kärber (voir chapitre « Titrage du WNV par effet cytopathique ») à $9,3 \times 10^7$ DICT (Dose Infectieuse en Culture de Tissu)₅₀/mL sur cellules VERO, a été aliquotée sous un volume de 1 mL en cryotubes de 1,5 mL en présence de sucrose (32 %) et d'HEPES (5%), et conservée à -80°C.

c. Les peptides antimicrobiens et le poly (I:C)

La β -défensine humaine de type 3 est une protéine recombinante synthétisée par la société PeproTech. Reçue lyophilisée, elle a été mise en solution dans de l'acide acétique à 10 mM à une concentration de 500 μ g/mL, aliquotée et conservée à -20°C jusqu'à utilisation, à raison d'un aliquot par expérimentation.

La cathélicidine humaine LL-37 recombinante (InvivoGen) a été solubilisée dans de l'eau stérile pour obtenir une concentration de 1 mg/mL, aliquotée et conservée à -20°C jusqu'à utilisation, à raison d'un aliquot par expérimentation.

Le poly (I:C)-LMW « Low Molecular Weight » (poids moléculaire de 0,2 à 1 kb) (InvivoGen) a été reconstitué dans du sérum physiologique stérile à une concentration de 2 mg/mL et conservé à -20°C.

II. Les méthodes

a. Stimulation et infection des kératinocytes

Les kératinocytes ont été décongelés et ensemencés dans des plaques de 24 puits dans du milieu SFM, contenant 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco, Thermo Scientific), 25 µg/mL d'EP et 0,25 ng/mL d'EGF. Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence pour la stimulation par le poly (I:C), ou 50% pour l'infection par le WNV, un sevrage est réalisé en incubant les cellules avec du milieu SFM non supplémenté la nuit précédant l'expérimentation.

Le jour de l'expérimentation, les peptides antimicrobiens, LL-37 ou hBD-3, à des concentrations finales par puits de 0,1, 1 ou 10 µg/mL, ont été ajoutés aux puits de culture :

- non stimulés/non infectés
- simultanément au poly (I:C) à une concentration finale de 0,1 µg/mL
- 24h avant, simultanément et 6h post-infection par le WNV à une MOI de 0,1

Les plaques ont ensuite été incubées 3h et 24h en présence du poly (I:C), ou 24h et 48h lors de l'infection virale. Un puit de kératinocytes non stimulés et non infectés a servi de contrôle négatif. Les infections des kératinocytes primaires humains ont été conduites au sein du laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 du laboratoire de Virologie et Mycobactériologie du CHU de Poitiers.

La stimulation des kératinocytes par le poly (I:C) a été répétée au cours de 5 expériences indépendantes. L'infection des kératinocytes par le WNV a été répétée au cours de 7 expériences indépendantes. Pour chaque expérience, les kératinocytes utilisés provenaient d'un donneur différent.

b. Mesure des niveaux d'expression des marqueurs de la réponse inflammatoire

1. Extraction des acides nucléiques totaux à partir de la nappe cellulaire

Aux différents points de la cinétique après stimulation ou infection, le surnageant de culture a été récupéré et congelé, et les ARN extraits de la nappe cellulaire à l'aide du kit « NucleoSpin RNA II » (Marcherey-Nagel) selon les indications du fournisseur en présence d'un inhibiteur de RNase, le β -mercaptoéthanol.

La concentration d'ARN extrait a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop, ThermoScientific), en mesurant la densité optique à 260 nm et 280 nm. La quantité d'ARN a été déterminée grâce à la loi de Beer-Lambert. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à réalisation des analyses moléculaires.

2. Préparation des ADN complémentaires

La transcription inverse ou « Reverse Transcription » (RT) permet de transformer les ARN en ADN complémentaires (ADNc). Cette conversion est réalisée grâce à une transcriptase inverse (SuperScript II ; Invitrogen™, ThermoFischer Scientific).

Cette réaction a été réalisée dans un volume réactionnel total de 20 μ L contenant 1 μ g d'ARN, 1 mM de chaque desoxyribonucléotide triphosphate et 1,5 ng d'hexamères nucléotidiques de séquence aléatoire (Random primers ; Invitrogen™, ThermoFischer Scientific) permettant la transcription inverse de tous les ARN contenus dans l'échantillon. La première étape était une incubation des échantillons pendant 5 min à 65°C puis 2 min à 4°C. 4 μ L de tampon « 5X First Stand Buffer » (250 mM de Tris-HCl, pH 8,3 ; 375 mM de KCl ; 15 mM $MgCl_2$; Invitrogen™, ThermoFischer Scientific) et 2 μ L de dithiothréitol à 0,1 M ont été ajoutés au mélange réactionnel. Après une incubation de 2 min à 25°C, 100 unités de SuperScript II ont été ajoutées. La réaction s'est poursuivie pendant 60 min à 60°C puis l'enzyme a été inactivée par une phase de 15 min à 72°C. Les ADNc obtenus ont été dilués au

1/10^{ème} dans de l'eau ultrapure stérile et conservés à -20°C jusqu'à réalisation des PCR quantitatives en temps réel.

3. Quantification par PCR en temps réel

L'estimation du niveau d'expression des gènes étudiés a été réalisée par « Polymerase Chain Reaction » quantitative (qPCR) en temps réel.

Cette réaction utilisait du SYBR Green, agent intercalant fluorescent, qui va se placer dans l'ADN double-brin nouvellement synthétisé. La fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon, est mesurée à chaque cycle de PCR.

La qPCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur LightCycler480 (Roche, Applied Science) avec le kit « LightCycler 480 SYBR Green 1 Master ». Les ADNc ont été distribués dans une plaque de 96 puits en présence d'1 µM d'amorces sens et anti-sens. Les amorces ont été générées à l'aide du logiciel « Primer Blast » (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). La spécificité et la linéarité d'amplification ont été validées dans nos conditions expérimentales. Les cibles et la séquence des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau I.

La qPCR se déroule en trois étapes : activation de la Taq polymérase (ADN polymérase) (1), amplification de l'ADN en 35 cycles (2), un cycle correspondant à la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces et la polymérisation de l'ADN. Après ces 35 cycles, une étape de fusion (3) est réalisée afin de déterminer la température de fusion de chaque amplicon et de s'assurer de la spécificité de l'amplification.

Pour chaque gène et échantillon, le logiciel permet de calculer le cycle seuil (Ct), cycle à partir duquel la fluorescence émise dépasse celle du bruit de fond. L'expression relative de chaque gène est déterminée par différence du Ct de deux gènes de référence (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et ARN ribosomal 28S) avec le Ct du gène d'intérêt, pour obtenir un $\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}$. La quantité relative de chaque transcrit est donnée grâce à l'expression $2^{-\Delta Ct}$.

Gène	Séquence des amorces	
CXCL-8	sens	CTCTCTTGGCAGCCTTCCT
	anti-sens	CTCTGCACCCAGTTTTCTT
CCL-5	sens	AGCTACTCGGGAGGCTAAGG
	anti-sens	GAGGCATGCTGACTTCCTTC
IFN β-1	sens	ATTGCTCTCCTGTTGTGCTCTCC
	anti-sens	TGCGGCGTCCTCCTTCTGG
IL-28A	sens	CCAGAGATCAGGAATGAAACTAGAC
	anti-sens	AGCGACTCTTCTAAGGCATCTTT
IL-29	sens	TCACTTTACACACATCATCTTGGAT
	anti-sens	TTTTCAGCTTGAGTGACTCTTCC

Tableau I : Liste des amorces sens et anti-sens ayant servi à l'amplification des gènes codants les médiateurs de l'inflammation étudiés.

c. Mesure des niveaux de sécrétion des marqueurs de l'inflammation

Après stimulation des kératinocytes par le Poly (I:C), en présence et en l'absence des peptides antimicrobiens étudiés, les surnageants de culture ont été collectés et congelés à -20°C.

La concentration en CXCL-8 a été mesurée par méthode ELISA. Le dosage de CXCL-8 a été réalisé à l'aide d'une trousse commercialisée par la société PeproTech (Human IL-8 Standard ELISA Development Kit). La densité optique des puits des plaques ELISA a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Infinity F50, Tekan) et interprétée grâce au logiciel Magellan (Tekan).

d. Quantification de la charge virale

Après 24 et 48h d'infection des kératinocytes par le WNV, 200 μ L de surnageant de culture ont été prélevés et ajoutés à un tampon de lyse (Nuclisens® EasyMag® « Buffer lysis », bioMérieux) afin de neutraliser le pouvoir infectieux du virus avant la sortie des échantillons du laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. L'extraction des acides

nucléiques totaux (ARN et ADN) a ensuite été réalisée sur l'automate NucliSENS® EasyMAG® (bioMérieux) selon les recommandations du fournisseur.

La RT-PCR, en temps réel et en une étape, de quantification du WNV a été réalisée à partir des extraits d'acides nucléiques totaux obtenus des surnageants de culture.

Le mélange réactionnel de RT-PCR de 20 µL était constitué de 12,5 µL de Master Mix (SuperScript III platinum One-step quantitative RT-PCR ; Invitrogen™ ThermoFischer Scientific), 5 pmol d'amorces sens (séquence 5'-3' GTGCGGTCTACGATCAGTTT) et anti-sens (séquence 5'-3' CACTAAGGTCCACACTTCTC) complémentaires spécifiques de notre souche virale, 2,5 pmol de sonde TaqMan West Nile marquée 5'FAM et 3'Dark Quencher (séquence 5'-3' AATGTGGAAGCAGTGAAGGACGA), 0,5 µL de transcriptase inverse Superscript III Platinum (Invitrogen™ ThermoFischer) et ADN polymérase Platinum *Taq* (Invitrogen™ ThermoFischer).

La gamme d'étalonnage a été réalisée par des dilutions décimales d'un transcrit synthétisé à partir d'un plasmide contenant le génome du WNV, à l'exception des gènes codant les protéines structurales, fourni par le Dr PW Mason (Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch (UTMB), Galveston, Texas, USA) (Rossi et al., 2005). Les ARN synthétiques ainsi obtenus ont été dilués afin de préparer une gamme d'étalonnage permettant la quantification absolue de charges virales de concentrations comprises entre 10^2 et 10^7 copies d'ARN.

Chaque échantillon, y compris les points de la gamme d'étalonnage, a été analysé en duplicate. L'analyse a été réalisée sur un appareil Applied Biosystems 7500 (Applied biosystems, ThermoFisher Scientific).

e. Détermination du titre infectieux

Pour déterminer le titre infectieux de la suspension virale utilisée au cours des infections de kératinocytes et évaluer l'effet antiviral direct des peptides antimicrobiens, une mesure de la dilution limite, à laquelle 50% des cupules d'une plaque 96 puits inoculées par des dilutions décimales du WNV présentant un effet cytopathique, a été réalisé sur cellules Vero, suivi d'un calcul du titre infectieux par la méthode de Kärber.

Les plaques de titrage ont été préparées la veille de l'infection. Elles étaient constituées de cellules Vero, ensemencées dans des plaques de culture de 96 puits à une densité de 4000 cellules par puits, en présence de DMEM supplémenté à 2% de SVF.

Après 24h d'incubation, la suspension virale a été diluée de 10 en 10 dans du DMEM contenant 2% de SVF puis déposée sur les cellules Vero.

Les titrages ont été lus après 4 jours d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂. Les puits des plaques dans lesquels les cellules présentaient un effet cytopathique visible (cellules dégénérées) ont été considérés comme positifs à l'infection virale. Le titre de la suspension virale a ensuite été déterminé en DICT₅₀ par mL selon la méthode de Kärber :

$$\text{DICT}_{50} = \log(X_0) + \log(R)/2 - \log(R) \times \sum(\text{puits pos}/\text{puits tot})$$

$$\text{Titre viral} = 10^{(-\text{DICT}_{50})} \times 1000 / 100$$

$$\text{Titre exprimé en } 10^X \text{ DICT}_{50}/\text{mL}$$

X₀ : dernière dilution où tous les puits sont positifs

R : Raison entre deux puits (facteur de dilution). Dans notre cas, R = 10.

Puits pos/puits tot : rapport entre le nombre de puits positifs d'une même dilution sur le nombre total de puits de la dilution.

Σ(puits pos/puits tot) : somme des rapports depuis X₀.

f. Mesure de l'activité antivirale directe des PAMs

La recherche d'éventuelles propriétés antivirales de la LL-37 et d'hBD-3 sur la réplication du WNV a été réalisée selon deux méthodologies différentes :

- L'infection de kératinocytes primaires humains par le WNV à une MOI de 0,1, en présence de chacun des deux peptides, à des concentrations finales de 1 et 10 µg/mL, ajoutés au milieu de culture (i) 24h avant l'infection (AI), (ii) au moment de l'infection et (iii) 6h post-infection (PI). La réplication du WNV a été évaluée à trois temps (0, 24 et 48h) en mesurant la charge virale par RT-PCR quantitative dans le surnageant des kératinocytes infectés.

- L'incubation de 2h, à 37°C, d'un inoculum défini de virus 2,0x10⁴ DICT₅₀/mL en présence de LL-37 et d'hBD-3 à des concentrations de 1, 10 et 40 µg/mL (volume total de la

suspension : 750 μ L). Le titrage de la suspension virale, en présence et en l'absence des peptides, a été ensuite réalisé sur cellules Vero.

g. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad (Prism, version 5). Les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes indiquant la moyenne $\pm$ les écart-types. L'analyse statistique de la significativité des résultats a été établie avec un test non paramétrique entre deux groupes appariés (Wilcoxon). Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$ et non significatives dans le cas contraire.

RESULTATS

I. Etude des effets immunomodulateurs des peptides antimicrobiens

Les propriétés immunomodulatrices des PAMs ont été étudiées sur des kératinocytes à l'état basal puis dans un contexte de stimulation par le poly (I:C) et d'infection par le WNV. Une étude transcriptomique de l'expression de cinq marqueurs de l'inflammation, CCL-5, CXCL-8, IFN β -1, IL-28A et IL-29, a été menée par RT-PCR quantitatives à partir de la nappe cellulaire, en présence des peptides seuls, pour évaluer leur activité pro-inflammatoire propre, puis dans les deux contextes de stimulation (poly (I:C)) et d'infection (WNV), en l'absence, et en présence, de chacun des deux peptides étudiés. Cette étude transcriptomique a été complétée d'une analyse protéomique par méthode ELISA de la sécrétion de CXCL-8 dans le surnageant de culture de kératinocytes stimulés par le poly (I:C).

a. Evaluation de l'activité pro-inflammatoire de la LL-37 et d'hBD-3 sur des kératinocytes primaires humains à l'état basal

L'effet des peptides sur l'expression basale des médiateurs inflammatoires par les kératinocytes a tout d'abord été étudié. Aucune différence significative n'a été observée entre le niveau d'expression des 5 chimiokines/cytokines pro-inflammatoires sélectionnées (CCL-5, CXCL-8, IFN β -1, IL-28A et IL-29) dans les kératinocytes non stimulés (contrôle) et dans les kératinocytes incubés en présence de la LL-37 aux trois concentrations testées de 0,1, 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ et d'hBD-3 aux concentrations de 0,1 et 1 $\mu\text{g/mL}$ après 3 et 24h d'incubation (Annexe 1, Figure S1). En revanche, un effet pro-inflammatoire propre d'hBD-3 à la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ a été observé. L'expression de CXCL-8, après 3h d'incubation en présence d'hBD-3 à 10 $\mu\text{g/mL}$, était quatre fois supérieure à celle des kératinocytes non stimulés (Annexe 1, Figure S1a). Cette tendance était également observée pour l'expression de l'IL-29 et CCL-5, majorée respectivement d'un facteur 3 et d'un facteur 4 après 3h et 24h d'incubation en présence d'hBD-3 à la plus forte concentration (Annexe 1, Figure S1b et e).

b. Evaluation de l'activité pro-inflammatoire du poly (I:C) sur les kératinocytes primaires humains

Le poly (I:C) ou acide polyinosinique-polycytidylique est un ARN double brin synthétique utilisé pour mimer les intermédiaires de réplication bicaténaires viraux. En effet, au cours du cycle de réplication des virus à ARN non rétrovirus, des ARN double brin, constitués de formes réplcatives (hybride entre l'ARN génomique viral de polarité positive et un brin d'ARN de polarité négative complémentaire néosynthétisé) et d'intermédiaires de réplication (brin d'ARN de polarité négative servant à son tour de matrice à la synthèse simultanée de multiples brins d'ARN génomique de polarité positive constituant des ARN partiellement bicaténaires) sont synthétisés dans le cytoplasme de la cellule infectée. Agoniste connu du TLR3, nous avons étudié l'expression des médiateurs inflammatoires CCL-5, CXCL-8, IFN β -1, IL-28A et IL-29 par les kératinocytes en présence de poly (I:C).

Après 3h de stimulation, l'induction de l'IFN β -1 et de l'IL-28A a été mise en évidence dans les kératinocytes incubés avec le poly (I:C) à 0,1 μ g/mL, par rapport aux kératinocytes non stimulés (contrôle). Leur expression était respectivement multipliée par 37 et 16 en présence de poly (I:C). L'expression de CXCL-8 et CCL-5 n'était, en revanche, multipliée que par 1,6 et 2,3 dans les kératinocytes stimulés par rapport au contrôle. (Figure 8).

Après 24h d'incubation, les résultats montraient une induction significative de CXCL-8 (x15), CCL-5 (x457), IFN β -1(x9), IL-28A (x19) et IL-29 (x54) par rapport au contrôle (Figure 8).

En résumé, le pic d'expression des ARNm codant l'IFN β -1 et l'IL-28A induit par le poly (I:C) était mesuré après 3h de stimulation tandis celui de CCL-5, CXCL-8 et de l'IL-29 était objectivé après 24h de stimulation (Figure 8). Ces premières données ont ensuite guidé les temps d'analyse de ces mêmes marqueurs inflammatoires en présence des PAMs.

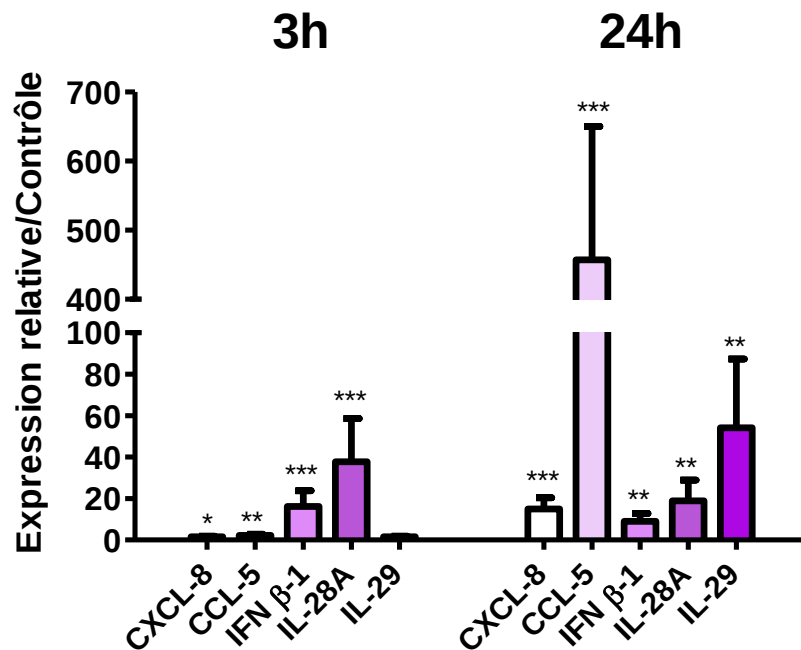


Figure 8 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de cinq marqueurs inflammatoires en présence de poly (I:C). Sont représentées les quantités relatives de transcrits codant CXCL-8, CCL-5, IFN β -1, IL-28A et IL-29, dans des kératinocytes primaires humains, incubés en présence de poly (I:C) à 0,1 μ g/mL, pendant 3h et 24h par comparaison au contrôle, qui correspond à des kératinocytes non stimulés. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage (GAPDH et 28S). Les données présentées correspondent à la moyenne et à l'écart type de 5 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées aux kératinocytes non stimulés, par un test de Wilcoxon (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

c. Evaluation de l'action immunomodulatrice des PAMs sur la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C)

La troisième étape fut d'étudier l'expression des médiateurs inflammatoires, après 3 et 24h de stimulation des kératinocytes par le poly (I:C) à 0,1 μ g/mL, en présence des deux peptides LL-37 et hBD-3, testés à trois concentrations de 0,1, 1 et 10 μ g/mL.

1. Activité immunomodulatrice de la LL-37

Après 3h de stimulation, la LL-37 à forte concentration (10 μ g/mL) augmentait de manière significative, entre 4,5 et 10 fois, l'expression induite par le poly (I:C), des cinq marqueurs étudiés (Figure 9). Cette modulation de l'induction était également retrouvée pour l'expression de CXCL-8 (x4 à 5), CCL-5 (x2 à 3), IFN β -1 (x3 à 5) et IL-28A (x3 à 8) après

3h de stimulation, en présence des plus faibles concentrations de LL-37 (0,1 et 1 $\mu\text{g/mL}$). (Figure 9).

Après 24h de stimulation, la majoration de la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C) n'était observée qu'en présence de LL-37 à forte concentration (10 $\mu\text{g/mL}$) et pour les cinq marqueurs : CXCL-8 et CCL-5 (x4), IFN β -1 (x2), IL-28A (x11) et IL-29 (x2) (Figure 10). Aux concentrations de 0,1 et 1 $\mu\text{g/mL}$, aucun rôle pro-inflammatoire de la LL-37 n'était mis en évidence.

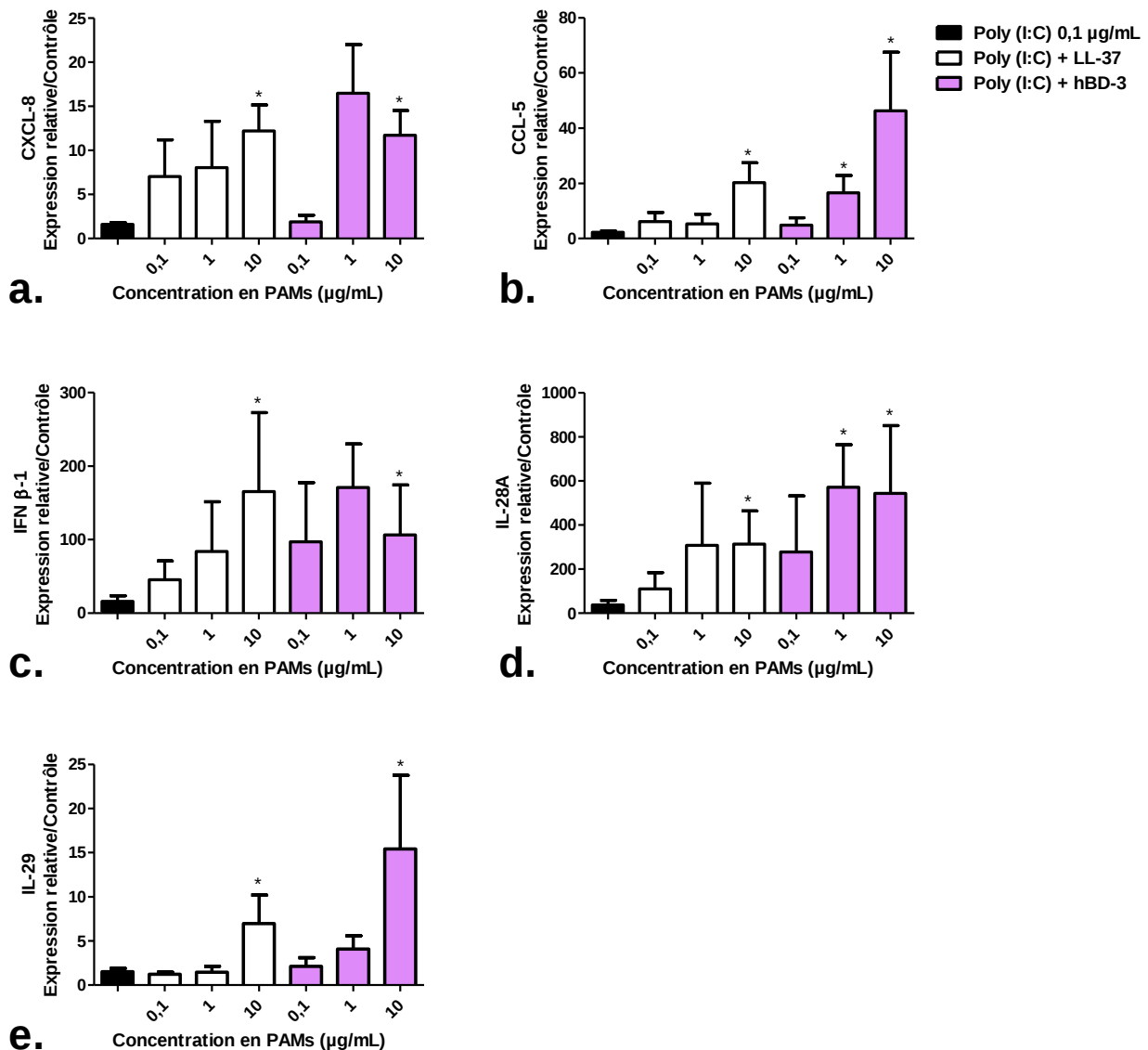


Figure 9 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de marqueurs de l'inflammation induite par le poly (I:C) en présence ou en l'absence de LL-37 et d'hBD3. Sont représentées les quantités relatives de transcrits codants CXCL-8 (a.), CCL-5 (b.), IFN β -1 (c.), IL-28A (d.) et IL-29 (e.) dans des kératinocytes primaires humains stimulés par du poly (I:C) (0,1 $\mu\text{g/mL}$) et incubés en présence de LL-37 et hBD-3, à des concentrations de 0,1, 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$, pendant 3h par comparaison au contrôle, qui correspond à des kératinocytes non stimulés. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 5 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées à l'expression des gènes dans des kératinocytes stimulés par le poly (I:C) seul, par un test de Wilcoxon (* $p < 0,05$).

2. Activité immunomodulatrice d'hBD-3

Après 3h d'incubation, l'expression des chimiokines, CCL-5 et CXCL-8, induite par le poly (I:C), était augmentée en présence d'hBD-3. Pour CXCL-8, l'induction était multipliée d'un facteur variant de 7 (à 10 µg/mL d'hBD-3) à 10 (à 1 µg/mL) par rapport aux kératinocytes incubés en présence du poly (I:C) seul (Figure 9a). Pour CCL-5, cette induction semblait croître avec la concentration en peptide, de 2 (0,1 µg/mL) à 20 fois (10 µg/mL) (Figure 9b). De même, l'expression de l'interféron β -1 et de l'IL-28A était augmentée en présence d'hBD-3. L'expression de l'IFN β -1 était ainsi 6 fois majorée à la plus faible des concentrations testées (0,1 µg/mL) et 10 fois à une concentration 10 fois supérieure de peptide (1 µg/mL) (Figure 9c). L'expression de l'IL-28A suivait la même tendance, avec une augmentation des niveaux d'expression des gènes comprise entre 8 fois, à 0,1 µg/mL, et 15 fois à 1 et 10 µg/mL (Figure 9d). L'expression de l'IL-29, peu stimulée par la présence du poly (I:C) seul, était majorée de 3 à 10 fois en présence des deux plus fortes concentrations d'hBD-3 (Figure 9e).

Après 24h de stimulation, l'induction de CCL-5 et de CXCL-8 par le poly (I:C) était comparable en présence et en l'absence d'hBD-3 quelles que soient les concentrations testées (Figure 10a et b). Pour l'IFN β -1 et l'IL-28A, la majoration de l'expression induite par les PAMs était moins importante après 24h de stimulation qu'après 3h. L'expression de l'IFN β -1 et de l'IL-28A était respectivement augmentée de 6 et 11 fois en présence d'hBD-3 à forte concentration (10 µg/mL) par rapport à l'expression induite par le poly (I:C) seul. L'induction de l'IFN β -1 n'était pas modifiée aux autres concentrations d'hBD-3 tandis que l'expression de l'IL-28A n'était que légèrement majorée d'un facteur compris entre 2 et 4 (Figure 10c et d).

Enfin, l'expression de l'IL-29 induite par le poly (I:C), observée principalement après 24h de stimulation, était augmentée par les faibles concentrations en hBD-3 de 0,1 (x3) et 1 µg/mL (x2,5) mais paradoxalement réprimée à forte concentration (Figure 10e).

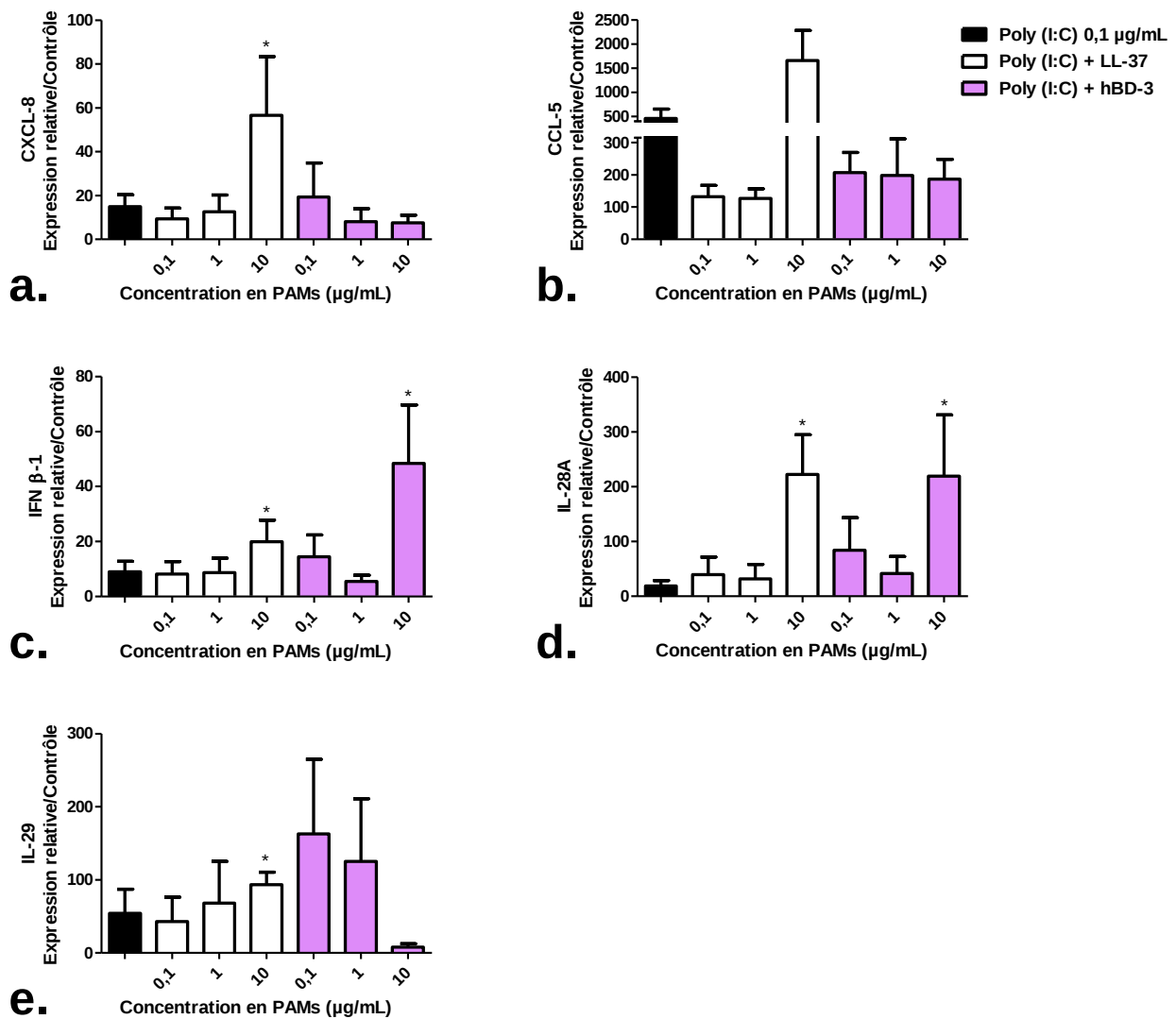


Figure 10 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de CXCL-8, CCL-5, IFN β-1 et IL-28A induite par le poly (I:C) en présence ou en l'absence de LL-37 et d'hBD3. Sont représentées les quantités relatives de transcrits codants CXCL-8 (a.), CCL-5 (b.), IFN β-1 (c.), IL-28A (d.) et IL-29 (e.) dans des kératinocytes primaires humains stimulés par du poly (I:C) (0,1 μg/mL) et incubés en présence de LL-37 et hBD-3, à des concentrations de 0,1, 1 et 10 μg/mL, pendant 24h par comparaison au contrôle, correspondant à des kératinocytes non stimulés. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 5 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées à l'expression des gènes dans des kératinocytes stimulés par le poly (I:C) seul, par un test de Wilcoxon (*p<0,05).

Pour résumer, notre modèle de stimulation de la réponse inflammatoire du kératinocyte primaire humain par le poly (I:C) a permis de confirmer les propriétés immunomodulatrices déjà connues de la cathélicidine humaine. Une majoration de l'expression des marqueurs inflammatoires étudiés a en effet été observée en présence de ce peptide.

La validation de notre modèle d'étude nous a ensuite permis d'évaluer l'effet d'hBD-3 sur la réponse inflammatoire de kératinocytes stimulés par le poly (I:C). Nous avons ainsi mis en évidence les propriétés pro-inflammatoires d'hBD-3, principalement à forte concentration.

d. Etude de la sécrétion de CXCL-8 par les kératinocytes stimulés par le poly (I:C) en présence de LL-37 et d'hBD-3

Afin de compléter l'évaluation de l'action immunomodulatrice des PAMs sur la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C), l'analyse de la sécrétion de CXCL-8 a été réalisée par la quantification par méthode ELISA de la protéine dans le surnageant de culture des kératinocytes stimulés par le poly (I:C) à 0,1 µg/mL en présence de LL-37 et d'hBD-3, à 0,1, 1 et 10 µg/mL, après 24h et 48h d'incubation.

1. Niveau basal de sécrétion de CXCL-8 par les kératinocytes humains primaires

Après 24h et 48h de culture, le niveau basal de sécrétion de CXCL-8 dans le surnageant de culture des kératinocytes non stimulés par le poly (I:C) était respectivement d'environ 120 et 220 pg/mL (Figure 11a).

2. Sécrétion de CXCL-8 par les kératinocytes humains primaires en présence de LL-37 et d'hBD-3

L'incubation des kératinocytes en présence des PAMs seuls, à une concentration de 0,1 ou 1 µg/mL, se traduisait par une sécrétion de CXCL-8 similaire au niveau basal identifié chez les kératinocytes non stimulés. Cependant, à une concentration en peptide de 10 µg/mL, une augmentation de la sécrétion en CXCL-8 était observée par rapport aux cellules non stimulées (x2-9 pour les deux peptides), quel que soit le temps d'incubation (Figure 11a).

3. Sécrétion de CXCL-8 par les kératinocytes humains primaires après stimulation par le poly (I:C)

Les données après 24h d'incubation étant comparables à celles obtenues à 48h, seules ces dernières seront présentées pour toute l'étude protéique.

La stimulation des kératinocytes avec le poly (I:C) à 0,1 $\mu\text{g/mL}$ multipliait la production basale de CXCL-8 par 3,5 (730 pg/mL vs. 220) après 48h d'incubation (Figure 11b).

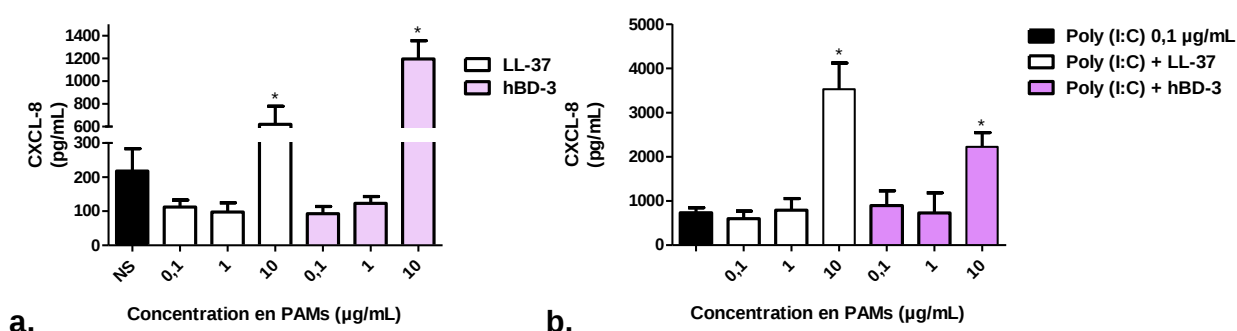


Figure 11 : Sécrétion de CXCL-8 par des kératinocytes primaires humains en présence de LL-37 et d'hBD-3. Sont représentées les concentrations en CXCL-8 dans le surnageant de kératinocytes primaires non stimulés (NS) (a.) et de kératinocytes primaires stimulés avec du poly (I:C) (0,1 $\mu\text{g/mL}$) (b.), incubés pendant 48h, en présence ou en l'absence de LL-37 et d'hBD-3 à 0,1, 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats sont exprimés en pg/mL. Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 5 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées à un contrôle correspondant à des kératinocytes non stimulés (NS), par un test de Wilcoxon (* $p < 0,05$).

4. Sécrétion de CXCL-8 par les kératinocytes humains primaires stimulés par le poly (I:C) en présence et en l'absence des PAMs

Après 48h, la sécrétion dans le surnageant de culture de CXCL-8 induite par le poly (I:C) n'était pas augmentée en présence des peptides aux plus faibles concentrations (0,1 et 1 $\mu\text{g/mL}$). Seule la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$, quel que soit le peptide, majorait de façon

significative la sécrétion de CXCL-8 dans le surnageant des cellules stimulées, d'un facteur 5 pour la LL-37 et d'un facteur 3 pour hBD-3 (Figure 11b).

e. Evaluation de l'action immunomodulatrice des PAMs sur la réponse inflammatoire du kératinocyte induite par l'infection par le WNV

L'expression des médiateurs de l'inflammation a enfin été étudiée à 24h et 48h de l'infection des kératinocytes par le WNV à une MOI de 0,1, en présence ou en l'absence de LL-37 et d'hBD-3, aux concentrations de 1 et 10 µg/mL.

1. Infection de kératinocytes primaires humains par le virus West Nile

Lors de l'infection des kératinocytes par le WNV (MOI = 0,1), la charge virale augmentait d'environ 1 log après 24h et de 2,5 log après 48h. La charge virale était donc amplifiée au cours du temps, ce qui nous a permis d'étudier la réponse inflammatoire des kératinocytes dans le contexte d'une infection répliquative par le WNV (Figure 12).

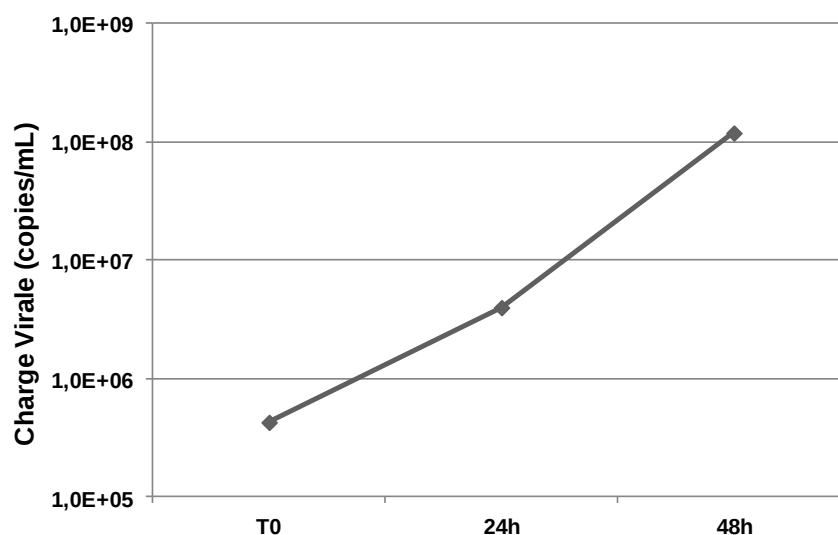


Figure 12 : Réplication du WNV dans des kératinocytes primaires humains. La charge virale a été mesurée par RT-PCR quantitative dans le surnageant de kératinocytes infectés par le WNV (MOI = 0,1), au moment de l'infection (T0), après 24h et 48h d'infection. Les données correspondent à la moyenne de 7 expériences indépendantes.

2. Réponse inflammatoire des kératinocytes primaires humains à l'infection par le virus West Nile

Après 24h d'infection, l'infection par le WNV induisait l'expression de CXCL-8 (x5), de CCL-5 (x6), d'IFN β -1 (x14), d'IL-28A (x24) et d'IL-29 (x7) par rapport aux kératinocytes non infectés (contrôle) (Figure 13).

Après 48h d'infection, l'induction de CCL-5 (x25) et d'IL-28A (x66) était plus importante qu'après 24h. Pour les autres marqueurs, elle était similaire à celle observée à 24h (Figure 13).

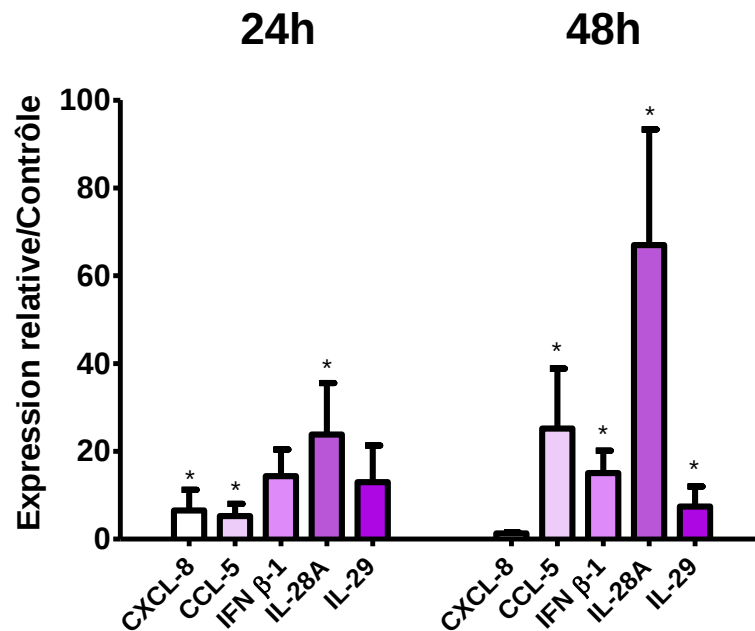


Figure 13 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de cinq marqueurs inflammatoires lors de l'infection de kératinocytes primaires humains. Sont représentées les quantités relatives de transcrits codant CXCL-8, CCL-5, IFN β -1, IL-28A et IL-29, dans des kératinocytes primaires humains infectés par le virus West Nile (MOI = 0,1), pendant 24h et 48h par comparaison au contrôle, correspondant à des kératinocytes non stimulés. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage (GAPDH et 28S). Les données présentées correspondent à la moyenne et à l'écart type de 7 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées au contrôle par un test de Wilcoxon (* $p < 0,05$).

3. Réponse inflammatoire des kératinocytes primaires humains infectés par le virus West Nile en présence de LL-37

Après 24h d'infection virale en présence de LL-37, l'expression des marqueurs de l'inflammation induite par l'infection virale seule était multipliée par 2,5 pour l'IFN β -1 et par 2, pour CXCL-8, aux concentrations respectives de 1 et de 10 μ g/mL. La LL-37 ne majorait pas l'expression des autres marqueurs inflammatoires induite par l'infection par le WNV (Figure 14).

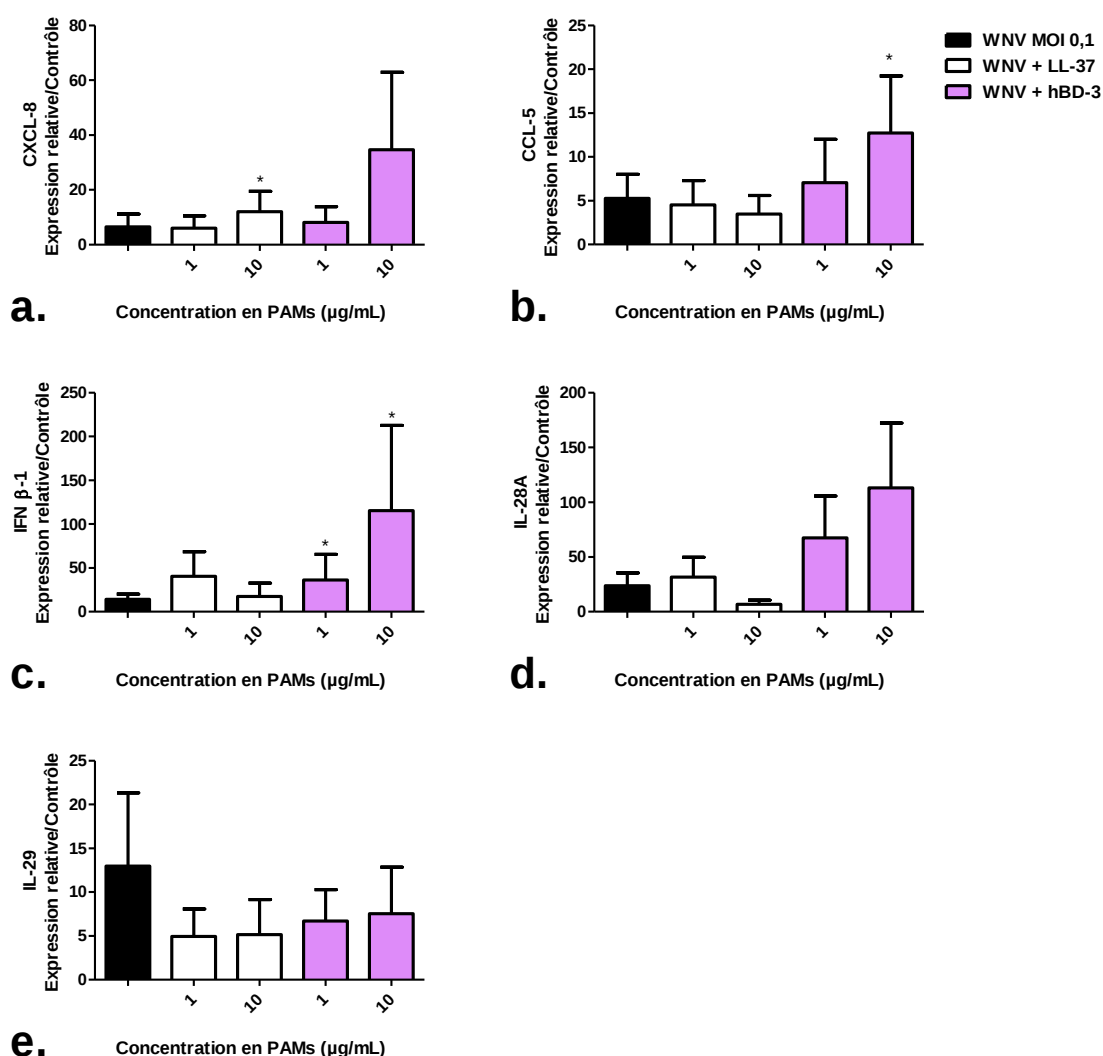


Figure 14 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des ARNm codant des marqueurs de l'inflammation au cours de l'infection par le WNV, en présence ou en absence de LL-37 et d'hBD-3. Sont représentées les quantités relatives de transcrits codants CXCL-8 (a.), CCL-5 (b.), IFN β -1 (c.), IL-28A (d.) et IL-29 (e.) dans des kératinocytes primaires humains infectés par le WNV (MOI = 0,1) et incubés pendant 24h, en présence de LL-37 et hBD-3 à 1 et 10 μ g/mL par comparaison au contrôle, correspondant à des kératinocytes non stimulés. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage cellulaires (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 7 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées à l'expression du même gène dans des kératinocytes infectés par le WNV seul, par un test de Wilcoxon (* $p < 0,05$).

Après 48h, l'induction due à l'infection était majorée d'un facteur variant de 2 à 8 pour CXCL-8, de 2,5 fois pour CCL-5, de 3 pour IFN β -1 et IL-28A. Pour l'IL-29, LL-37 ne majorait pas l'induction de l'expression induite par le virus (Figure 15).

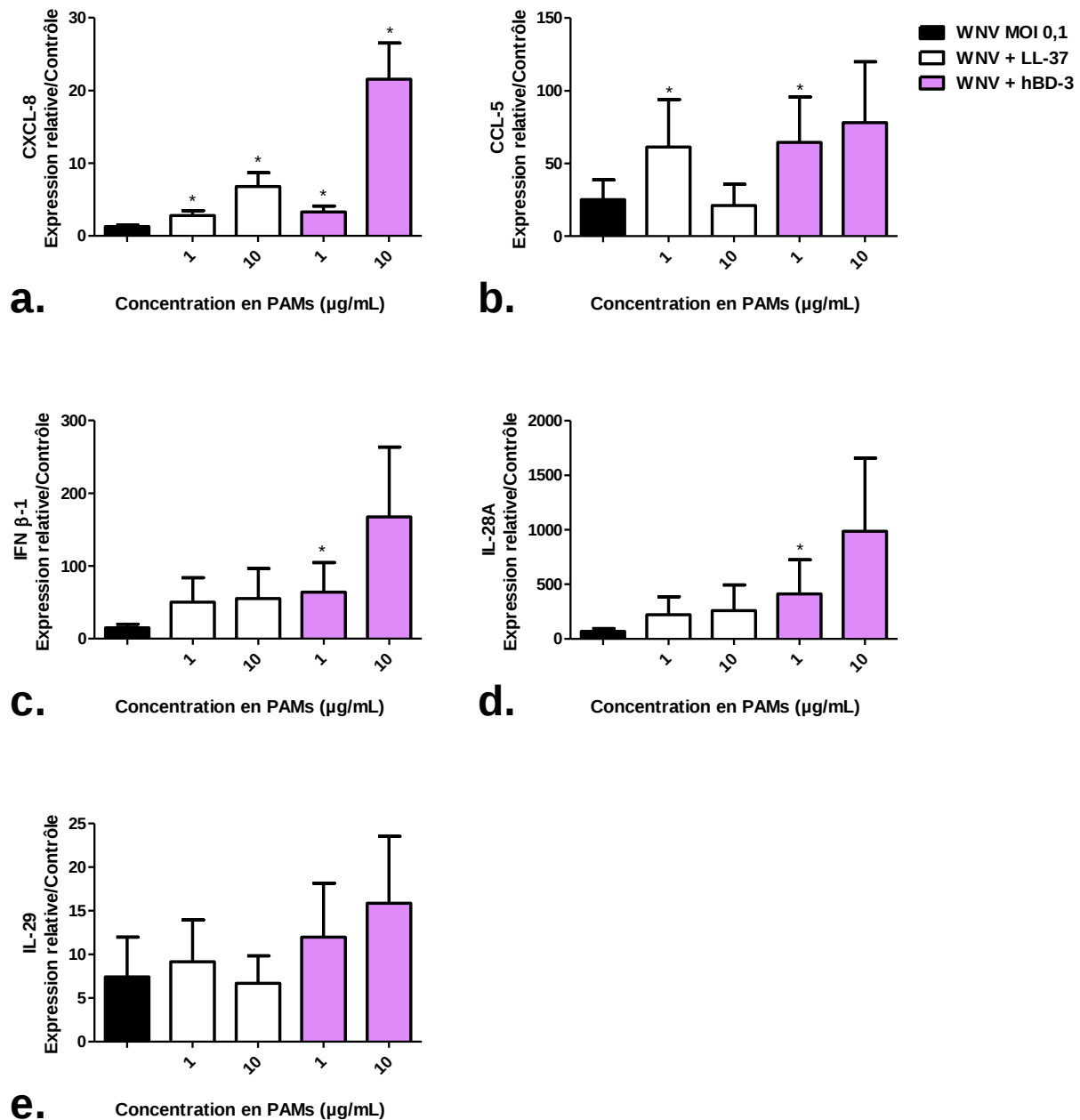


Figure 15 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des ARNm codant les marqueurs de l'inflammation au cours de l'infection par le WNV, en présence ou en absence de LL-37 et d'hBD-3. Sont représentées les quantités relatives de transcrits codants CXCL-8 (a.), CCL-5 (b.), IFN β -1 (c.), IL-28A (d.) et IL-29 (e.) dans des kératinocytes primaires humains infectés par le WNV (MOI = 0,1) et incubés pendant 48h, en présence de LL-37 et hBD-3 à 1 et 10 μ g/mL par comparaison au contrôle, correspondant à des kératinocytes non stimulés. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage cellulaires (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 7 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées à l'expression du même gène dans des kératinocytes infectés par le WNV seul, par un test de Wilcoxon (* $p < 0,05$).

4. Réponse inflammatoire des kératinocytes primaires humains infectés par le virus West Nile en présence d'hBD-3

L'expression des chimiokines CCL-5 et CXCL-8 induite après 24h d'infection par le WNV était, respectivement, multipliée par 2 et par 6 en présence d'hBD-3 à forte concentration (10 µg/mL). Pour ce qui est des interférons, l'expression de l'IL-28A était multipliée par 3 à 1 µg/mL d'hBD-3 et celle de l'IFN β-1 par 5 à 1 µg/mL et par 8 à 10 µg/mL (Figure 14).

De même, en présence d'hBD-3, l'expression de CCL-5 était multipliée 3 fois, celle de CXCL-8 de 3 à 20 fois, celle d'IFN β-1 de 4 à 10 fois et celle d'IL-28A de 6 à 15 fois. L'induction d'IL-29 était quant à elle uniquement majorée à une concentration en hBD-3 de 10 µg/mL après 48h d'infection (Figure 15).

En conclusion, l'incubation des kératinocytes en présence d'hBD-3, quelle que soit sa concentration, augmentait l'induction de l'expression des marqueurs inflammatoires induite par l'infection virale seule.

II. Etude des effets antiviraux de LL-37 et d'hBD-3 sur le virus West Nile

a. Etude des effets antiviraux au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains par le WNV

Afin d'étudier d'éventuelles propriétés antivirales de la LL-37 et d'hBD-3, la réplication du WNV a été monitorée lors d'une infection, à une MOI de 0,1, de kératinocytes primaires humains en présence de chacun des deux peptides à une concentration finale de 1 et 10 µg/mL.

Trois conditions d'incubation en présence des peptides ont été testées : (i) ajout du peptide au milieu de culture des kératinocytes 24h avant l'infection (AI), (ii) ajout du peptide au moment de l'infection, simultanément au virus, et (iii) ajout du peptide 6h post-infection (PI). La réplication virale a été évaluée à trois temps (0, 24 et 48h) en mesurant la charge virale par RT-PCR quantitative dans le surnageant des kératinocytes infectés.

L'amplification de la charge virale par rapport au T0 d'infection des cellules ($10^{5,6}$ copies/mL) était de 1 log ($10^{6,6}$ copies/mL) à 24h, et 2,5 log (10^8 copies/mL) à 48h post-infection, en l'absence de PAMs (Figure 16).

Après 24h, la réplication virale était similaire que le virus soit incubé seul ($10^{6,6}$ copies/mL) ou en présence de LL-37 ($10^{6,7}$ copies/mL) et d'hBD-3 ($10^{7,3}$ copies/mL) à une concentration de 1 µg/mL, quel que soit le temps d'ajout du peptide aux cellules (Figure 16).

A une forte concentration en PAMs (10 µg/mL), la réplication virale était diminuée par rapport au témoin positif (virus incubé seul). En effet, en présence de LL-37 quel que soit le temps d'ajout, une charge virale équivalente à 24h post-infection à celle du T0, environ $10^{5,6}$ copies/mL, était observée. Pour hBD-3, un ajout du peptide 24h AI ou 6h PI était également responsable d'une réduction de la charge virale par comparaison au témoin positif (Figure 16).

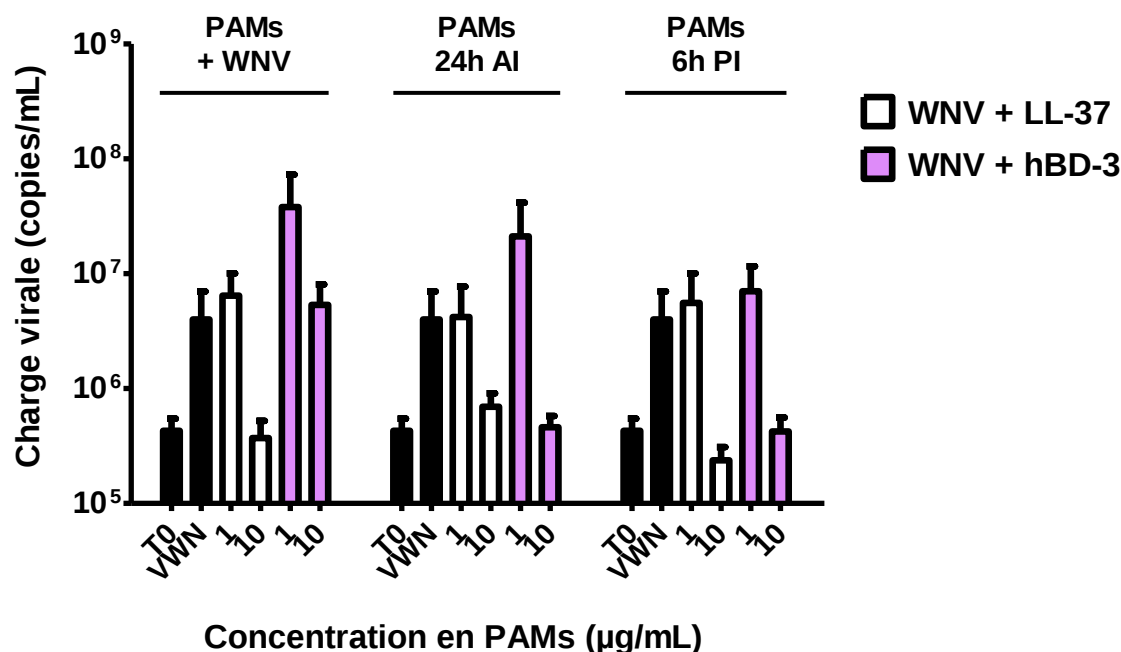


Figure 16 : Réplication du WNV dans des kératinocytes primaires humains en l'absence ou en présence de LL-37 et d'hBD-3. La charge virale a été mesurée après 24h d'infection par RT-PCR quantitative dans le surnageant de kératinocytes infectés par le WNV (MOI = 0,1), en présence de LL-37 ou d'hBD-3, ajoutés à des concentrations de 1 et 10 µg/mL. Les peptides ont été ajoutés à différents temps au cours de la cinétique d'infection : 24h avant l'infection (**PAMs 24h AI**), en même temps que le WNV (**PAMs + WNV**) et 6h après l'infection des kératinocytes par le virus (**PAMs 6h PI**). Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 7 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées aux kératinocytes infectés par le WNV seul, par un test de Wilcoxon.

b. Etude des effets antiviraux par pré-incubation du WNV en présence de LL-37 et d'hBD-3 suivi d'un titrage sur cellules Vero

Afin d'approfondir l'existence d'éventuelles propriétés antivirales directes des PAMs sur la particule virale, un inoculum viral de $2,0 \times 10^4$ DICT₅₀/mL (volume total de la suspension virale : 750 µL) a été incubée 2h en présence de LL-37 ou d'hBD-3 à des concentrations de 1, 10 et 40 µg/mL avant mesure du titre infectieux résiduel de la suspension virale sur cellules Vero.

Le titre de la suspension virale, incubée sans peptide, était de $10^{4,8}$ DICT₅₀/mL après 2h à 37°C. Lors de la préincubation en présence de LL-37 à 1 µg/mL, ce titre était significativement diminué d'environ 1 log ($10^{3,95}$ DICT₅₀/mL). Cette diminution semblait concentration-dépendante car elle était de 1,5 log lors de la préincubation avec les fortes concentrations en LL-37 de 10 et 40 µg/mL ($10^{3,28}$ DICT₅₀/mL) (Figure 17a).

Pour les essais avec hBD-3, la suspension virale incubée sans peptide avait un titre de $10^{4,2}$ DICT₅₀/mL. Contrairement à la LL-37, la présence d'hBD-3 ne diminuait pas le titre viral même à forte concentration. Les titres obtenus étaient $10^{3,8}$, $10^{4,2}$ et $10^{4,6}$ DICT₅₀/mL respectivement à 1, 10 et 40 µg/mL (Figure 17b).

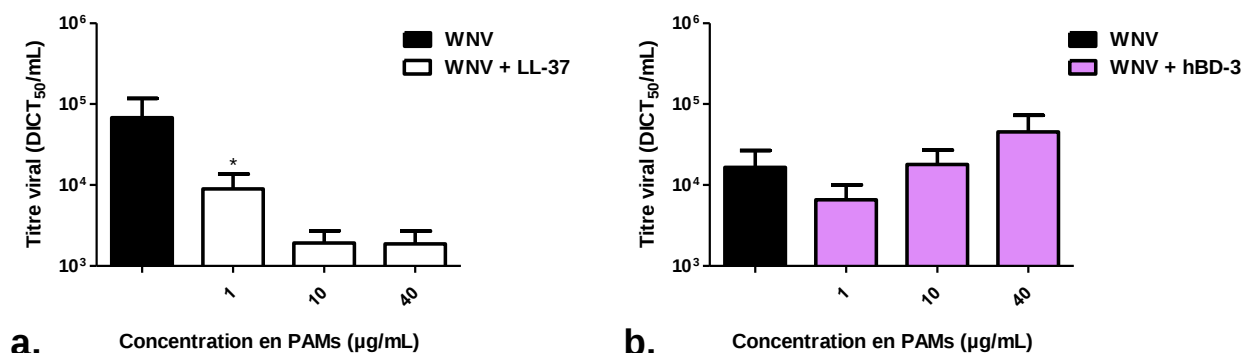


Figure 17 : Titrage d'une suspension de WNV après pré-incubation en présence de LL-37 et hBD-3. Une suspension de $2,0 \cdot 10^4$ DICT₅₀/mL de WNV a été pré-incubée 2h, à 37°C, sous 5% CO₂, en présence ou en absence, de LL-37 ou d'hBD-3 à des concentrations de 1, 10 ou 40 µg/mL. Chaque suspension virale a été ensuite titrée sur cellules Vero par la méthode des dilutions limites impliquant la lecture de l'effet cytopathique à 4 jours. Le titre de la suspension a été calculé par la méthode de Kärber. Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type d'au moins 3 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées à la suspension de WNV seul, par un test de Wilcoxon (*p<0,05).

DISCUSSION

Lors de l'infection par un arbovirus, la peau constitue le site d'inoculation du virus dans l'organisme et son premier site de réplication. Paradoxalement, la peau représente également la première ligne de défense face à l'infection. En effet, les kératinocytes de l'épiderme sont un composant essentiel de la mise en place de la réponse immunitaire innée antivirale. Les kératinocytes sont capables de reconnaître des structures particulières, spécifiques des pathogènes, les PAMPs, grâce à leurs nombreux récepteurs, les PRRs parmi lesquels les « Toll Like Receptors » et les « retinoid-inducible helicases » comme le Retinoic acid-Inducible Gene I et le Melanoma-Differentiation-Associated gene 5. La reconnaissance des PAMPs par les PRRs génère une réponse immunitaire innée dont les molécules effectrices sont constituées de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens. Les peptides antimicrobiens peuvent avoir une action directe sur les pathogènes et indirecte immunomodulatrice. Ils vont ainsi provoquer le recrutement de cellules immunitaires au site de l'infection et moduler la sécrétion en cytokines et chimiokines par les kératinocytes eux-mêmes mais aussi par les cellules immunitaires et non immunitaires voisines qui participeront à leur tour aux défenses antivirales de l'organisme (Nestle et al., 2009). Le kératinocyte humain synthétise plusieurs peptides appartenant aux familles des β -défensines (β -défensines 2 et 3), des cathélicidines (LL-37), des ribonucléases A (RNase 7) et des protéines de la famille S100 liant le calcium (S100A7, -A8/9, -A15). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux propriétés antivirales indirectes, par immunomodulation, et directes, par action sur la particule virale ou son cycle de réplication, de la cathélicidine humaine LL-37 et de la bêta-défensine humaine de type 3, dans le contexte de la stimulation par un ARN double-brin synthétique agoniste des TLRs et de l'infection par le WNV de kératinocytes primaires humains.

Le premier objectif de ce travail était d'explorer les propriétés immunomodulatrices de la cathélicidine humaine LL-37 et de la bêta-défensine humaine de type 3 dans un contexte d'infection virale cutanée.

Pour représenter la réponse inflammatoire du kératinocyte, nous nous sommes basés sur la mesure de l'expression de cinq médiateurs impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire innée antivirale cellulaire constitués de trois interférons (IFN β -1, IL-28A et IL-29) et de deux chimiokines (CCL-5 et CXCL-8). En effet, les interférons sont des

cytokines majeures de la réponse antivirale. Ils peuvent être sécrétés par de nombreux types cellulaires (cellules endothéliales, macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales) lors d'un stress. Ils vont agir sur les cellules qui ne sont pas encore infectées où ils induiront l'expression des « Interferon Stimulated Genes » aboutissant à l'établissement d'un état antiviral afin de préparer ces cellules à bloquer une éventuelle infection, évitant ainsi la dissémination du pathogène. CXCL-8 et CCL-5 sont deux chimiokines. La première va attirer les polynucléaires neutrophiles au niveau du site de l'inflammation et la seconde agit sur la migration des macrophages et des cellules NK (Palomino and Marti, 2015). Elles participent donc toutes deux à la réponse antivirale attirant au site de l'infection des cellules immunitaires susceptibles de lyser les cellules cutanées infectées mais aussi, paradoxalement, de propager l'infection aux tissus voisins.

Le choix des concentrations en peptides auxquelles étudier leur activité immunomodulatrice et antivirale était un point critique de la méthodologie employée dans ce travail. En effet, il n'est pas évident de mesurer la concentration en PAMs au sein du tissu cutané, que ce soit dans un contexte physiologique ou inflammatoire. La plupart des équipes, qui ont étudié les niveaux de synthèse des PAMs dans les différents tissus, l'ont fait par immuno-histochimie ou bien par étude transcriptomique. Il n'existe pas de données quant aux concentrations de PAMs au sein du tissu cutané faisant consensus et sur lesquelles nous aurions pu nous appuyer pour choisir nos concentrations de travail. Ainsi, les concentrations de peptides choisies correspondaient à celles utilisées au cours de différents travaux ayant étudié leurs effets immunomodulateurs. Filewod *et al* ont démontré l'activité potentialisatrice de la LL-37, sur la sécrétion d'IL-8 dans des cellules de l'épithélium bronchique et des kératinocytes, à de faibles concentrations de 2 à 5 µg/mL, assimilées aux concentrations physiologiques (Filewod et al., 2009). De même Lai *et al* ont démontré l'activité immunostimulatrice de la LL-37 sur la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C) *via* le TLR3, dans une lignée de cellules bronchiques (BEAS2B) et une lignée de cellules embryonnaires de rein humaines (HEK293T) à une concentration de 2,2 µM, soit 10 µg/mL (Lai et al., 2011). Enfin, Chen *et al* ont mis en évidence une concentration en LL-37, hBD-2 et -3 pouvant atteindre 15 µg/mL dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de mucoviscidose. Ils ont démontré que cette concentration augmentait avec le degré d'inflammation du tissu pulmonaire (Chen et al., 2004). Dans ce travail, nous avons eu recours à des concentrations en peptides de 1 à 10 µg/mL susceptibles de correspondre à la fois aux concentrations physiologiques (faible concentration) et inflammatoires (forte concentration) rencontrées *in vivo*. L'évaluation de l'activité immunomodulatrice à différentes

concentrations devait également nous permettre d'explorer un éventuel effet paradoxal des PAMs, immunostimulateur ou immuno-inhibiteur en fonction des concentrations étudiées.

Au cours de l'évaluation des propriétés immunomodulatrices des PAMs, nous avons tout d'abord étudié leur effet pro-inflammatoire propre aux concentrations choisies. L'incubation des kératinocytes en présence des PAMs seuls à des concentrations de 0,1 et 1 µg/mL n'induisait pas l'expression des cinq médiateurs de l'inflammation étudiés. Cependant, dans nos expériences, hBD-3 semblait avoir une activité pro-inflammatoire propre à une concentration de 10 µg/mL, induisant l'expression de CXCL-8 dès 3h d'incubation. Différentes études antérieures avaient montré que la LL-37 et hBD-3 entraînaient une augmentation de la sécrétion basale de différents marqueurs inflammatoires (IL-18, IL-6, IL-10, CCL-5, IP-10, MCP-1) dans les kératinocytes pour des concentrations en peptide allant de 1 à 40 µg/mL (Niyonsaba et al., 2005, Niyonsaba et al., 2007, van Kilsdonk et al., 2017). Nos résultats n'ont pas montré d'activité pro-inflammatoire de la LL-37 mais ont confirmé celle d'hBD-3 à forte concentration.

L'activité immunomodulatrice de ces deux PAMs a été ensuite étudiée dans un modèle de kératinocytes stimulés par le poly (I:C) ou infectés par le WNV. Le poly (I:C) est un analogue d'ARN double-brin qui mime les intermédiaires de réplication présents au cours du cycle de multiplication virale. Dans le kératinocyte, le poly (I:C) va activer le TLR3 et déclencher une réponse antivirale impliquant notamment la synthèse d'interférons et de cytokines (Matsukura et al., 2006). Au cours de notre étude, la stimulation des kératinocytes par le poly (I:C) induisait la synthèse des ARNm codants les cinq médiateurs de la réponse inflammatoire sélectionnés reproduisant les observations précédemment publiées.

La LL-37, utilisée à des concentrations décrites comme pro-inflammatoires, majorait cette expression. Plusieurs études ont en effet déjà montré les modulations de la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C) par la LL-37. *Takiguchi et al.* ont étudié l'effet de la LL-37 à 5 µM sur l'induction de médiateurs de l'inflammation par le poly (I:C), utilisé à la concentration de 1 µg/mL, dans une lignée de kératinocytes humains. L'effet potentialisateur du peptide a été mis en évidence car il augmentait significativement l'expression d'IFN β-1, d'IL-8 et d'IL-6 induite par le poly (I:C) (Takiguchi et al., 2014). De plus, *Lai et al.* ont montré que 2,2 µM de LL-37 potentialisaient la sécrétion d'IL-6 induite par le poly (I:C) dans les cellules épithéliales bronchiques (Lai et al., 2011). A l'inverse, *Hasan et al.* ont démontré que la LL-37, à des concentrations comprises entre 1 et 5 µg/mL, inhibait la production de TNF-α ou de monoxyde d'azote (NO) ainsi que la transcription d'IL-6 et d'IL-1β induite par le poly (I:C) dans des macrophages. Cette inhibition par la LL-37 de la réponse inflammatoire

était due à la formation d'un complexe entre le poly (I:C) et la LL-37, limitant ainsi l'interaction du poly (I:C) avec le TLR-3 (Hasan et al., 2011). Les effets paradoxaux de la LL-37 sur l'action pro-inflammatoire du poly (I:C) observés dans ces différentes études ont été obtenus à des concentrations en peptide similaires. Ces différences sont donc plutôt susceptibles d'être expliquées par l'utilisation de modèles cellulaires différents que par un effet paradoxal du peptide en fonction des concentrations testées.

Aux concentrations choisies pour notre étude, nos résultats s'accordent avec les données de la littérature confirmant les effets potentialisateurs de la LL-37 sur la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C). Ces données obtenues avec la LL-37 ont ainsi validé notre modèle de stimulation des kératinocytes humains primaires par le poly (I:C) nous ayant permis ensuite d'étudier les propriétés immunomodulatrices de la β -défensine humaine de type 3.

L'ajout d'hBD-3 au surnageant de culture de kératinocytes stimulés par le poly (I:C) a eu également pour effet de potentialiser la réponse inflammatoire cellulaire. En effet, l'expression des chimiokines CCL-5 et CXCL-8 ainsi que celle des interférons β (IFN β -1) et λ (IL-28A et IL-29) induite par le poly (I:C) était majorée en présence d'hBD-3. L'effet potentialisateur de ce peptide était dépendant de la concentration et observé dès 3h de stimulation par le poly (I:C). Enfin, hBD-3 semblait avoir une action plus importante sur l'induction des interférons (IFN β -1 et IL-28A) que sur celle des chimiokines. *Van Kilsdonk et al.* ont récemment étudié la réponse pro-inflammatoire des kératinocytes stimulés avec différents agonistes des TLRs (poly (I:C), LPS, antigènes de streptocoque) en présence des bêta-défensines humaines (hBD-2 et -3 à 10 μ g/mL) mais n'ont pas réussi à mettre en évidence un effet potentialisateur de ces peptides (van Kilsdonk et al., 2017). Le recours à des cellules primaires issues de patients présentant des caractéristiques génétiques différentes est susceptible d'expliquer ces résultats discordants.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les propriétés immunomodulatrices des PAMs lors de l'infection des kératinocytes par le virus West Nile. A l'instar du poly (I:C), le virus induisait l'expression des cinq médiateurs inflammatoires dans les kératinocytes infectés. Cependant, l'induction de la majorité des marqueurs était plus marquée avec le poly (I:C) que lors de l'infection virale. Cette différence pourrait provenir du fait que (i) nous n'avons pas étudié l'induction des marqueurs avec la même cinétique pour le modèle poly (I:C) (3h et 24h) et pour le virus (24h et 48h), (ii) le virus dispose de mécanismes d'échappement susceptibles de retarder ou de limiter l'expression des acteurs de la réponse immune et (iii) la correspondance entre la concentration en poly (I:C) et la MOI virale est

inconnue et a pu nous amener à stimuler les cellules avec davantage d'ARN bicaténaires synthétiques que ceux effectivement produits au cours du cycle de réplication.

Comme observé avec le poly (I:C), l'effet potentialisateur des peptides sur la réponse inflammatoire des kératinocytes a été également retrouvé lors de l'infection par le WNV. Néanmoins, cet effet constaté lors de l'infection était plus marqué à 48 qu'à 24h. De plus, comme avec le poly (I:C), il était plus marqué avec hBD-3 qu'avec la LL-37. Cet effet potentialisateur restait malgré tout inférieur à celui constaté en présence de poly (I:C). Nos expériences montrent ainsi l'effet potentialisateur des peptides, LL-37 et hBD-3, sur la réponse inflammatoire induite lors de l'infection par le WNV.

En conclusion de cette première partie, nos résultats confirment les propriétés immunomodulatrices de la LL-37 dans le contexte de la stimulation par un agoniste du TLR3, le poly (I:C), et montrent pour la première fois l'effet potentialisateur de la réponse inflammatoire exercé par la LL-37 et la β -défensine humaine de type 3 au cours l'infection par le WNV. Ils suggèrent donc un rôle antiviral indirect potentiel de ces deux PAMs par majoration de la réponse immunitaire innée antivirale du kératinocyte lors de l'infection.

Le second objectif de ce travail était l'étude des propriétés antivirales de la LL-37 et d'hBD-3 vis-à-vis du WNV. En effet, aucune étude ne s'est jusqu'ici intéressée à l'activité antivirale de ces PAMs sur les arbovirus, en général, et sur le WNV, en particulier. Les kératinocytes étant permissifs à l'infection, le choix du critère d'évaluation de l'activité antivirale s'est d'abord porté sur le suivi de la charge virale dans le surnageant de culture de kératinocytes humains primaires infectés par le WNV en présence ou en l'absence des peptides. Au cours de notre travail, différentes conditions d'ajout des peptides ont été testées afin de mieux cerner leur mécanisme d'action. L'incubation des kératinocytes en présence des peptides 24h avant l'ajout du virus permettait aux peptides d'agir sur la cellule cible en amont de l'infection et ainsi, potentiellement, (i) d'activer des voies de signalisation impliquées dans la lutte contre l'infection virale, (ii) d'inhiber celles détournées par le virus pour faciliter l'infection, ou encore (iii) de diminuer l'expression membranaire de récepteur(s) cellulaire(s) limitant ainsi l'attachement et l'entrée du virus. L'effet antiviral de l' α -défensine 1 humaine contre le virus de la grippe a ainsi été mis en évidence sur une lignée cellulaire de rein de bovin (MDBK) en préincubant les cellules avec 20 μ g/mL de peptide pendant 18h avant l'infection. Le mécanisme antiviral évoqué était une inhibition de l'activation de la Protéine Kinase C dans les cellules infectées (Salvatore et al., 2007). La PKC activée permet le bon déroulement de plusieurs étapes du cycle de réplication de différents virus. Par exemple, elle

favorise la fusion, la transcription et l'assemblage du VIH-1, la sortie de la vésicules d'endosome et l'entrée dans le noyau pour le virus de la grippe (Wilson et al., 2013). Il serait intéressant d'étudier les effets de la LL-37 et d'hBD-3 sur l'activation de la PKC du kératinocyte, puis le rôle de cette PKC activée au cours du cycle de réplication du WNV dans le kératinocyte afin de déterminer si l'effet antiviral observé pourrait être expliqué par l'inhibition de l'activation de la PKC. L'ajout du peptide simultanément au virus devait permettre d'explorer un éventuel effet direct des peptides sur la particule virale. Enfin, l'ajout du peptide à 6h post-infection, avait pour objectif de s'affranchir d'un éventuel effet du peptide sur les étapes précédant l'entrée cellulaire du virus (pré-fusion) et d'évaluer un effet majoritairement en intracellulaire sur la réplication virale (post-fusion).

Les résultats obtenus ont montré qu'à forte concentration (10 µg/mL), la LL-37 semblait limiter la réplication virale lors de l'infection des kératinocytes. Une diminution de la charge virale dans le surnageant de culture de 1 log à 24 h post-infection par rapport aux kératinocytes non traités par le peptide était ainsi mesurée. Cette activité antivirale était observée quelque soit le temps d'ajout du peptide suggérant de multiples mécanismes d'action : effet direct sur la particule virale infectieuse ? Mécanismes cellulaires limitant l'entrée du virus ? Interaction avec le cycle de réplication intracellulaire ? Un effet antiviral d'hBD-3 a également été mis en évidence à forte concentration (10 µg/mL) mais uniquement lorsque le peptide était ajouté 24h avant l'infection ou 6h après. Ces résultats semblent indiquer que l'effet antiviral d'hBD-3 est, quant à lui, plutôt dû à des mécanismes cellulaires, puisque nous n'avons pas observé d'inhibition de la réplication virale lorsque le peptide est ajouté simultanément au virus au contact des kératinocytes.

Une deuxième méthode a ensuite été utilisée pour poursuivre l'exploration des propriétés antivirales de la LL-37 et d'hBD-3. Elle permettait d'étudier plus précisément des interactions potentielles directes des PAMs avec la particule virale. En effet, les PAMs étant des molécules cationiques, ils peuvent agir par perforation de l'enveloppe virale chargée négativement. De plus, certains peptides sont des lectines et peuvent se lier aux glycoprotéines de l'enveloppe virale bloquant l'attachement ou empêchant la fusion enveloppe-membrane cellulaire (Wilson et al., 2013, Crack et al., 2012). Enfin, les peptides antimicrobiens peuvent agir en provoquant la formation d'agrégats de particules virales. Afin de mettre en évidence une activité antivirale directe extracellulaire sur la particule virale, la méthode employée consistait à incuber de façon prolongée (2h) une suspension virale titrée en présence, ou en l'absence, de chacun des deux peptides à trois concentrations de 1, 10 et 40

µg/mL puis à réaliser un titrage du virus infectieux résiduel sur cellules Vero. Une diminution significative du titre viral en présence du peptide signalait une altération du pouvoir infectieux et donc de la structure de la particule virale. Un effet antiviral indirect par immunomodulation pouvait être négligé dans ce modèle car les cellules Vero ne sécrètent pas d'interféron de type 1 une fois infectées par des virus et peuvent donc être considérées comme des cellules « immunodéprimées » (Desmyter et al., 1968). Cependant, elles expriment toujours le récepteur interféron-alpha/beta et peuvent donc répondre normalement à une stimulation lorsque de l'interféron d'une autre source est ajouté à la culture.

Cette préincubation du virus en présence de peptide avant titrage a déjà été utilisée pour mettre en évidence les effets antiviraux de PAMs vis-à-vis d'autres virus, notamment le virus de la varicelle. Dans ce cas, la préincubation du virus 24h avant l'infection en présence de LL-37 entraînait une baisse du titre infectieux et suggérait un effet direct du peptide sur le virus (Crack et al., 2012). Cet effet antiviral de la LL-37 était également retrouvé dans notre travail. Le titre viral de l'inoculum de WNV était ainsi réduit de 1 à 1.5 log en présence de LL-37 à respectivement 1 µg/mL et 10/40 µg/mL. Ceci suggère l'existence d'un mode d'action concentration-dépendant du peptide puisque l'effet antiviral semble augmenter avec la concentration en peptide. En revanche et de façon inattendue, en présence d'hBD-3, le titre viral n'était pas diminué et semblait même augmenter avec la concentration en peptide. Le résultat de cette expérience concorde avec celui de l'expérience précédente réalisée sur kératinocytes et suggère qu'hBD-3 ne modifie pas l'intégrité de la particule virale du WNV. De même, lorsque Crack *et al.* ont testé la pré-incubation du VZV en présence d'hBD-2, ils n'ont pas mis en évidence de diminution du titre infectieux (Crack et al., 2012). Ceci est surprenant puisque plusieurs études ont émis l'hypothèse que l'activité antivirale des défensines était liée à leur capacité à déstabiliser les bicouches phospholipidiques des enveloppes virales (Kota et al., 2008, Daher et al., 1986). Ainsi, Quinones *et al.* ont démontré l'effet antiviral d'hBD-3 sur le VIH-1 à des concentrations comprises entre 5 et 40 µg/mL. L'effet antiviral concentration-dépendant était observé à une MOI de 0,01 soit 10 fois inférieure à celle utilisée dans notre étude. Deux mécanismes antiviraux avaient été mis en évidence dans cette étude, une interaction directe défensines-virus et une diminution de l'expression de CXCR-4 à la surface des cellules cibles (Quiñones-Mateu et al., 2003). Enfin, une étude portant sur l'*Herpes simplex* de type 2 a également démontré un effet antiviral d'hBD-3 à une concentration de 25 µg/mL, impliquant différents mécanismes tels que la liaison du peptide à la glycoprotéine gB et au récepteur cellulaire constitué par les héparanes sulfates (Hazrati et al., 2006). Le WNV étant un virus enveloppé, hBD-3 devrait donc

également modifier l'intégrité de la particule virale et une diminution du titre infectieux aurait dû être observée. Des expérimentations supplémentaires sont donc nécessaires pour conclure à propos des propriétés anti-WNV d'hBD-3. Elles devront inclure une modification de la proportion entre le nombre particules virales et la quantité de peptide, ainsi des MOI virales plus faibles ou plus fortes pourraient être testées. De même, nous n'avons pas fait varier les conditions expérimentales de milieu (pH, concentration en NaCl, ...) qui pourraient avoir un impact sur l'interaction virus-peptide. A l'inverse, l'augmentation de la charge virale au cours de l'infection de kératinocytes et du titre infectieux mesuré sur cellules Vero pourrait être expliquée par une perméabilisation accrue des membranes cellulaires facilitant la pénétration et la réplication cytoplasmique du virus.

En conclusion de cette seconde partie, un effet anti-WNV de la LL-37 et d'hBD-3 a été observé au cours d'une cinétique d'infection de kératinocytes primaires humains. Pour la cathélicidine LL-37, divers mécanismes semblent participer à ce phénomène parmi lesquels une neutralisation directe du virus par le peptide objectivée par la réduction du titre infectieux d'une suspension virale incubée en présence du peptide avant titrage. Pour hBD-3, l'action antivirale ne semble pas se faire directement sur la particule virale mais plutôt *via* la stimulation de mécanismes de défense intracellulaires ou par l'inhibition d'étapes post-fusion du cycle de réplication du virus.

En conclusion, les résultats obtenus ont démontré que les deux peptides antimicrobiens étudiés disposaient d'une activité antivirale indirecte par stimulation de la réponse inflammatoire de kératinocytes humains primaires lors de l'infection par le WNV. De plus, notre étude a montré une activité antivirale directe de la cathélicidine humaine LL-37 et de la bêta défensine humaine de type 3 vis-à-vis du WNV. Cependant les mécanismes responsables de ces effets antiviraux doivent encore être précisés. Enfin l'activité antivirale de ces peptides devra également être testée vis-à-vis d'autres arbovirus, notamment d'autres *Flavivirus* comme le virus Zika.

L'identification de nouvelles molécules possédant une activité anti-arbovirale est susceptible de servir de base à la conception de nouveaux analogues thérapeutiques contre l'infection soit à visée curative, administrés par voie systémique, soit à but prophylactique, entrant dans la formulation d'un spray ou d'une pommade anti-moustique afin d'établir une barrière protectrice contre l'infection.

RÉFÉRENCES

- Aguirre, S., Maestre, A. M., Pagni, S., Patel, J. R., Savage, T., Gutman, D., Maringer, K., Bernal-Rubio, D., Shabman, R. S., Simon, V., Rodriguez-Madoz, J. R., Mulder, L. C., Barber, G. N. and Fernandez-Sesma, A. (2012) 'DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING', *PLoS Pathog*, 8(10), pp. e1002934.
- Alagarasu, K., Patil, P. S., Shil, P., Seervi, M., Kakade, M. B., Tillu, H. and Salunke, A. (2017) 'In-vitro effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on dengue virus type 2', *Peptides*, 92, pp. 23-30.
- Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes. 1994. Journal Officiel de la République Française.
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Pagni, S., Martello, T., Cattai, M., Cusinato, R. and Palù, G. (2013) 'Excretion of West Nile virus in urine during acute infection', *J Infect Dis*, 208(7), pp. 1086-92.
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Squarzon, L., Sinigaglia, A., Ulbert, S., Cusinato, R. and Palù, G. (2014) 'Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection', *J Clin Microbiol*, 52(9), pp. 3411-3.
- Berthet, F. X., Zeller, H. G., Drouet, M. T., Rauzier, J., Digoutte, J. P. and Deubel, V. (1997) 'Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses', *J Gen Virol*, 78 (Pt 9), pp. 2293-7.
- Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V. and Gallo, R. L. (2005) 'Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides', *J Invest Dermatol*, 125(1), pp. 9-13.
- Briant, L., Desprès, P., Choumet, V. and Missé, D. (2014) 'Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses', *Virology*, 464-465, pp. 26-32.
- Brinton, M. A. (2002) 'The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere', *Annu Rev Microbiol*, 56, pp. 371-402.
- Brinton, M. A. (2013) 'Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus', *Viruses*, 6(1), pp. 13-53.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. and Brandt, W. E. (1989) 'Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera', *J Gen Virol*, 70 (Pt 1), pp. 37-43.
- CDC West Nile virus disease cases and deaths reported to CDC by year and clinical presentation, 1999-2015. Available at: https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/data/1-WNV-Disease-Cases-by-Year_1999-2015_07072016.pdf (Accessed: 25/07/17).
- Celis, J. E., Crüger, D., Kiil, J., Lauridsen, J. B., Ratz, G., Basse, B. and Celis, A. (1990) 'Identification of a group of proteins that are strongly up-regulated in total epidermal keratinocytes from psoriatic skin', *FEBS Lett*, 262(2), pp. 159-64.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. and Rice, C. M. (1990) 'Flavivirus genome organization, expression, and replication', *Annu Rev Microbiol*, 44, pp. 649-88.
- Chen, C. I., Schaller-Bals, S., Paul, K. P., Wahn, U. and Bals, R. (2004) 'Beta-defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis', *J Cyst Fibros*, 3(1), pp. 45-50.
- Crack, L. R., Jones, L., Malavige, G. N., Patel, V. and Ogg, G. S. (2012) 'Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus', *Clin Exp Dermatol*, 37(5), pp. 534-43.
- Daher, K. A., Selsted, M. E. and Lehrer, R. I. (1986) 'Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins', *J Virol*, 60(3), pp. 1068-74.
- Dauphin, G., Zientara, S., Zeller, H. and Murgue, B. (2004) 'West Nile: worldwide current situation in animals and humans', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5), pp. 343-55.
- De Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M. and Sanders, N. N. (2012) 'Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination', *Vet Res*, 43, pp. 16.
- Desmyter, J., Melnick, J. L. and Rawls, W. E. (1968) 'Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero)', *J Virol*, 2(10), pp. 955-61.
- Di Nardo, A., Vitiello, A. and Gallo, R. L. (2003) 'Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide', *J Immunol*, 170(5), pp. 2274-8.
- Filewod, N. C., Pistolic, J. and Hancock, R. E. (2009) 'Low concentrations of LL-37 alter IL-8 production by keratinocytes and bronchial epithelial cells in response to proinflammatory stimuli', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 56(3), pp. 233-40.
- Firat, Y. H., Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Brasch, J. and Harder, J. (2014) 'Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression', *PLoS One*, 9(4), pp. e93941.

- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stähle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H. (1997) 'The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders', *J Biol Chem*, 272(24), pp. 15258-63.
- Garcia, M., Wehbe, M., Lévêque, N. and Bodet, C. 2017. Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur. Cytokine Netw*.
- Gossner, C. M., Marrama, L., Carson, M., Allerberger, F., Calistri, P., Dilaveris, D., Lecollinet, S., Morgan, D., Nowotny, N., Paty, M. C., Pervanidou, D., Rizzo, C., Roberts, H., Schmoll, F., Van Bortel, W. and Gervelmeyer, A. (2017) 'West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach', *Euro Surveill*, 22(18).
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V. M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H. and Missé, D. (2015) 'Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells', *J Virol*, 89(17), pp. 8880-96.
- Harder, J. and Schroder, J. M. (2002) 'RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin', *J Biol Chem*, 277(48), pp. 46779-84.
- Hasan, M., Ruksznis, C., Wang, Y. and Leifer, C. A. (2011) 'Antimicrobial peptides inhibit polyinosinic-polycytidylic acid-induced immune responses', *J Immunol*, 187(11), pp. 5653-9.
- Hazrati, E., Galen, B., Lu, W., Wang, W., Ouyang, Y., Keller, M. J., Lehrer, R. I. and Herold, B. C. (2006) 'Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection', *J Immunol*, 177(12), pp. 8658-66.
- Hoover, L. I. and Fredericksen, B. L. (2014) 'IFN-dependent and -independent reduction in West Nile virus infectivity in human dermal fibroblasts', *Viruses*, 6(3), pp. 1424-41.
- Kalali, B. N., Köllisch, G., Mages, J., Müller, T., Bauer, S., Wagner, H., Ring, J., Lang, R., Mempel, M. and Ollert, M. (2008) 'Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling', *J Immunol*, 181(4), pp. 2694-704.
- Kota, S., Sabbah, A., Chang, T. H., Harnack, R., Xiang, Y., Meng, X. and Bose, S. (2008) 'Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus', *J Biol Chem*, 283(33), pp. 22417-29.
- Lai, Y., Adhikarakunnathu, S., Bhardwaj, K., Ranjith-Kumar, C. T., Wen, Y., Jordan, J. L., Wu, L. H., Dragnea, B., San Mateo, L. and Kao, C. C. (2011) 'LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs', *PLoS One*, 6(10), pp. e26632.
- Lai, Y. and Gallo, R. L. (2009) 'AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense', *Trends Immunol*, 30(3), pp. 131-41.
- Lim, P. Y., Behr, M. J., Chadwick, C. M., Shi, P. Y. and Bernard, K. A. (2011) 'Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo', *J Virol*, 85(10), pp. 5197-201.
- Linke, S., Ellerbrok, H., Niedrig, M., Nitsche, A. and Pauli, G. (2007) 'Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR', *J Virol Methods*, 146(1-2), pp. 355-8.
- Mackenzie, J. S. and Williams, D. T. (2009) 'The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses', *Zoonoses Public Health*, 56(6-7), pp. 338-56.
- Matsukura, S., Kokubu, F., Kurokawa, M., Kawaguchi, M., Ieki, K., Kuga, H., Odaka, M., Suzuki, S., Watanabe, S., Takeuchi, H., Kasama, T. and Adachi, M. (2006) 'Synthetic double-stranded RNA induces multiple genes related to inflammation through Toll-like receptor 3 depending on NF-kappaB and/or IRF-3 in airway epithelial cells', *Clin Exp Allergy*, 36(8), pp. 1049-62.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z. and Nickoloff, B. J. (2009) 'Skin immune sentinels in health and disease', *Nat Rev Immunol*, 9(10), pp. 679-91.
- Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Someya, A., Hirata, M., Matsuda, H., Ogawa, H. and Nagaoka, I. (2002) 'A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis', *Immunology*, 106(1), pp. 20-6.
- Niyonsaba, F., Kiatsurayanon, C., Chieosilapatham, P. and Ogawa, H. (2017) 'Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases', *Exp Dermatol*.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K. and Ogawa, H. (2005) 'The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes', *J Immunol*, 175(3), pp. 1776-84.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K. and Ogawa, H. (2007) 'Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines', *J Invest Dermatol*, 127(3), pp. 594-604.
- Paddock, C. D., Nicholson, W. L., Bhatnagar, J., Goldsmith, C. S., Greer, P. W., Hayes, E. B., Risko, J. A., Henderson, C., Blackmore, C. G., Lanciotti, R. S., Campbell, G. L. and Zaki, S. R. (2006) 'Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States', *Clin Infect Dis*, 42(11), pp. 1527-35.

- Palomino, D. C. and Marti, L. C. (2015) 'Chemokines and immunity', *Einstein (Sao Paulo)*, 13(3), pp. 469-73.
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X. and Amara, A. (2013) 'Flavivirus entry receptors: an update', *Viruses*, 6(1), pp. 69-88.
- Petersen, L. R., Brault, A. C. and Nasci, R. S. (2013) 'West Nile virus: review of the literature', *JAMA*, 310(3), pp. 308-15.
- Poidinger, M., Hall, R. A. and Mackenzie, J. S. (1996) 'Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus', *Virology*, 218(2), pp. 417-21.
- Prost-Squarcioni, C., Heller, M. and Fraitag, S. 2005. Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes. *Ann Dermatol Venerol*
- Prow, N. A. (2013) 'The changing epidemiology of Kunjin virus in Australia', *Int J Environ Res Public Health*, 10(12), pp. 6255-72.
- Quicke, K. M. and Suthar, M. S. (2013) 'The innate immune playbook for restricting West Nile virus infection', *Viruses*, 5(11), pp. 2643-58.
- Quiñones-Mateu, M. E., Lederman, M. M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H. R., Marotta, M. L., Mirza, M., Jiang, B., Kiser, P., Medvik, K., Sieg, S. F. and Weinberg, A. (2003) 'Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication', *AIDS*, 17(16), pp. F39-48.
- Rieg, S., Garbe, C., Sauer, B., Kalbacher, H. and Schitteck, B. (2004) 'Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions', *Br J Dermatol*, 151(3), pp. 534-9.
- Rizzoli, A., Jimenez-Clavero, M. A., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., Martina, B., Moreno, A., Nowotny, N., Pardigon, N., Sanders, N., Ulbert, S. and Tenorio, A. (2015) 'The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities', *Euro Surveill*, 20(20).
- Rossi, S. L., Zhao, Q., O'Donnell, V. K. and Mason, P. W. (2005) 'Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action', *Virology*, 331(2), pp. 457-70.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. and Tessier, P. A. (2003) 'Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion', *J Immunol*, 170(6), pp. 3233-42.
- Salvatore, M., Garcia-Sastre, A., Ruchala, P., Lehrer, R. I., Chang, T. and Klotman, M. E. (2007) 'alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s)', *J Infect Dis*, 196(6), pp. 835-43.
- Seidel, A., Ye, Y., de Armas, L. R., Soto, M., Yarosh, W., Marcsisin, R. A., Tran, D., Selsted, M. E. and Camerini, D. (2010) 'Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms', *PLoS One*, 5(3), pp. e9737.
- Shipley, J. G., Vandergaast, R., Deng, L., Mariuzza, R. A. and Fredericksen, B. L. (2012) 'Identification of multiple RIG-I-specific pathogen associated molecular patterns within the West Nile virus genome and antigenome', *Virology*, 432(1), pp. 232-8.
- Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Schumacher, H. M., Gläser, R. and Harder, J. (2013) 'IL-17A and IFN- γ synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes', *PLoS One*, 8(3), pp. e59531.
- Smithburn, K. C. 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. In: Hughes, T.P. (ed.). *Am. J. Trop. Med.*
- Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. and Simmonds, P. (2011) 'The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae', *J Gen Virol*, 92(Pt 2), pp. 233-46.
- Takiguchi, T., Morizane, S., Yamamoto, T., Kajita, A., Ikeda, K. and Iwatsuki, K. (2014) 'Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 augments interferon- β expression and antiviral activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes', *Br J Dermatol*, 171(3), pp. 492-8.
- Territo, M. C., Ganz, T., Selsted, M. E. and Lehrer, R. (1989) 'Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils', *J Clin Invest*, 84(6), pp. 2017-20.
- Thorey, I. S., Roth, J., Regenbogen, J., Halle, J. P., Bittner, M., Vogl, T., Kaesler, S., Bugnon, P., Reitmaier, B., Durka, S., Graf, A., Wöckner, M., Rieger, N., Konstantinow, A., Wolf, E., Goppelt, A. and Werner, S. (2001) 'The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes', *J Biol Chem*, 276(38), pp. 35818-25.
- van Kilsdonk, J. W. J., Jansen, P. A. M., van den Bogaard, E. H., Bos, C., Bergers, M., Zeeuwen, P. L. J. M. and Schalkwijk, J. (2017) 'The Effects of Human Beta-Defensins on Skin Cells in vitro', *Dermatology*.
- Voss, A., Bode, G., Sopalla, C., Benedyk, M., Varga, G., Böhm, M., Nacken, W. and Kerkhoff, C. (2011) 'Expression of S100A8/A9 in HaCaT keratinocytes alters the rate of cell proliferation and differentiation', *FEBS Lett*, 585(2), pp. 440-6.
- Wang, G., Li, X. and Wang, Z. (2016) 'APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education', *Nucleic Acids Res*, 44(D1), pp. D1087-93.

- Welte, T., Reagan, K., Fang, H., Machain-Williams, C., Zheng, X., Mendell, N., Chang, G. J., Wu, P., Blair, C. D. and Wang, T. (2009) 'Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection', *J Gen Virol*, 90(Pt 11), pp. 2660-8.
- West Nile Fever. 2013.
- West Nile Virus. 2005. Institut de Veille Sanitaire.
- Westaway, E. G., Khromykh, A. A. and Mackenzie, J. M. (1999) 'Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes', *Virology*, 258(1), pp. 108-17.
- WHO 2011. West Nile Virus.
- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., López-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M. and Parks, W. C. (1999) 'Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense', *Science*, 286(5437), pp. 113-7.
- Wilson, S. S., Wiens, M. E. and Smith, J. G. (2013) 'Antiviral mechanisms of human defensins', *J Mol Biol*, 425(24), pp. 4965-80.
- Wolf, R., Ruzicka, T. and Yuspa, S. H. (2011) 'Novel S100A7 (psoriasin)/S100A15 (koebnerisin) subfamily: highly homologous but distinct in regulation and function', *Amino Acids*, 41(4), pp. 789-96.
- Wong, J. H., Legowska, A., Rolka, K., Ng, T. B., Hui, M., Cho, C. H., Lam, W. W., Au, S. W., Gu, O. W. and Wan, D. C. (2011) 'Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1', *Peptides*, 32(6), pp. 1117-22.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W. and Oppenheim, J. J. (2002) 'Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal', *Trends Immunol*, 23(6), pp. 291-6.
- Yang, D., Chertov, O. and Oppenheim, J. J. (2001) 'Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37)', *J Leukoc Biol*, 69(5), pp. 691-7.
- Yasin, B., Wang, W., Pang, M., Cheshenko, N., Hong, T., Waring, A. J., Herold, B. C., Wagar, E. A. and Lehrer, R. I. (2004) 'Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry', *J Virol*, 78(10), pp. 5147-56.
- Zhu, L., Okano, S., Takahara, M., Chiba, T., Tu, Y., Oda, Y. and Furue, M. (2013) 'Expression of S100 protein family members in normal skin and sweat gland tumors', *J Dermatol Sci*, 70(3), pp. 211-9.

ANNEXES

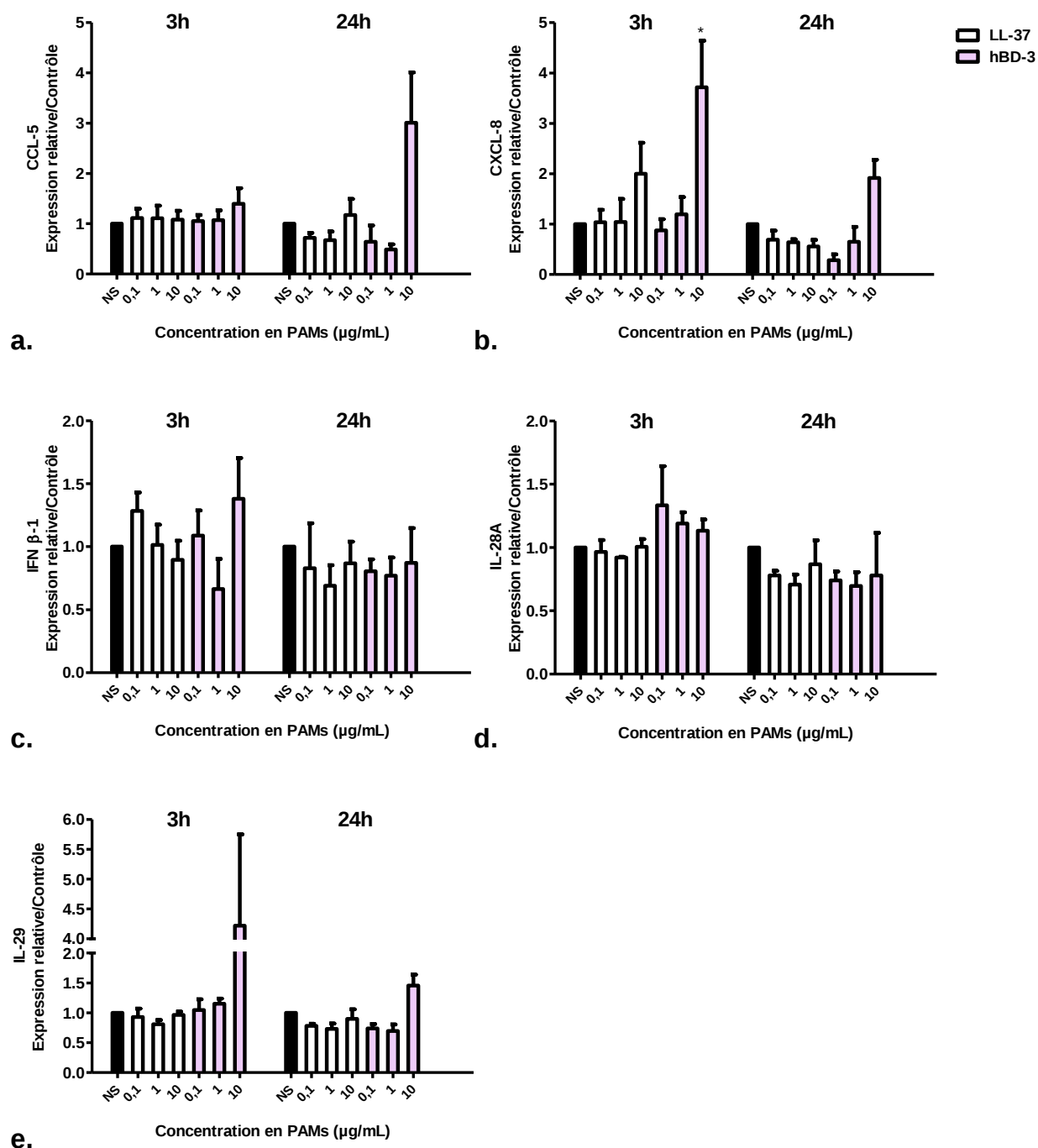


Figure S1 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des ARNm codant différents marqueurs de la réponse immunitaire. Sont représentées les quantités relatives de transcrits codant CCL-5 (a.), CXCL-8 (b.), IFN β-1 (c.), IL-28A (d.) et IL-29 (e.) dans des kératinocytes primaires humains incubés, en absence ou en présence de LL-37 et hBD-3, à des concentrations de 0,1, 1 ou 10 μg/mL, pendant 3h et 24h. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne et l'écart type d'au moins 5 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées au contrôle (NS), qui correspond à des kératinocytes non stimulés, par un test de Wilcoxon (*p<0,05).

	CCL-5	CXCL-8	IFN β-1	IL-28A	IL-29
	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET
a.					
Poly (I:C) 0,1 μg/mL 3h	2,3 $\pm$ 0,45	1,6 $\pm$ 0,20	16 $\pm$ 7,6	38 $\pm$ 21	1,5 $\pm$ 0,40
LL-37 0,1 μ g/mL 3h	1,1 $\pm$ 0,19	1,0 $\pm$ 0,24	1,3 $\pm$ 0,15	0,97 $\pm$ 0,094	0,93 $\pm$ 0,14
LL-37 0,1 μg/mL + Poly (I:C) 3h	6,2 $\pm$ 3,2	7,0 $\pm$ 4,2	46 $\pm$ 26	111 $\pm$ 73	1,2 $\pm$ 0,20
LL-37 1 μ g/mL 3h	1,1 $\pm$ 0,25	1,0 $\pm$ 0,46	1,0 $\pm$ 0,16	3,8 $\pm$ 2,9	0,81 $\pm$ 0,073
LL-37 1 μg/mL + Poly (I:C) 3h	5,3 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 5,3	84 $\pm$ 67	309 $\pm$ 281	1,5 $\pm$ 0,70
LL-37 10 μ g/mL 3h	1,1 $\pm$ 0,18	2,0 $\pm$ 0,62	0,90 $\pm$ 0,15	1,0 $\pm$ 0,061	0,97 $\pm$ 0,053
LL-37 10 μg/mL + Poly (I:C) 3h	20 $\pm$ 7,2	12 $\pm$ 3,0	165 $\pm$ 107	314 $\pm$ 151	7,0 $\pm$ 3,2
hBD-3 0,1 μ g/mL 3h	1,1 $\pm$ 0,12	0,088 $\pm$ 0,22	1,1 $\pm$ 0,20	1,3 $\pm$ 0,31	1,0 $\pm$ 0,18
hBD-3 0,1 μg/mL + Poly (I:C) 3h	4,9 $\pm$ 2,7	1,9 $\pm$ 0,70	97 $\pm$ 81	278 $\pm$ 254	2,1 $\pm$ 1,0
hBD-3 1 μ g/mL 3h	1,1 $\pm$ 0,20	1,2 $\pm$ 0,34	2,1 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 1,0	1,2 $\pm$ 0,084
hBD-3 1 μg/mL + Poly (I:C) 3h	17 $\pm$ 6,4	17 $\pm$ 5,5	171 $\pm$ 60	572 $\pm$ 192	4,1 $\pm$ 1,5
hBD-3 10 μ g/mL 3h	1,4 $\pm$ 0,30	3,7 $\pm$ 0,93	1,4 $\pm$ 0,32	2,9 $\pm$ 1,3	7,6 $\pm$ 3,6
hBD-3 10 μg/mL + Poly (I:C) 3h	47 $\pm$ 21	12 $\pm$ 2,8	107 $\pm$ 68	544 $\pm$ 308	15 $\pm$ 8,3
b.					
	CCL-5	CXCL-8	IFN β-1	IL-28A	IL-29
	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET
Poly (I:C) 0,1 μg/mL 24h	457 $\pm$ 193	15 $\pm$ 5,5	9,0 $\pm$ 3,8	19 $\pm$ 10	54 $\pm$ 33
LL-37 0,1 μ g/mL 24h	0,72 $\pm$ 0,099	0,69 $\pm$ 0,18	0,83 $\pm$ 0,36	0,78 $\pm$ 0,037	0,78 $\pm$ 0,037
LL-37 0,1 μg/mL + Poly (I:C) 24h	133 $\pm$ 35	9,5 $\pm$ 4,9	8,2 $\pm$ 4,5	40 $\pm$ 32	43 $\pm$ 33
LL-37 1 μ g/mL 24h	0,67 $\pm$ 0,17	0,64 $\pm$ 0,055	0,69 $\pm$ 0,16	0,71 $\pm$ 0,080	0,73 $\pm$ 0,088
LL-37 1 μg/mL + Poly (I:C) 24h	127 $\pm$ 31	13 $\pm$ 7,7	8,7 $\pm$ 5,3	32 $\pm$ 26	68 $\pm$ 57
LL-37 10 μ g/mL 24h	1,2 $\pm$ 0,32	0,87 $\pm$ 0,33	0,87 $\pm$ 0,17	0,87 $\pm$ 0,19	0,90 $\pm$ 0,16
LL-37 10 μg/mL + Poly (I:C) 24h	1656 $\pm$ 620	567 $\pm$ 27	20 $\pm$ 7,9	222 $\pm$ 73	93 $\pm$ 17
hBD-3 0,1 μ g/mL 24h	0,64 $\pm$ 0,32	0,28 $\pm$ 0,11	0,81 $\pm$ 0,093	0,74 $\pm$ 0,072	0,74 $\pm$ 0,072
hBD-3 0,1 μg/mL + Poly (I:C) 24h	207 $\pm$ 62	19 $\pm$ 16	15 $\pm$ 7,9	85 $\pm$ 59	163 $\pm$ 102
hBD-3 1 μ g/mL 24h	0,49 $\pm$ 0,10	0,65 $\pm$ 0,30	0,77 $\pm$ 0,14	0,70 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,11
hBD-3 1 μg/mL + Poly (I:C) 24h	198 $\pm$ 113	8,1 $\pm$ 5,9	5,5 $\pm$ 2,2	42 $\pm$ 31	125 $\pm$ 86
hBD-3 10 μ g/mL 24h	3,0 $\pm$ 1,0	6,9 $\pm$ 5,0	0,87 $\pm$ 0,28	0,78 $\pm$ 0,34	1,5 $\pm$ 0,18
hBD-3 10 μg/mL + Poly (I:C) 24h	187 $\pm$ 61	7,5 $\pm$ 3,6	48 $\pm$ 21	219 $\pm$ 112	8,1 $\pm$ 4,6

Tableau S2 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des cinq marqueurs inflammatoires. Sont indiquées les quantités relatives de transcrits de CCL-5, CXCL-8, IFN β -1, IL-28A et IL-29 dans des kératinocytes primaires humains stimulés par le poly (I:C) à 0,1 μ g/mL, en présence ou en absence de LL-37 et hBD-3 à 0,1, 1 et 10 μ g/mL pendant 3h (**a**) et 24h (**b**). Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne (Moy.) et à l'écart type (ET) de 5 expériences indépendantes.

	CCL-5	CXCL-8	IFN β-1	IL-28A	IL-29
	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET
a. WNV MOI = 0,1 24h	5,3 $\pm$ 2,8	6,5 $\pm$ 4,7	14 $\pm$ 6,1	24 $\pm$ 12	13 $\pm$ 8,3
LL-37 1 μ g/mL + WNV 24h	4,5 $\pm$ 2,8	6,0 $\pm$ 4,6	41 $\pm$ 28	32 $\pm$ 18	4,9 $\pm$ 3,1
LL-37 10 μg/mL + WNV 24h	3,5 $\pm$ 2,1	12 $\pm$ 7,4	18 $\pm$ 15	6,8 $\pm$ 3,7	5,2 $\pm$ 4,0
hBD-3 1 μ g/mL + WNV 24h	7,1 $\pm$ 4,9	8,2 $\pm$ 5,6	36 $\pm$ 29	68 $\pm$ 38	6,7 $\pm$ 3,6
hBD-3 10 μg/mL + WNV 24h	13 $\pm$ 6,5	35 $\pm$ 28	115 $\pm$ 97	113 $\pm$ 59	7,5 $\pm$ 5,3

	CCL-5	CXCL-8	IFN β-1	IL-28A	IL-29
	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET	Moy. $\pm$ ET
WNV MOI = 0,1 48h	25 $\pm$ 14	1,3 $\pm$ 0,23	15 $\pm$ 5,1	67 $\pm$ 26	7,4 $\pm$ 4,6
LL-37 1 μ g/mL + WNV 48h	61 $\pm$ 33	2,8 $\pm$ 0,69	50 $\pm$ 34	221 $\pm$ 166	9,2 $\pm$ 4,8
LL-37 10 μg/mL + WNV 48h	21 $\pm$ 15	6,8 $\pm$ 1,9	55 $\pm$ 41	260 $\pm$ 234	6,7 $\pm$ 3,2
hBD-3 1 μ g/mL + WNV 48h	65 $\pm$ 31	3,3 $\pm$ 0,84	64 $\pm$ 41	413 $\pm$ 313	12 $\pm$ 6,2
hBD-3 10 μg/mL + WNV 48h	78 $\pm$ 42	22 $\pm$ 5,0	168 $\pm$ 96	987 $\pm$ 670	16 $\pm$ 7,7

Tableau S3 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de CCL-5, CXCL-8, IFN β -1, IL-28A et IL-29. Sont indiquées les quantités relatives de transcrits dans des kératinocytes primaires humains infectés par le WNV à une MOI=0,1 en présence de LL-37 et hBD-3 à 1 et 10 μ g/mL après 24h (**a**) et 48h (**b**) d'infection. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage cellulaires (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne (Moy.) et à l'écart type (ET) de 7 expériences indépendantes.

RESUME

Contexte : Le Virus West Nile (WNV) est un arbovirus émergeant. Au cours de l'infection, la peau, et plus particulièrement les kératinocytes, constituants cellulaires majoritaires de l'épiderme, représentent le site initial de la réplication virale mais également la première ligne de défense de l'organisme. Pour lutter contre l'infection, les kératinocytes sécrètent des cytokines, des chimiokines et des peptides antimicrobiens (PAMs). Diverses études ont démontré les propriétés immunomodulatrices et antivirales des PAMs cutanés, mais leur rôle au cours de l'infection par le WNV reste inconnu.

Objectifs : Le but de notre étude a été d'explorer les propriétés immunomodulatrices et antivirales de deux des sept peptides antimicrobiens sécrétés par le kératinocyte humain, la cathélicidine LL-37 et la bêta-défensine (hBD) 3, lors de l'infection par le WNV.

Matériels et Méthodes : Des kératinocytes primaires humains ont été stimulés avec de l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly (I:C)), ARN double-brin mimant un intermédiaire de réplication présent lors du cycle viral, ou infectés par le WNV à une multiplicité d'infection de 0,1, pendant 3h, 24h et 48h, en présence ou en l'absence de LL-37 ou hBD-3, à des concentrations de 0,1, 1 ou 10 µg/mL. Une étude transcriptomique de cinq marqueurs de l'inflammation, l'IFN β-1, les IFNs λ (IL-28A et IL-29) et les chimiokines CXCL-8 et CCL-5, a été réalisée par RT-PCR quantitative. La sécrétion de CXCL-8 a été étudiée par dosage ELISA dans le surnageant de culture des kératinocytes stimulés par le poly (I:C). Enfin, les propriétés antivirales des PAMs aux concentrations de 1, 10 ou 40 µg/mL ont été évaluées grâce à la mesure de la charge virale dans le surnageant de culture des kératinocytes infectés par RT-PCR quantitative et par titrage sur cellules Vero.

Résultats : L'incubation des kératinocytes en présence des PAMs seuls n'induisait pas l'expression des ARNm des marqueurs de l'inflammation. L'expression des cinq marqueurs étudiés était en revanche stimulée par le poly (I:C) ou le WNV par des facteurs multiplicateurs variant de 9 à 450. Cette expression pouvait être potentialisée entre 4.5 et 20 fois par l'ajout de LL-37 ou d'hBD-3. A forte concentration, les deux peptides empêchaient la réplication virale dans les kératinocytes. LL-37 réduisait même le titre de particules virales infectieuses après 2h de pré incubation.

Conclusion : Nos résultats démontrent que LL-37 et hBD-3, disposent de propriétés immunomodulatrices capables de renforcer la réponse immunitaire innée antivirale du kératinocyte contre l'infection par le virus West Nile. De plus, à forte concentration ils présentent des propriétés antivirales vis-à-vis du WNV dont le mode d'action reste à préciser.

Mots clés : Virus West Nile, kératinocytes, cathélicidine, bêta défensine de type 3, immunomodulation, antiviral.

SERMENT DE GALIEN

~~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.