



Construction d'un clone infectieux d'une souche méditerranéenne du Virus West Nile, validation de ses propriétés biologiques et développement de nouveaux modèles d'évaluation de la virulence

Céline Bahuon

► To cite this version:

Céline Bahuon. Construction d'un clone infectieux d'une souche méditerranéenne du Virus West Nile, validation de ses propriétés biologiques et développement de nouveaux modèles d'évaluation de la virulence. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114828 . tel-00747842

HAL Id: tel-00747842

<https://theses.hal.science/tel-00747842>

Submitted on 2 Nov 2012

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : ED 425

Innovation Thérapeutique : Du Fondamental A l'Appliqué

Laboratoire de l'UMR virologie (Anses, ENVA, INRA)

DISCIPLINE

Microbiologie et Thérapeutique Anti-Infectieuse

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

soutenue le 14/09/2012

par

Céline Bahuon

Construction d'un clone infectieux d'une souche méditerranéenne du Virus West Nile, validation de ses propriétés biologiques et développement de nouveaux modèles d'évaluation de la virulence

Directeur de thèse : Dr Stéphane ZIENTARA Directeur d'UMR (Anses)

Co-directeur de thèse : Dr Sylvie LECOLLINET Chef d'équipe (Anses)

Composition du jury :

Président du jury : Dr Audrey ESCLATINE Maître de conférence (Paris 11)

Rapporteurs : Dr Daniel GONZALEZ-DUNIA Directeur de Recherche (INSERM)

Pr Pierre-Emmanuel CECCALDI Directeur de Recherche (Institut Pasteur)

Examineurs : Dr Nadia HADDAD Maître de conférence (ENVA)
Dr Thierry LEFRANCOIS Directeur de Recherche (CIRAD)

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR 1161 de Virologie, ANSES-INRA-ENVA

Dans l'équipe Neurovirologie des Zoonoses

Sous la direction de Stéphane Zientara

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, M. Daniel GONZALEZ-DUNIA, M Pierre-Emmanuel CECCALDI pour avoir accepté de corriger le manuscrit en tant que rapporteur et, Mme Audrey ESCLATINE, Mme Nadia HADDAD, M Thierry LEFRANCOIS, Mme Sylvie LECOLLINET et M Stéphan ZIENTARA qui ont accepté de juger ce travail.

Aux professeurs Anne COLLIGNON et Marc PALLARDY pour leur accompagnement au sein de l'Ecole Doctorale 425, pendant ces 4 années.

Je remercie chaleureusement Stéphan Zientara, responsable de l'UMR 1161 et Sylvie Lecollinet, co-responsable de l'équipe Neurovirologie des zoonoses, de m'avoir encadrée et soutenue lors des diverses péripéties de la construction du clone infectieux ainsi que de la soumission de l'article.

Merci à tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail :

Sylvie pour ta patience à toute épreuve, et il en faut avec mon fichu caractère !

Steeve pour son soutien technique et sa patience

Josiane pour son aide pour les ELISA

Cécile pour sa bonne humeur

Et enfin à l'ensemble de l'équipe pour m'avoir déchargée du mieux possible des contraintes du laboratoire de référence pendant cette période. Je vous promets de vous soulager à mon tour maintenant que la thèse est terminée !

Je remercie l'équipe de l'Institut Pasteur, Philippe, Nathalie, Eva pour m'avoir conseillée pour la construction du clone infectieux et aussi pour m'avoir fourni du matériel biologique.

Un grand merci à Serge qui m'a bien aidé sur les prélèvements et les euthanasies de souris !! Sans toi, je n'y serai jamais arrivée !

Manu et l'équipe FCO pour la couveuse et les œufs ☺

Merci à Margot, Raph, Elodie, Emilie, Coraline, Jérôme etc... pour les soirées bien arrosées à Châtelet, des moments de détente indispensables.

Kamila pour ses soirées Twin Peaks/Pizza et son soutien moral!

Jennifer pour sa disponibilité pour la correction de mon anglais dans l'article et son aide pour les différentes soumissions, et contestations !!

Muriel et Emilie pour leurs connaissances sur le monde passionnant des neurones !

Enfin, merci à mes parents, à Juliette, pour m'avoir soutenue moralement quand les résultats n'étaient pas au rendez-vous.

Et surtout un grand merci à Jean-Philippe qui s'est intéressé à mon travail dès le début, à l'avancée de l'article puis du mémoire, qui a regardé mes exposés, un soutien indispensable !

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Liste des abréviations	10
Liste des figures	14
Liste des tableaux	17
Liste des cartes	18
INTRODUCTION	19
PARTIE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE VIRUS WEST NILE ET LES SYSTEMES DE GENETIQUE INVERSE	21
<u>Chapitre 1 : Le virus West Nile</u>	22
1- <u>Le virus</u>	23
1-1 Classification virale	23
1-2 La particule virale	23
1-3 Le génome viral	25
<u>1-3-1 Les protéines structurales</u>	26
<i>1-3-1-1 La protéine de capside</i>	26
<i>1-3-1-2 La protéine de membrane</i>	27
<i>1-3-1-3 La protéine d'enveloppe</i>	28
<u>1-3-2 Les protéines non structurales</u>	30
<i>1-3-2-1 NS1</i>	30
<i>1-3-2-2 NS2A et NS2B</i>	31
<i>1-3-2-3 NS3</i>	32
<i>1-3-2-4 NS4A, 2K et NS4B</i>	32
<i>1-3-2-5 NS5</i>	33
<u>1-3-3 les régions non codantes</u>	34
<i>1-3-3-1 La région 5' non codante</i>	34
<i>1-3-3-2 La région 3' non codante</i>	34

1-4 Le cycle viral	34
<u>1-4-1 Entrée virale</u>	34
<u>1-4-2 Cycle cytoplasmique</u>	35
1-4-2-1 Libération de l'ARN génomique et traduction de la polyprotéine	35
1-4-2-2 Réplication	37
1-4-2-3 L'assemblage des particules virales	39
1-4-2-4 Figure récapitulative	40
2- <u>Cycle de transmission du virus</u>	41
3- <u>Infection à VWN chez les oiseaux et les mammifères</u>	46
3-1 Les voies d'entrée du virus	48
<u>3-1-1 L'inoculation virale cutanée</u>	48
<u>3-1-2 L'infection des motoneurones</u>	48
<u>3-1-3 Une transmission verticale est-elle possible</u>	50
3-2 La réponse antivirale	50
<u>3-2-1 Rôle de l'immunité innée</u>	50
3-2-1-1 La reconnaissance du virus	51
3-2-1-2 La voie de signalisation des IFNs : la voie JAK/STAT	53
3-2-1-3 Les gènes de résistances au VWN	55
3-2-1-4 Cytokines impliquées dans la réponse innée	58
3-2-1-5 Cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée	59
<u>3-2-2 La réponse adaptative</u>	60
3-2-2-1 La réponse humorale	60
3-2-2-2 La réponse cellulaire, les lymphocytes T	62
<u>3-2-3 Exemple chez l'oiseau du rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'infection à VWN et de l'effet de l'âge</u>	63
<u>3-2-4 Mécanismes d'évasion du VWN au système immunitaire de l'hôte</u>	64
3-3 L'infection du système nerveux	67
<u>3-3-1 Les différentes voies d'entrée dans le SNC</u>	67

<u>3-3-2 Rôle du système immunitaire dans l'entrée du virus dans le SNC</u>	71
<u>3-3-3 Physiopathologie de l'infection au sein du SNC</u>	72
3-3-3-1 Neuro-toxicité de la réaction immunitaire	72
3-3-3-2 Destruction neuronale	72
3-3-3-2-1 Rôle du virus	72
3-3-3-2-2 Rôle des cellules du SNC	73
3-3-3-2-3 Persistance du virus dans le SNC ?	74
3-3-3-2-4 Les signes cliniques	74
4- <u>Epidémiologie</u>	76
5- <u>Phylogénie</u>	81
<u>Chapitre 2 – Les outils de génétique inverse</u>	89
<u>1-Le réplicon</u>	89
<u>2-Le clone infectieux</u>	92
CADRE ET OBJECTIFS	99
PARTIE II : CONSTRUCTION D'UN CLONE INFECTIEUX DE LA SOUCHE IS-98-ST1 DU VIRUS WEST NILE ET VALIDATION DE NOUVEAUX MODELES D'EVALUATION DE LA VIRULENCE	103
<u>Chapitre 3 : Construction d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 du virus West Nile et validation des propriétés biologiques des virions recombinants <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></u>	104
<u>1- Introduction</u>	104
<u>2-Article soumis à Plos One</u>	105
<u>3-Discussion et conclusion</u>	135
<u>Chapitre 4 : Evaluation de nouveaux modèles d'étude de la virulence du VWN</u>	139
<u>1-Le modèle œuf embryonné de poulet</u>	139
1-1 Matériel et méthodes	139
<u>1-1-1 Cellules et virus</u>	139
<u>1-1-2 Les œufs</u>	140

<u>1-1-3 La RT-PCR quantitative</u>	140
<u>1-1-4 Analyse statistique</u>	141
1-2 Résultats	141
<u>1-2-1 Détermination de la dose létale 50</u>	141
<u>1-2-2 Evaluation de la mortalité suite à l'infection avec différentes souches</u>	142
<u>1-2-3 Quantification des charges virales dans les organes</u>	143
<u>1-2-4 Charges virales dans les cerveaux et cœurs des œufs infectés par les différentes souches testées</u>	145
<u>1-2-5 Observation anatomo-pathologiques</u>	146
1-3 Conclusion et discussion	147
<u>2- Le modèle neuroblastome humain</u>	149
2-1 Matériel et méthodes	149
<u>2-1-1 Cellules et virus</u>	149
<u>2-1-2 Les infections</u>	149
<u>2-1-3 La RT-PCR quantitative</u>	150
2-2 Résultats	150
2-3 Conclusion et discussion	152
<u>Chapitre 5- Discussion et perspectives</u>	154
<u>1-Discussion</u>	154
1-1 Obtention d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 du virus West Nile	154
<u>1-1-1 Mutation ponctuelle</u>	155
<u>1-1-2 Chimère</u>	158

1-2 Réalisation de deux nouveaux modèles d'évaluation de la virulence des souches	162
<u>2- Perspectives</u>	164
2-1 L'identification des déterminants moléculaires de la virulence du virus permettra d'établir des cibles de choix pour la mise au point d'inhibiteurs	164
2-2 Le clone infectieux permettra de participer au développement de vaccins atténués	165
2-3 Amélioration de la vigilance envers l'émergence de nouvelles souches	166
CONCLUSION	167
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169
ANNEXE	209

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	degrés Celsius
μF	microfarad
μg	microgramme
μl	microlitre
Å	Angström
A549	cellules épithéliales humaines
AcN	Anticorps Neutralisants
ADAR	adénosines désaminases ARN-spécifiques
ADNc	Acide Désoxyribo Nucléique complémentaire
AMCR	AMerican Crow
AMP	Anti Microbial Peptide (Peptide Anti Microbien)
	Agence Nationale chargée de la Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
ANSES	
AP61	Cellule d'insecte (moustique <i>Aedes pseudoscutellaris</i>)
APC	Antigen Presenting Cell (Cellule Présentatrice d'Antigène)
ARN	Acide Ribo Nucléique
ARNase	Ribonucléase
ARNdb	ARN double brin
ARNsb	ARN simple brin
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Adénosine Tri Phosphatase
AvBD	défensines-β aviaires
BAGV	Bagaza Virus (Virus Bagaza)
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
bp	base pair (paire de base)
C	capside
C6/36	cellules d'insecte (moustique <i>Aedes albopictus</i>)
CAM	Cell Adhesion Molecules
cDNA	complementary Desoxyribo Nucleic Acid
CLR	C-type lectin Receptor (récepteur à lectine de type C)
cm	centimètre
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cyto Megalo Virus
CNS	Central Nervous System (système nerveux central)
CPE	CytoPathic Effect (Effet Cyto Pathogène)
CTHL	cathélicidines
DC	Dentritic Cell (Cellule Dendritique)
Dcr-2	Dicer-2
DC-	
SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DC-	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
SIGNR	Receptor
DENV	Dengue Virus (Virus de la Dengue)
DIII	Domaine III de la protéine d'enveloppe
DL50	Dose Létale 50
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dnase	Désoxyribonucléase
E	enveloppe
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Control
EDTA	EthylèneDiamnine Tetraacetic Acid
eIF	eucaryotic Initiation Factor (facteur eucaryotique d'initiation de la traduction)
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
FBS	Fetal Bovine Serum (Serum de Veau Fétal)
FMDV	Foot and Mouth Disease Virus (Virus de la Fièvre Aphteuse)
GTPase	Guanosine Tri Phosphatase
h	heure
HBMVE	Human brain microvascular endothelial cells
HDVR	Hepatitis delta Virus Ribozyme (Ribozyme du virus de l'Hépatite delta)
i.p	intra péritonéal
IC	Infectious Clone
IFA	ImmunoFluorescence Assay
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL	InterLeukine
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF	Interferon Response Factor
IS-98-	
ST1	souche Israël 1998 du virus West Nile, isolée à partir d'une cigogne (stork)
ISG	IFN Stimulated Gene
ISRE	IFN Stimulated Response Elements
It08	souche Italie 2008 du virus West Nile
J	Jour
JEV	Japananese Encephalitis Virus (Virus de l'Encéphalite Japonaise)
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
KUNV	Kunjin Virus (Virus Kunjin)
kV	kilo Volt
LC	Langerhans Cell (Cellule de Langerhans)
LCR	Liquide Céphalo Rachidien
M	membrane

MO03	souche Maroc 2003 du virus West Nile
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
MIF	Macrophage Inhibition Factor (facteur d'inhibition de la migration des macrophages)
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
MMP	métallo-protéinase de matrice
MOI	Multiplicity Of Infection (multiplicité d'infection)
Mtase	Méthyltransférase
MVEV	Murray Valley Encephalitis Virus (Virus de l'Encéphalite de la Vallée de Murray)
NC	Non Codant
ng	nanogramme
NS	protéines Non Structurales
nt	Nucléotide
NTPase	Nucléotide Phosphatase
NY99	souche New York 1999 du virus West Nile
OAS	2'-5' oligoadénylate synthétase
OIE	Office International des Epizooties
p.i	post infection
P0/P1	passage 0/ Passage 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PFU	Plaque Forming Unit (Unité Formant Plaque)
PGRP	PeptidoGlycan Receptor Protein (récepteur aux peptidoglycanes)
pH	potentiel Hydrogène
PMO	Phosphoro-diamidate Morpholino Oligomers
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
PRR	Pattern Recognition Receptor
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne en temps réel suite à une Transcription Inverse)
RC	Replication Complex (Complexe de Réplication virale)
RE	Réticulum Endoplasmique
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribo Nucleic Acid
RNAi	ARN interférent
RTPase	ARN triphosphatase
s	seconde
SK-N-SH	Lignée de neuroblastomes humains
SLEV	Saint-Louis Encephalitis Virus (Virus de l'Encepéhalite de Saint-Louis)
SNC	Système Nerveux Central
SP07	souche Espagne 2007 (Spain 2007) du virus West Nile
TJP	Tight Junction Proteins (protéines des jonctions serrées)

TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
U/ml	Unité par millilitre
UPEC	Université Paris Est Créteil
USUV	Usutu Virus (Virus Usutu)
UTR	UnTranslated Region
Vero	Cellules de reins de singes verts, <i>Cercopithecus aethiops</i>
VLP	Virus Like Particle
VWN	Virus West Nile
	Virus West Nile Encephalomyelitis (Encéphalomyélite associée à une infection au
VWNE	VWN)
W956	souche W956 du virus West Nile
WNV	West Nile Virus
WNV-	
IC	West Nile Virus Infectious Clone
YFV	Yellow Fever Virus (Virus de la Fièvre Jaune)

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1: Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile	24
Figure 2: Représentation schématique de la structure des particules virales	24
Figure 3: Représentation schématique de l'organisation du génome du VWN et de la traduction des protéines virales avec une indication de leur fonction	26
Figure 4: Maturation de la néo-particule virale	27
Figure 5: Représentation de la structure de la protéine d'enveloppe	29
Figure 6: Représentation de la forme trimérique de E	30
Figure 7: Mécanisme de fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire par endocytose	35
Figure 8 : Structure du génome viral et expression de la polyprotéine	36
Figure 9: Le complexe de réplication	37
Figure 10: Couplage de la traduction, de la réplication et de l'assemblage des particules virales	38-39
Figure 11: Représentation schématique du cycle de multiplication virale du VWN	40
Figure 12: Cycle de transmission du virus West Nile	45
Figure 13: Mécanismes de la neuro-invasion par le VWN	47
Figure 14: Schéma d'une coupe transversale au niveau d'une vertèbre cervicale	49
Figure 15: Mécanismes de la réponse innée induits par les PRR	53
Figure 16: Les différentes voies d'activation par les IFNs	54
Figure 17: Activation de la voie des 2'5'oligoadénylate synthétases	56
Figure 18: Fonctions biochimiques de protéines induites par la voie IFN	58
Figure 19: Cinétique du virus et des anticorps IgM et IgG au cours d'une infection par le virus West Nile	61
Figure 20: Voie de signalisation IFN et mécanismes d'évasion du VWN	65-66
Figure 21: Schéma de la barrière hémato-encéphalique	68

Figure 22: Histopathologie, expression antigénique et infiltration leucocytaire suite à une infection à VWN chez la souris	70
Figure 23: Arbre phylogénétique	82
Figure 24: Arbre phylogénétique du lignage 1	83
Figure 25: Arbre phylogénétique des lignages 1 à 5	86-87

Chapitre 3

Figure legend 1: Schematic representation of the cloning strategy.	125
Figure legend 2: <i>in vitro</i> validation of the biological properties of the IC virus.	126
Figure legend 3: <i>in vivo</i> validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, survival curves.	127
Figure legend 4: <i>in vivo</i> validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, viremia.	128
Figure legend 5: <i>in vivo</i> validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, viral load.	129
Figure legend 6: <i>in vivo</i> validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, histology.	130
Figure legend 7: <i>in vivo</i> validation of the biological properties of the IC virus in resistant mice.	131
Figure legend 8: Viral load in different organs of chicken embryo infected with IS-98-ST1 WNV.	132
Figure legend 9: <i>in vivo</i> validation of the biological properties of the IC virus in chicken embryo.	133
Supplementary data: Survival curves of chicken embryos infected with parental IS-98-ST1 virus.	134

Chapitre 4

Figure 26: Charge virale dans les organes d'œufs embryonnés de poulet infectés par le VWN à J4 p.i. 144

Figure 27: Charges virales dans le cerveau ou le cœur d'œufs embryonnés infectés par différentes souches de VWN à J4 p.i. 145

Figure 28: Lésions macroscopiques observées sur des embryons de poulet à J4 post infection. 146

Figure 29: Cinétiques de réplication virale sur des cellules SK-N-SH. 151

Chapitre 5

Figure 30: Courbe de mortalité de perdrix rouges infectées par le VWN. 157

Figure 31: Comparaison des courbes de mortalité de souris infectées avec la souche IS-98-ST1 ou Italie 08. 159

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

Tableau 1: Tableau récapitulatif des travaux effectués sur des clones infectieux du virus West Nile.	95-97
---	--------------

Chapitre 4

Tableau 2: suivi sur 7 jours de la mortalité d'œufs embryonnés de 10 jours.	141
Tableau 3: Suivi de la mortalité de groupes de 6 œufs de 10 jours inoculés avec 1 PFU de virus.	143

Chapitre 5

Tableau 4: Comparaison des séquences de différentes souches en position 249 dans NS3 et évaluation de la DL₅₀.	156
Tableau 5: Comparaisons des séquences en acides aminés des souches NY99, Ken98, SP07, MO03, It08 avec IS-98-ST1.	160-161
Tableau 6: Moyenne des niveaux d'expression de gènes durant le développement embryonnaire du poulet	163

LISTE DES CARTES

Chapitre 1

Carte 1: **Répartition mondiale du VWN.** 78

Carte 2: **Flambée de cas cliniques d'infection par le virus West Nile en Europe en 2010 et 2011.** 79

INTRODUCTION

Le virus West Nile (VWN) est un arbovirus (pour « Arthropod-Borne Virus ») transmis par piqûre de moustiques, appartenant au genre des *Flavivirus* et l'agent de la fièvre West Nile ou fièvre du Nil occidental. Le réservoir naturel du VWN est constitué de la faune aviaire sauvage. Les hôtes mammifères représentent un cul de sac épidémiologique. Parmi les mammifères, l'Homme et les équidés sont les plus sensibles, développant des symptômes neurologiques sévères dans 1 à 10 % des cas. Le VWN circule en Europe et dans le bassin méditerranéen depuis une longue période et a été à l'origine de nombreuses épidémies humaines et épizooties équine depuis la fin des années 1990 en Europe et plus largement dans le monde.

Une des spécificités de la situation épidémiologique européenne est la présence d'une grande diversité de souches, appartenant à au moins 5 lignages (principalement au lignage 1). Cette situation évolue avec l'apparition et l'expansion d'une infection à lignage 2 pathogène (Hongrie 2008, Grèce 2010) ainsi qu'avec la conquête de nouveaux territoires par le lignage 1a (Italie 2008/2009, Albanie, Macédoine...). La souche IS-98-ST1 a été isolée suite à l'une des plus importantes épidémies ayant touché le bassin méditerranéen, en Israël en 1998 (Lucas *et al.*, 2004). A ce jour, il reste beaucoup à explorer sur les propriétés neuroinvasives et les déterminants moléculaires de la virulence concernant les souches circulant en Europe.

Notre projet vise à mieux connaître les déterminants moléculaires de la virulence du VWN, en étudiant l'impact de mutations ou de gènes *in vivo* mais aussi *in vitro*, par le développement de modèles permettant d'étudier l'effet direct du virus en l'absence d'intervention du système immunitaire. Pour atteindre cet objectif, nous avons construit un clone infectieux de la souche européenne IS-98-ST1.

Le présent mémoire est organisé en deux parties, la première partie correspondant à l'état des connaissances bibliographiques sur le VWN (chapitre 1), et sur l'état de l'art concernant les outils de génétique inverse chez les *Flavivirus*, en particulier du VWN (chapitre 2).

Les résultats des travaux sont présentés dans la seconde partie du manuscrit intitulé «Construction d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 du virus West Nile et validation de nouveaux modèles d'évaluation de la virulence ». Le chapitre 3 est consacré aux étapes de construction du clone infectieux de la souche IS-98-ST1 du VWN et de la validation de ses propriétés biologiques à la fois *in vitro* et *in vivo*. Le chapitre 4 se consacrera au développement de deux nouveaux modèles d'étude portant sur des hôtes d'intérêt du VWN: un modèle *in vivo* aviaire, le modèle œuf embryonné de poulet et un modèle neuronal humain *in vitro*, le modèle neuroblastome. Ce chapitre exposera la pertinence de ces modèles en termes d'évaluation de la virulence suite aux premiers résultats obtenus lors d'infection avec différentes souches. Enfin, le 5^{ème} et dernier chapitre du manuscrit présente une discussion générale des travaux réalisés et les perspectives envisagées.

PARTIE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR
LE VIRUS WEST NILE ET LES SYSTEMES DE
GENETIQUE INVERSE

Chapitre 1 : Le virus West Nile

L'existence du virus West Nile est connue depuis 1937, lorsqu'il a été isolé en Ouganda, dans la province du Nil Occidental (West Nile), à partir du sang d'une femme présentant un accès fébrile (Kramer *et al.*, 2007). Initialement, la fièvre WN était considérée comme une arbovirose mineure, essentiellement responsable chez l'homme d'infections asymptomatiques ou d'un syndrome pseudo-grippal et plus rarement d'encéphalites pouvant être mortelles. La situation a changé dans les années 1990 avec des épidémies incluant de nombreux cas humains, comme en Algérie (1994), en Roumanie (1996), en Tunisie (1997), en Israël (2000), et des cas équins au Maroc (1996), Italie (1998), Israël et France (2000) (Zeller et Schuffenecker, 2004). Un tournant majeur est atteint en 1999, lorsqu'une épidémie éclate à New York, sur un territoire vierge de VWN. 10 ans plus tard le virus est considéré comme endémique sur tout le territoire nord-américain. Près de 12000 cas humains de méningites ou d'encéphalites dont plus de 1000 infections fatales y ont été répertoriés. Une mortalité massive de la faune aviaire locale y a aussi été observée (Murray *et al.*, 2010). La souche isolée à New York est très proche de celle isolée en 1998 sur une cigogne en Israël avec 28 changements nucléotidiques impliquant 10 changements d'acides aminés (Malkinson *et al.*, 2002). De nombreuses études se sont attachées à la compréhension de la pathogénicité du VWN et de ses mécanismes/déterminants en utilisant des clones infectieux de souches africaines, B956 (Yamshchikov *et al.*, 2001a), australiennes, Kunjin (Liu *et al.*, 2003; Khromykh and Westaway, 1994) et surtout de la souche new-yorkaise, NY99 (Kinney *et al.*, 2006; Beasley *et al.*, 2005; Audsley *et al.*, 2011; Schlick *et al.*, 2009; Borisevich *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2002a), mais jamais sur une souche méditerranéo-européenne, comme la souche israélienne, IS-98-ST1. Or, le contexte européen est différent du contexte américain, à la fois au niveau de l'écologie (vecteurs, faune sauvage aviaire) et de l'épidémiologie (variété des souches plus importante en Europe (Zeller et Schuffenecker, 2004), absence d'immunité préexistante en Amérique contre une présence récurrente plus ancienne en Europe (Dauphin et Zientara, 2005). Nous verrons dans la suite du manuscrit ces différents aspects.

1- Le virus

1-1 Classification virale

Le VWN appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus*. Il fait partie d'un complexe de virus comprenant le virus de la fièvre jaune (YFV), à l'origine du nom du genre (*flavius* signifie « blond » en latin), le virus de la Dengue (DENV), ainsi que de virus à l'origine d'encéphalites comme l'encéphalite japonaise (JEV) qui circule en Asie, le virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV) rencontré en Amérique, ou le virus de *Murray Valley* (MVEV) rencontré en Australie. JEV, SLEV, MVEV et VWN appartiennent au séro-complexe de l'encéphalite japonaise. Récemment, des virus proches ont été identifiés en Europe : le virus Usutu (USUV), rencontré jusque là en Afrique, a été isolé en Autriche, en Hongrie, en Allemagne, en Suisse, en Italie et en Espagne (Weissenböck *et al.*, 2003 ; Bakonyi *et al.*, 2007 ; Steinmetz *et al.*, 2011 ; Becker *et al.*, 2012 ; Savini *et al.*, 2011 ; Busquets *et al.*, 2008) ; un nouveau virus émergent, le virus Bagaza (BAGV), a été identifié en Espagne en 2010 (Agüero *et al.*, 2011).

1-2 La particule virale

Les images de cryo-microscopie électronique révèlent des particules virales de symétrie icosaédrique de 50 nm de diamètre, sans spicules à leur surface (figure 1) (Kramer *et al.*, 2007). Il s'agit de virus enveloppés avec une capside formée d'une seule protéine, la protéine C, contenant une molécule d'ARN₍₊₎ d'environ 11kb. L'enveloppe est formée de deux protéines, une protéine d'enveloppe (E) et une protéine de membrane (M) dont l'agencement confère une apparence lisse (figures 1 et 2).

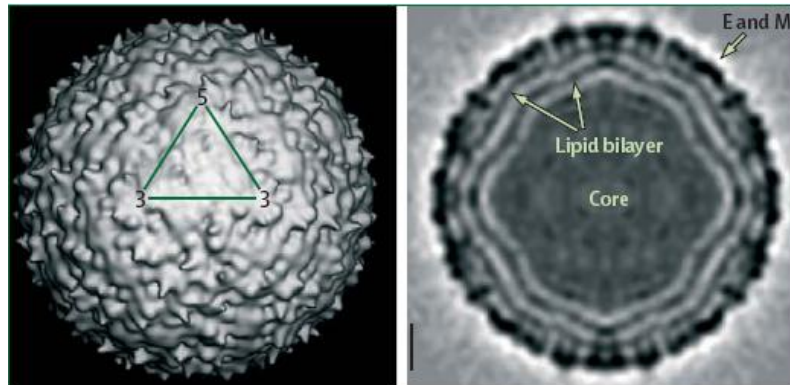


Figure 1: **Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile** (d'après Kramer *et al.*, 2007). A gauche, la structure du virion est reconstituée d'après les données de cryo-microscopie électronique. Le triangle à la surface de la structure indique une unité asymétrique d'icosaèdre. A droite, la reconstruction de la section centrale montre des couches concentriques de densité de masse correspondant à l'enveloppe. **Lipid bilayer** : bicouche lipidique, **Core** : noyau, **E and M** : E et M.

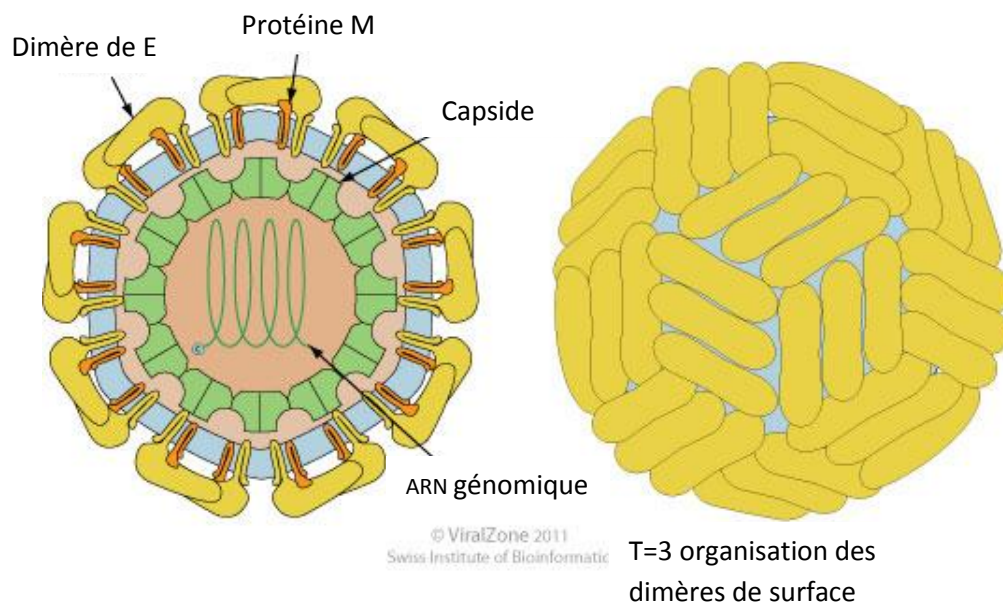


Figure 2: **Représentation schématique de la structure des particules virales** (d'après <http://viralzone.expasy.org>). A gauche, représentation des protéines d'enveloppe et de membrane à la surface de la particule virale. Les protéines de capside forment une structure protégeant l'ARN viral. A droite, représentation de l'organisation des dimères d'enveloppe à la surface du virion.

1-3 Le génome viral

Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin de 11 kb coiffé à son extrémité 5' (7-méthylguanosine), non polyadénylé en 3' (figure 3). Les régions non codantes (NC) en 5' et 3' sont conservées et forment des structures secondaires en épingle à cheveux, nécessaires pour la transcription, la traduction et l'empaquetage de l'ARN viral (Brault, 2009). Le génome complet est traduit en une polyprotéine qui est clivée pendant et après la traduction par des protéases cellulaires et virales. La partie 5' de la polyprotéine code pour les protéines structurales (C, prM, E) et la partie 3' pour les protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (figure 3). Les protéines structurales sont nécessaires pour l'encapsidation (par la protéine C) de l'ARN viral, et les protéines de surfaces (M et E) sont requises pour l'interaction et la fusion avec la cellule cible (Kimura *et al.*, 1988). M et E sont aussi à l'origine de la stimulation de la réponse lymphocytaire B et T (Campbell *et al.*, 2002 ; Sanchez *et al.*, 2005). La protéine d'enveloppe est la plus immunogène et induit la majorité des anticorps neutralisants (Sanchez *et al.*, 2005). Elle est constituée de trois domaines structuraux, parmi lesquels le domaine III est le plus immunogène. Les protéines non structurales jouent un rôle dans la réplication virale, l'assemblage des virions et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte (Kummerer et Rice, 2002; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003; Munoz-Jordan *et al.*, 2003; Pugachev *et al.*, 2004).

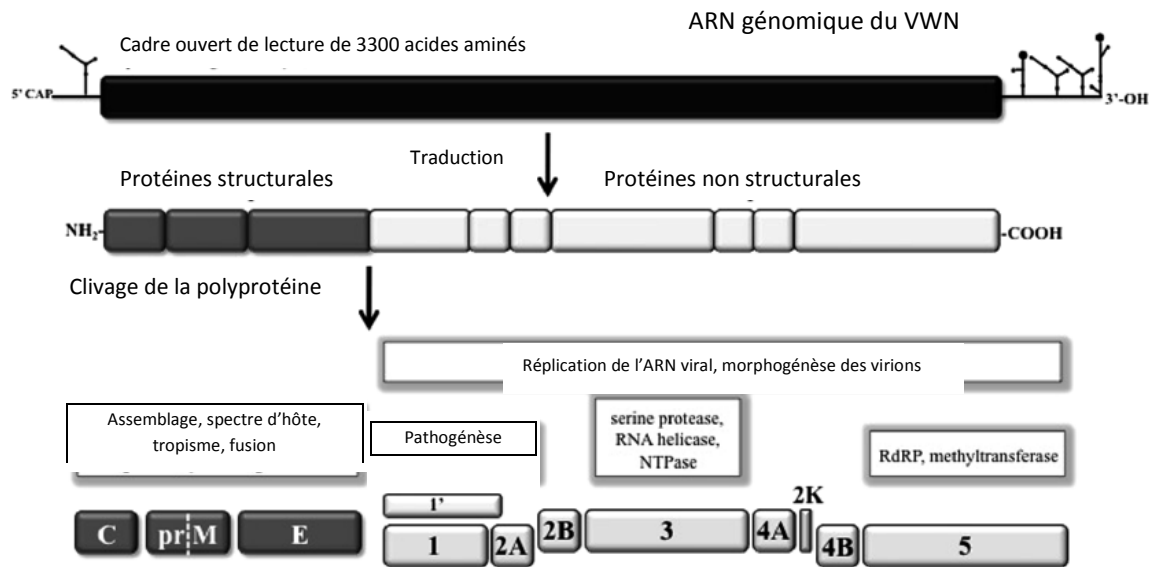


Figure 3: **Représentation schématique de l'organisation du génome du VWN et de la traduction des protéines virales avec une indication de leur fonction** (d'après Murray *et al.*, 2010). L'ARN génomique est capé en 5' et non polyadénylé en 3'. L'ARN code pour une polyprotéine de 3300 acides aminés ensuite clivée en 10 protéines virales : 3 protéines structurales (C, prM et E) et 7 protéines non structurales (NS1/NS1', NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Les protéines structurales jouent un rôle dans l'assemblage des particules virales, le spectre d'hôte, le tropisme et la fusion à la membrane de la cellule cible. Les protéines non structurales sont impliquées dans la réplication de l'ARN, et la morphogénèse virale.

1-3-1 Les protéines structurales

1-3-1-1 La protéine de capside

La protéine de capside (C) est une protéine hautement basique de 11 kDa (Lindenbach *et al.*, 2007). Les résidus chargés sont situés dans les régions N- et C-terminales, séparées par une région interne hydrophobe impliquée dans la structuration de la capside (Ma *et al.*, 2004). Le domaine C-terminal hydrophobe sert de peptide signal pour la translocation au réticulum endoplasmique (RE) de la protéine de membrane (M). Ce domaine est clivé de la protéine de capside mature par la serine protéase virale (NS3) (Lobigs *et al.*, 1993). Il n'est pas encore bien établi comment les dimères de C sont organisés au sein de la nucléocapside.

1-3-1-2 La protéine de membrane

Le précurseur glycoprotéique de 26 kDa (prM) de la protéine de membrane (M) est adressé au RE via le domaine C-terminal hydrophobe de C. La région N-terminale contient 1 à 3 sites de glycosylation, et 6 résidus cystéine conservés qui forment tous des ponts disulfure (Lindenbach *et al.*, 2007). prM se replie et participe au repliement correct de E (Konishi et Mason, 1993 ; Lorenz *et al.*, 2002). Une des fonctions essentielles de prM est de prévenir le réarrangement pH-dépendant de E lors de son transport dans la voie sécrétoire lors de la libération des nouvelles particules virales. La conversion des particules immatures en particules matures coïncide avec le clivage de prM en deux fragments, pr et M par la furine présente dans le Golgi (Stadler *et al.*, 1997). Suite au clivage, les hétérodimères prM-E se dissocient, le fragment pr est relargué et les homodimères de E se forment (figure 4).

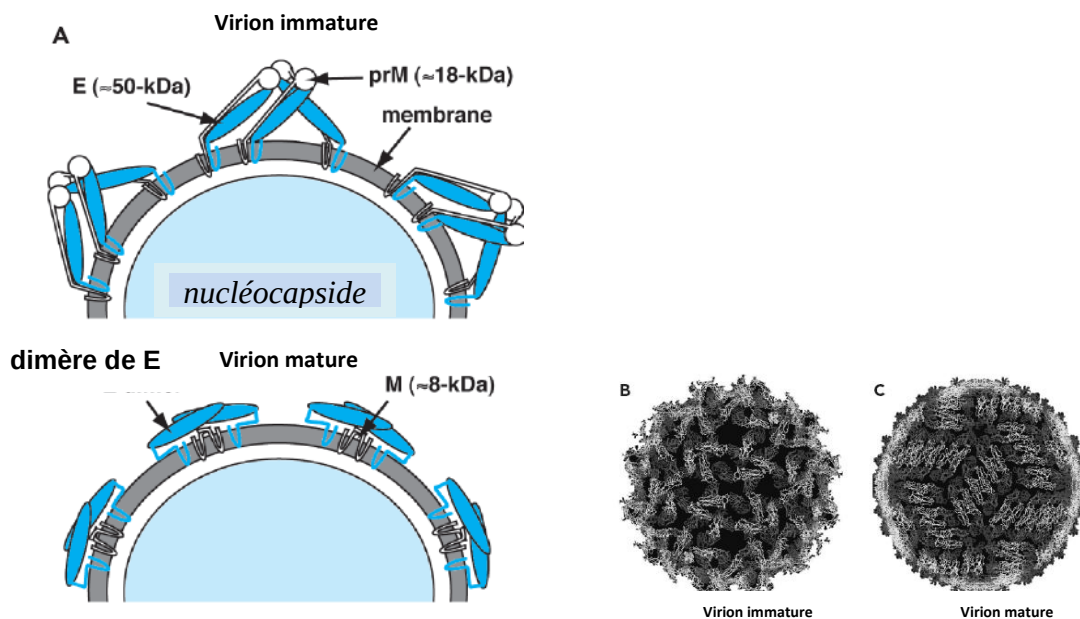


Figure 4: **Maturation de la néo-particule virale** (d'après Lindenbach *et al.*, 2007). La maturation du virion est accomplie lorsque la partie pr de la protéine prM est clivée et que le peptide de fusion de E est exposé. **E dimer** : dimère de E.

Des mutations affectant le nombre de résidus cystéine dans le fragment pr a pour conséquence la formation de virions sensibles à la température contenant des protéines prM intactes (Elshuber et Mandl, 2005)

1-3-1-3 La protéine d'enveloppe

La protéine d'enveloppe (E), 53 kDa, est la principale protéine à la surface du virion. Elle est impliquée dans la reconnaissance du récepteur et la fusion à la membrane plasmique. Les protéines sont glycosylées et organisées en domaines renfermant une boucle hydrophobe, le peptide de fusion permettant l'entrée virale. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Jang-hann Chu et Ng, 2004), le TLR3 (Wang *et al.*, 2004), DC-SIGN et DC-SIGNR (Davis *et al.*, 2006b) et la protéine de liaison à la laminine (Bogachek *et al.*, 2008) ont été identifiés comme des récepteurs potentiels du VWN. Des récepteurs différents sont impliqués dans l'infection des cellules de moustiques et des cellules de mammifères (Robinson *et al.*, 2006 ; Cheng *et al.*, 2010). E contient 12 résidus cystéine conservés qui forment des ponts disulfure. Il a été montré que E est une protéine hautement glycosylée et que sa glycosylation est un facteur déterminant dans la neuroinvasion du VWN (Beasley *et al.*, 2005). E se replie sous sa forme native en une structure allongée riche en feuillets β , et forme des homodimères disposés tête bêche (Lidenbach *et al.*, 2007). Chaque sous-unité de E est constituée de 3 domaines : le domaine I, le domaine II qui se projette le long de la surface du virion, et le domaine III qui maintient la conformation de l'ensemble (figure 5).

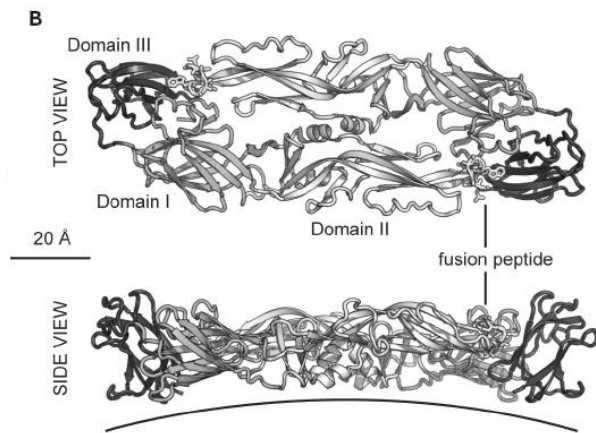


Figure 5: **Représentation de la structure de la protéine d'enveloppe** (forme homodimérique présente à la surface des particules virales matures) (d'après Lidenbach *et al.*, 2007). La figure montre une vue par-dessus et de côté de la protéine. La protéine d'enveloppe possède trois domaines dont le peptide de fusion. **Domain** : domaine, **fusion peptide** : peptide de fusion, **TOP VIEW** : vue du dessus, **SIDE VIEW** : vue de côté.

Le domaine III est impliqué dans la liaison au récepteur et représente la cible principale des anticorps neutralisants (Dauphin et Zientara, 2007). Lorsque le pH est acide (vésicule d'endocytose par exemple), les dimères se dissocient en monomères qui ensuite forment des trimères avec leurs peptides de fusion entièrement exposés vers la membrane avec laquelle la particule virale doit fusionner (figure 6). La trimérisation s'opère par une rotation du domaine III et un repliement d'un angle de 30 Å par rapport au domaine I et par une rotation du domaine II par rapport au domaine I (Lidenbach *et al.*, 2007).

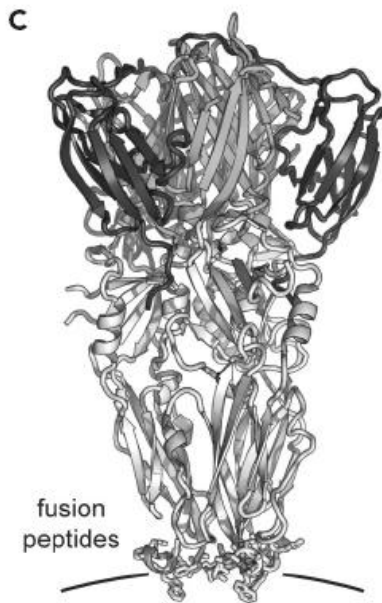


Figure 6: **Représentation de la forme trimérique de E** (d'après Lidenbach *et al.*, 2007). La protéine d'enveloppe est représentée lors de l'étape de fusion, lorsque les dimères se dissocient en monomères suite à l'exposition au pH acide de l'endosome et exposent leurs peptides de fusion vers la membrane plasmique de la cellule cible. ***fusion peptides*** : *peptides de fusion*.

1-3-2 Les protéines non structurales

1-3-2-1 NS1

NS1 est une glycoprotéine de 46 kDa transloquée vers le RE pendant sa synthèse, clivée de E par une signal-peptidase cellulaire. C'est dans le RE qu'une peptidase cellulaire non identifiée clive la jonction NS1/NS2A (Falgout *et al.*, 1989 ; Falgout *et al.*, 1995). Ce processus requiert les 8 derniers acides aminés en C-terminal de NS1 et les 140 acides aminés en N-terminal de NS2A (Falgout *et al.*, 1995 ; Hori et Lai, 1990).

NS1 est très largement séquestrée dans les cellules infectées mais elle peut aussi être localisée à la surface cellulaire ou être sécrétée des cellules de mammifère (Lidenbach et Rice, 2003).

NS1 a été localisée dans les sites de réplication de l'ARN viral (Westaway, 1987 ; Mackenzie *et al.*, 1996 ; Westaway *et al.*, 1997).

Même si son rôle dans la réplication de l'ARN n'est pas encore clairement défini, des mutations sur son site de glycosylation peuvent entraîner des défauts dans la réplication de l'ARN viral (Muylaert *et al.*, 1996), étape pendant laquelle son interaction avec NS4A est requise (Lidenbach et Rice, 1999).

La fonction de la forme extracellulaire de NS1 n'est pas connue. En revanche, cette forme extracellulaire est hautement immunogène (Dauphin et Zientara, 2007). De plus, NS1 est impliquée dans l'inhibition de la réponse innée antivirale et plus particulièrement dans l'inhibition de la transduction du signal induit par le TLR3 (Wilson *et al.*, 2008). En effet, la capacité à contrer la transduction du signal médiée par TLR3 a été mesurée individuellement pour chacune des protéines non structurales du VWN. Wilson *et al.* (2008) ont montré que NS1 inhibe l'activation par la voie TLR3 du promoteur de la transcription de l'IFN (interféron) et d'un promoteur dépendant de NF- κ B. Cette inhibition est due à l'incapacité du ligand poly (I:C) de TLR3 à induire la translocation nucléaire d'IRF3 et de NF- κ B. L'expression de NS1 inhibe aussi la production TLR3-dépendante de l'interleukine 6, et donc la mise en place d'un état antiviral.

Une forme plus longue de NS1, NS1', est souvent détectée lors d'infections par les membres du sero-complexe de l'encéphalite japonaise (Murray *et al.*, 2010). NS1' est le résultat d'un décalage ribosomique qui se produit en 5' de NS2A, en aval d'une structure secondaire de l'ARN et cette protéine joue un rôle dans la neuroinvasion du VWN (Melian *et al.*, 2010).

1-3-2-2 NS2A et NS2B

NS2A est une protéine hydrophobe de 22 kDa. Le clivage cytosolique NS2A/NS2B est effectué par NS3 associée à NS2B. NS2A est impliquée dans l'assemblage des particules virales (Liu *et al.*, 2003). Elle est localisée dans les sites de réplication et interagit avec NS3 et NS5, ainsi qu'avec la région 3' non codante (Mackenzie *et al.*, 1998).

NS2A est donc un bon candidat pour la coordination entre l’empaquetage de l’ARN et sa réplication (Khromykh *et al.*, 2001b). NS2A est aussi impliquée dans l’inhibition de la réponse interféron α/β (Liu *et al.*, 2004, 2006).

NS2B est une petite protéine de 14 kDa associée à la membrane plasmique (Clum *et al.*, 1997). NS2B forme un complexe stable avec la partie sérine protéase de NS3 (Falgout *et al.*, 1991) et agit comme co-facteur de NS3.

1-3-2-3 NS3

NS3, protéine multifonctionnelle de 70 kDa, est impliquée dans la réplication et le clivage de la polyprotéine virale. NS3 possède une activité sérine protéase dans son domaine N-terminal et des activités ATPase et hélicase en C-terminal (Gorbalenya *et al.*, 1989 ; Murray *et al.*, 2010). L’activité protéase clive les jonctions NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4B/NS5 (Lidenbach *et al.*, 2007). Cette activité est aussi impliquée dans la maturation des régions C-terminales de la protéine de capsid (Amberg *et al.*, 1994 ; Yamshchikov *et al.*, 1994) et de NS4A (Lin *et al.*, 1993). NS3 possède également une activité ARN triphosphatase (RTPase) qui lui permet de déphosphoryler la partie 5’ de l’ARN avant l’ajout de la coiffe (Wengler, 1993). NS3 se lie aux structures en épingle à cheveux en 3’ du génome en association avec NS5 (Chen *et al.*, 1997) et la présence de NS5 augmente l’activité NTPase de NS3 (Cui *et al.*, 1998). De plus, NS3 semble jouer un rôle dans l’effet cytopathique après infection par le VWN, par induction d’une mort cellulaire par apoptose. Ramanathan *et al.* (2006) ont montré le rôle de NS3 dans l’activation de la caspase 8.

1-3-2-4 NS4A, 2K et NS4B

NS4A et NS4B sont des petites protéines hydrophobes de 16 et 27 kDa, séparées par le peptide 2K. NS4A a été localisée au sein des complexes de réplication (Mackenzie *et al.*, 1998), ce qui suppose un rôle dans la réplication de l’ARN.

2K est un fragment d'acides aminés hydrophobes localisé entre NS4A et NS4B. Ce fragment sert de séquence signal pour la translocation de NS4B dans la lumière du réticulum endoplasmique (Lin *et al.*, 1993).

Des études ont montré que le clivage NS4A/2K/NS4B était nécessaire pour l'induction des réarrangements des membranes cytoplasmiques (/formation de vésicules) par NS4A (Roosendaal *et al.*, 2006). Le clivage à la jonction 2K/NS4B est assuré par la fonction sérine protéase de NS3 associée à NS2B en amont d'un peptide signal du domaine transmembranaire 2K (Lin *et al.*, 1993). Le fragment 2K est impliqué dans la synthèse de l'ARN viral (Zou *et al.*, 2008), ainsi une mutation (en position 9) est responsable de la résistance à un anti-viral (la lycorine) par l'augmentation de la vitesse de réplication.

NS4B fait partie du complexe de réplication viral (Miller *et al.*, 2006). NS4B colocalise avec NS3 et l'ARN double brin dans des structures membranaires dérivées du RE, lieu de la réplication virale (Westaway *et al.*, 2002). Une mutation dans la partie C-terminale de NS4B réduit la vitesse de réplication et la quantité d'ARN synthétisé, ce qui suggère que cette région de NS4B est critique pour la réplication virale (Puig-Basagoiti *et al.*, 2007). NS4B est également impliquée dans l'échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte en inhibant la voie interféron α/β (Munoz-Jordan *et al.*, 2005 ; Wicker *et al.*, 2006).

1-3-2-5 NS5

NS5, grosse protéine de 103 kDa, est hautement conservée et multifonctionnelle. Elle possède une activité méthyltransférase (MTase) (Lidenbach *et al.*, 2007). NS5 est l'ARN-polymérase-ARN-dépendante, nécessaire pour la réplication de l'ARN viral au sein de complexes faisant intervenir des protéines d'origine à la fois virale et cellulaire (Murray *et al.*, 2010). NS5 en relation avec NS3 a été identifiée comme étant un composant majeur des complexes de réplication de l'ARN viral.

NS5 participe à la suppression de la réponse innée de l'hôte en empêchant l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 (pY-STAT1) (voir paragraphe 3-2-1-2) et à la suppression de l'expression des gènes sous contrôle des interférons de type I (Laurent-Rolle *et al.*, 2010).

1-3-3 les régions non codantes

1-3-3-1 La région 5' non codante

La région 5' non codante (NC) possède une coiffe m⁷GpppA qui est reconnue par la protéine cytoplasmique eIF4B (facteur eucaryotique d'initiation de la traduction) ainsi que par le facteur eIF4F du complexe d'initiation (Chiu *et al.*, 2005 ; Clyde et Harris, 2006). Ce complexe recrute la petite sous-unité ribosomale pour la traduction de la polyprotéine virale.

1-3-3-2 La région 3' non codante

La région 3' non codante possède une structure en épingle à cheveux hautement conservée qui sert de promoteur à la synthèse du brin ARN(+) (Shi *et al.*, 1996), ainsi qu'une séquence de cyclisation. Cette séquence induit l'interaction entre les parties 5' et 3' du génome viral, ce qui est nécessaire pour la réplication (Khromykh *et al.*, 2001a; Polacek *et al.*, 2009a; Thurner *et al.*, 2004; You et Padmanabhan, 1999).

La réussite de la cyclisation est liée à l'action de la protéine PABP (poly(A) binding protein) qui interagit avec la région 3'NC et eIF4F (Polacek *et al.*, 2009b). La structure en épingle à cheveux se lie à un certain nombre de protéines cellulaires, permettant d'initier la synthèse du brin d'ARN(-) (Blackwell et Brinton, 1997; De Nova-Ocampo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Polacek *et al.*, 2009a; Shi *et al.*, 1996).

1-4 Le cycle viral

1-4-1 Entrée virale

L'entrée virale suppose l'internalisation du virus par endocytose suite à l'interaction de l'enveloppe virale avec les récepteurs (qui ne sont pas tous identifiés). L'abaissement du pH dans l'endosome entraîne le processus de fusion entre l'enveloppe et la membrane endosomale libérant ainsi la capsid (figure 7).

En effet, l'exposition à un pH acide entraîne un changement de conformation majeur de la protéine E notamment sa trimérisation et un réarrangement de sa surface exposant le peptide de fusion vers la membrane cible (Chu et Ng, 2004 ; Gollins *et al.*, 1986a). Ce peptide s'insère alors et se replie en épingle à cheveux permettant de rapprocher les deux membranes, ce qui entraîne la formation d'un pore permettant le passage de la capside.

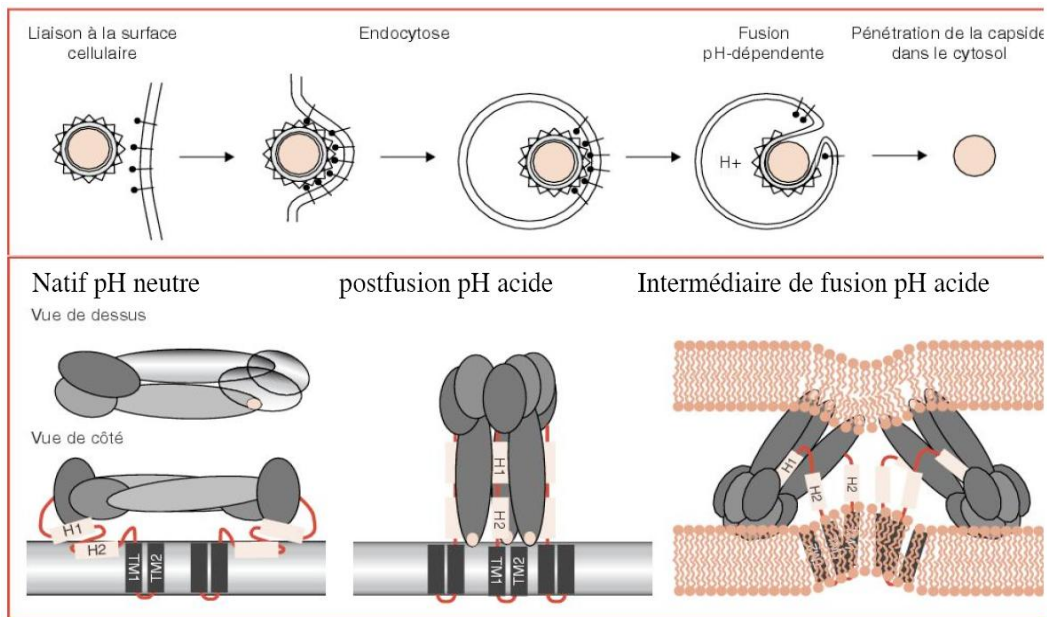


Figure 7: **Mécanisme de fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire par endocytose** (d'après Cosset, 2010). La protéine d'enveloppe reconnaît son récepteur à la surface de la cellule cible, elle est ensuite endocytée au contact du pH acide de l'endosome. La protéine E change de conformation, libérant ainsi le peptide de fusion. La capside est alors libérée dans le cytoplasme.

1-4-2 Cycle cytoplasmique

1-4-2-1 Libération de l'ARN génomique et traduction de la polyprotéine

L'ARN(+) est coiffé en 5' mais ne possède pas de queue polyA en 3'. Par contre, la région 3' NC possède une structure en épingle à cheveux hautement conservée.

Les clivages protéiques sont co-traductionnels et se font grâce à des protéases virales et cellulaires (voir figure 8).

Les protéines d'enveloppe doivent être glycosylées. Pour cela, elles doivent transiter dans le RE et le Golgi, ce qui nécessite une séquence signal. En cours de synthèse, des séquences signal adressent les régions prM, E et NS1 de la polyprotéine dans le RE grâce à des régions transmembranaires (figure 8). Les séquences signal sont ensuite clivées par des signalases cellulaires. Les protéines prM et E restent ancrées dans la membrane alors que la protéine NS1 est libérée dans la lumière du réticulum et sera excrétée. La protéine prM sera clivée plus tardivement dans le trans-Golgi par des protéases de types furines résidentes du Golgi.

Sur la face cytoplasmique, la protéine NS3 nécessite NS2B comme cofacteur pour réaliser les clivages protéiques.

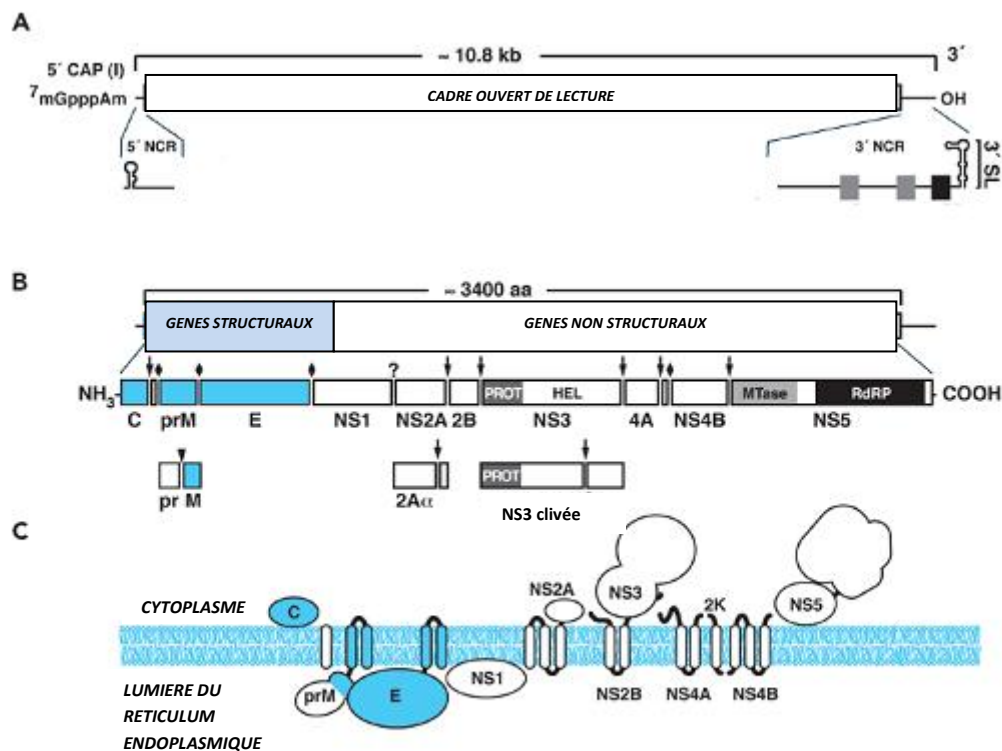


Figure 8 : **Structure du génome viral et expression de la polyprotéine** (d'après Lidenbach *et al.* (2007)). A : structure du génome (protéines structurales et non structurales) et des éléments ARN (coiffe, régions 5' et 3' NC). B : Traitement de la polyprotéine par les protéases cellulaires (♦), virale (↓), furines (▼) ou inconnues (?). C : topologie des produits de clivage de la polyprotéine. **NCR (Non Coding Region)** : région non codant, **3'SL (Stem Loop)** : structure secondaire en épingle à cheveux.

1-4-2-2 Réplication

La réplication a lieu au sein des complexes de réplication viral (RC) constitués de NS1, NS2A, NS3, NS4A et NS5 (figure 9).

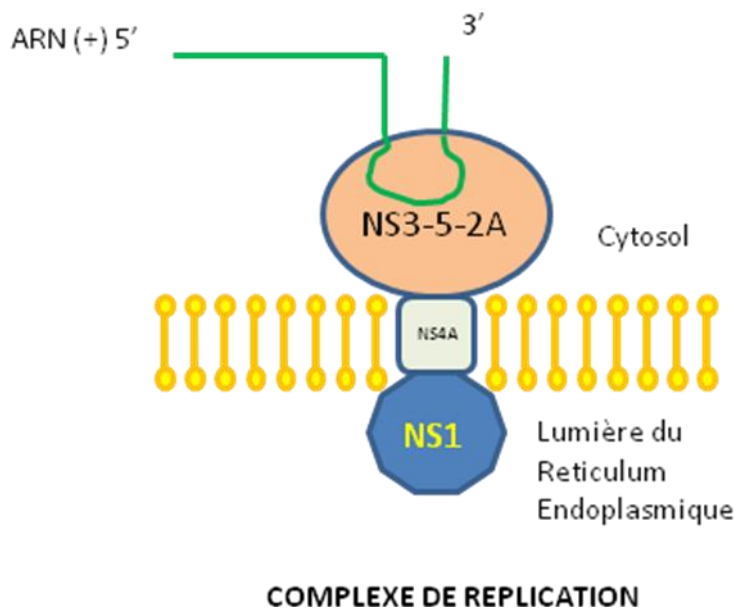


Figure 9: **Le complexe de réplication** (synthèse personnelle). Le complexe de réplication viral (RC) constitués de NS1, NS2A, NS3, NS4A et NS5.

La réplication débute par la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative qui sert ensuite de base pour la synthèse d'un ARN génomique positif sous un mode semi-conservatif et asymétrique. La réplication est couplée à la traduction (figure 10) et à l'assemblage (figure 10). Le complexe de réplication s'assemble avec les protéines qui viennent d'être traduites. La réplication est également couplée à l'encapsidation.

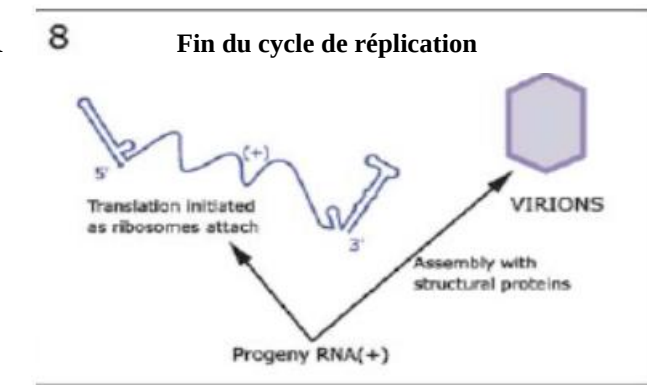
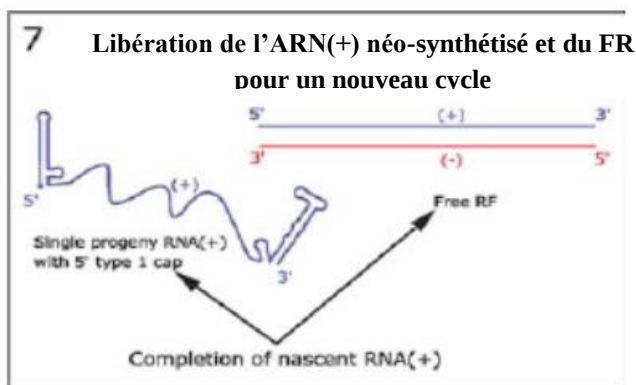
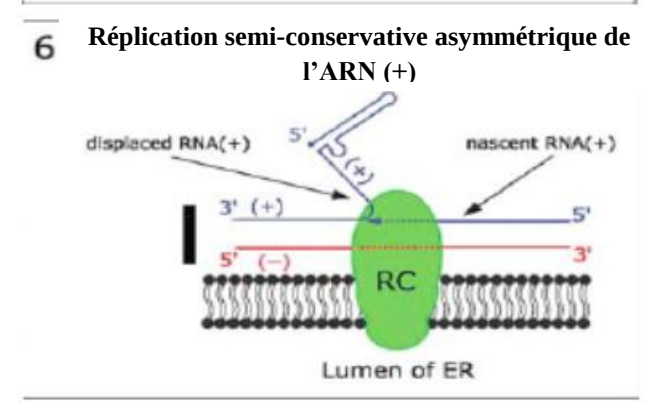
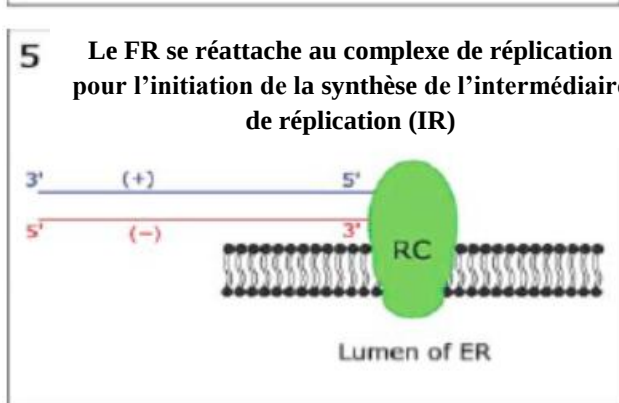
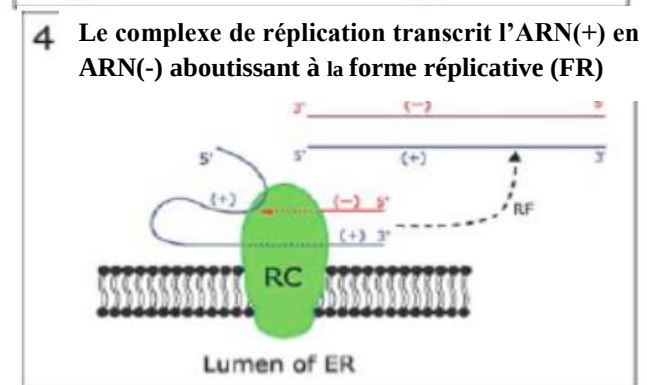
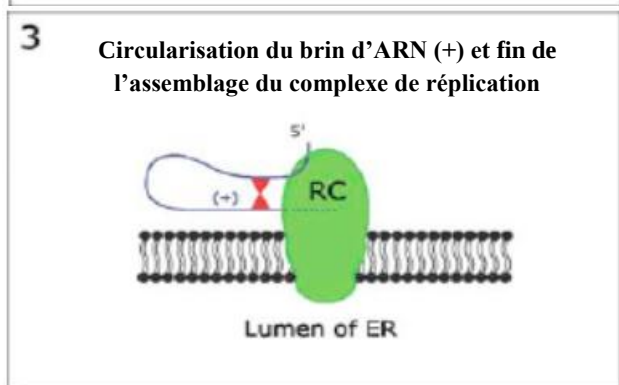
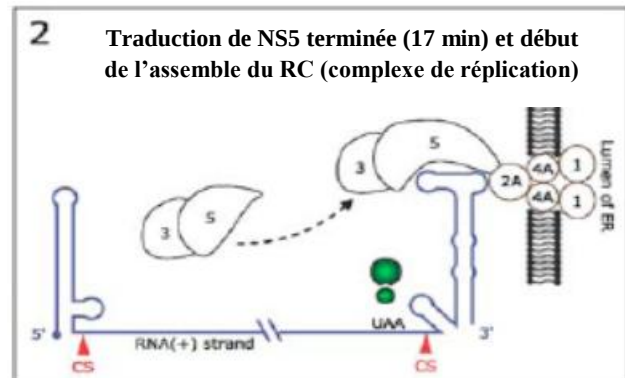
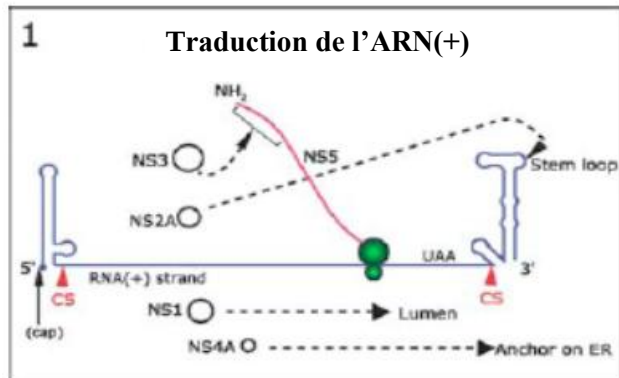


Figure 10: **Couplage de la traduction, de la réplication et de l'assemblage des particules virales** (d'après Westaway, Mackenzie et Khromykh, 2003). La traduction de l'ARN (+) est suivie par la formation des complexes de réplication où l'ARN est transcrit en ARN (-). Le brin d'ARN (-) sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin d'ARN (+). L'ARN (+) néoformé va alors être traduit et de nouvelles particules virales vont pouvoir alors se former. (1) **Stem loop** : structure secondaire en épingle à cheveux, **RNA (+) strand** : brin d'ARN (+), **Lumen** : lumière, **Anchor on ER** : ancrage sur le RE, (2) **Lumen of ER** : lumière du RE, **CIRCULARIZATION OF RNA(+) COMPLEX** : circularisation du complexe ARN (+) (6) **displaced RNA(+)** : ARN (+) déplacé, **nascent RNA (+)** : ARN (+) naissant, (7) **Single progeny RNA(+) with 5'type 1 cap** : copie unique d'ARN (+) cappé, **Completion of nascent RNA (+)** : maturation de l'ARN (+), **free RF** : FR libre, (8) **Translation Initiated as ribosomes attach** : initiation de la traduction lorsque les ribosomes s'attachent, **Progeny RNA (+)** : ARN(+) néo-synthétisé, **Assembly with structural proteins** : Assemblage avec les protéines structurales.

1-4-2-3 L'assemblage des particules virales

L'assemblage des particules virales se fait par association de l'ARN avec les protéines de capsid. L'acquisition de l'enveloppe se fait par bourgeonnement au niveau du RE.

prM sert de chaperon pour maintenir la conformation de la protéine E afin d'éviter l'exposition du peptide de fusion. Une fois le bourgeonnement réalisé, il y a formation de particules virales immatures avec un aspect hérissé correspondant à l'insertion d'hétérodimères prM-E dans l'enveloppe virale.

Le clivage de prM en M se déroule dans l'appareil de Golgi permettant la maturation de la particule virale (Mackenzie et Westaway, 2001).

1-4-2-4 Figure récapitulative

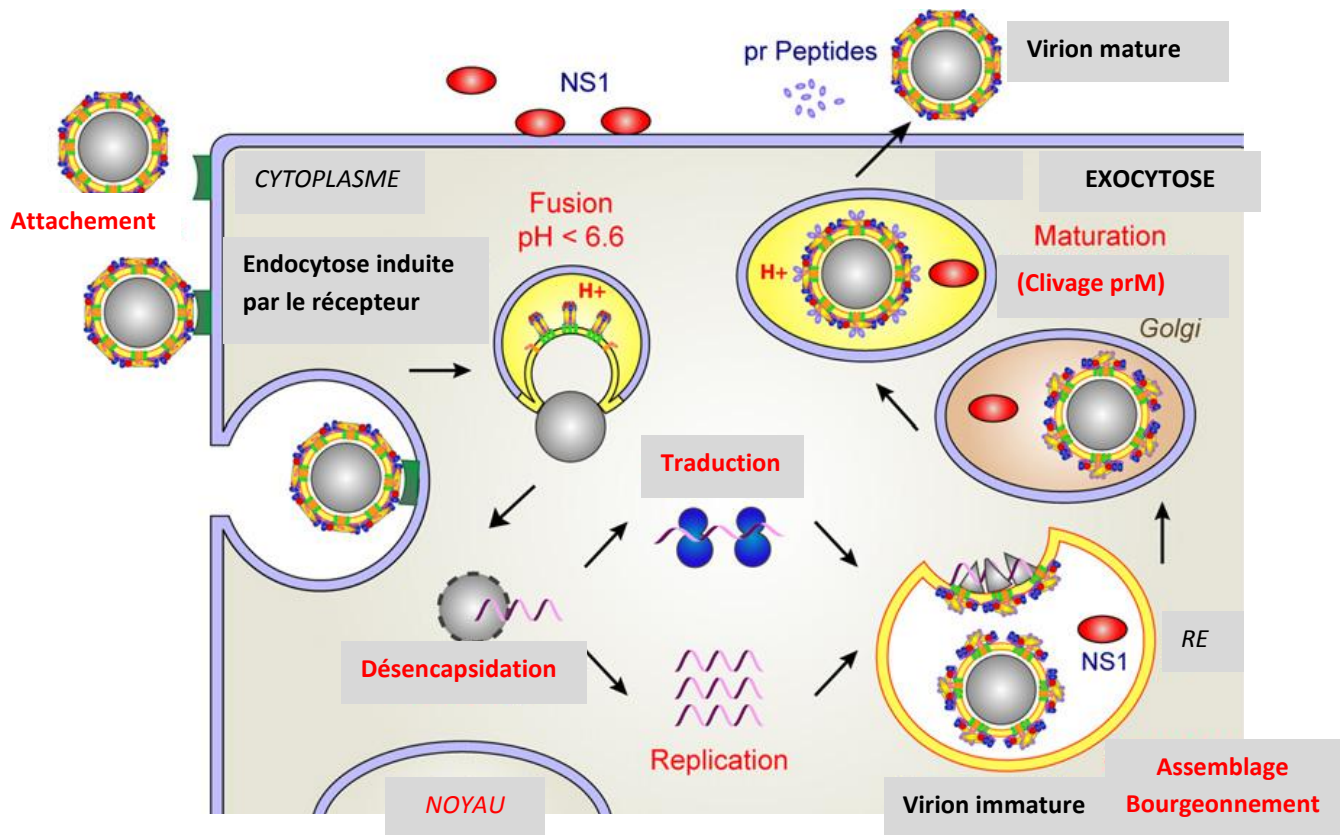


Figure 11: **Représentation schématique du cycle de multiplication virale du VWN** (d'après Heinz et Stiasny, 2012). Le VWN reconnaît sa cellule cible grâce à la protéine d'enveloppe qui possède le domaine de liaison au récepteur. La particule virale est alors endocytée. Le pH acide de l'endosome provoque un changement de conformation de la protéine d'enveloppe, ce qui aboutit à l'exposition du peptide de fusion. La capside est alors libérée dans le cytoplasme suivit de la libération de l'ARN viral. L'ARN de polarité positive est immédiatement traduit. Les protéines virales issues de la traduction s'assemblent pour former un complexe de réplication. Les ARN néosynthétisés sont encapsidés et transportés via des vésicules de fusion. De nouveaux virions sont libérés.

2- Cycle de transmission du virus

Dans les années 1950, des études menées en Egypte ont permis d'identifier le cycle de transmission du VWN (Brault, 2009). Le rôle des oiseaux, comme hôtes amplificateurs, a été précisé, ainsi que celui de certains moustiques vecteurs, principalement du genre *Culex* (figure 12). Ces études ont permis de définir des zones de circulation endémique du virus et des zones de transition où le virus ne s'installe pas.

Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin en ingérant le virus (figure 12). Après passage à travers la barrière intestinale, le virus se réplique localement puis atteint les glandes salivaires pour ensuite être transmis lors d'un repas sanguin ultérieur. Cette dernière étape est directement liée aux conditions climatiques (température, hygrométrie...), qui sont déterminantes en termes d'activité des vecteurs et de durée de transmission. De nombreuses espèces de moustiques, de genres différents (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*...) ont été trouvées porteuses du VWN (Hayes *et al.*, 2005).

Des études expérimentales permettent de préciser les espèces compétentes, c'est-à-dire impliquées dans le cycle de transmission du virus (Granwehr *et al.*, 2004). Les espèces *Culex pipiens*, moustique « urbain », et *Culex modestus*, présents dans les zones humides, rizières et roselières en Camargue par exemple, semblent être plus particulièrement impliquées dans la transmission du virus en Europe.

Le niveau de virémie varie selon les espèces d'oiseaux et sa durée est assez courte (de l'ordre de quelques jours) : ainsi, les passériformes (passereaux), les chadriiformes (oiseaux aquatiques), les strigiformes (rapaces nocturnes) et les falconiformes (rapaces diurnes) présentent des niveaux de virémie généralement suffisants pour infecter la plupart des moustiques. Par contre, les columbiformes, les piciformes (piverts) et ansériformes (canards etc...), généralement résistants à l'infection, développent une virémie faible (Komar *et al.*, 2003). Les oiseaux sont considérés comme de bons agents disséminateurs du VWN dans la mesure où ils peuvent parcourir de grandes distances lors des migrations (Sotelo *et al.*, 2009).

Ce sont sans doute les oiseaux qui sont à l'origine de l'introduction du VWN à partir de l'Afrique sub-saharienne vers l'Europe et la région méditerranéenne (Berthet *et al.*, 1997; Charrel *et al.*, 2003; Jourdain *et al.*, 2007).

Depuis la découverte du virus en 1937, aucune mortalité aviaire naturelle n'avait été rapportée (Hayes *et al.*, 1988), jusqu'aux foyers de la fin des années 1990 en Israël et aux Etats-Unis (Bernard *et al.*, 2001 ; Bin *et al.*, 2001 ; Swayne *et al.*, 2001). En 1998, le VWN est isolé à partir d'une cigogne moribonde trouvée en Israël (Malkinson *et al.*, 2001b). Des mortalités élevées chez les jeunes oiseaux de 3 à 8 semaines étaient observées dans des populations de cigognes et d'oies (Malkinson *et al.*, 2001a).

Aux Etats-Unis, beaucoup d'oiseaux et en particulier le Quiscale bronzé (*Quiscalus quiscula*), le Corbeau Américain (*Corvus brachyrhynchos*), le geai bleu (*Cyanocitta cristata*), la pie (*Pica pica*), le roselin (*Carpodacus mexicanus*) et le moineau (*Passer domesticus*) ont été sévèrement touchés par l'épidémie/épizootie et ont permis une amplification efficace du virus (Hayes *et al.*, 2005). Les passériformes et en particulier les corvidés sont hautement sensibles à l'infection (Komar *et al.*, 2003).

Les espèces de ces familles, et tout particulièrement le Grand Corbeau (*Corvus corax* (Potter, 2004)) et le Corbeau Américain (*Corvus brachyrhynchos* (Caffrey *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2006; Yaremych *et al.*, 2004), présentent de forts taux de mortalité. Différents types de rapaces, dont l'Autour de Palombe (*Accipiter gentilis*, Erdélyi *et al.*, 2007) ont été identifiés comme sensibles à l'infection à VWN (Nemeth *et al.*, 2006; Bakonyi *et al.*, 2006; Höfle *et al.*, 2008).

Parmi les espèces européennes, la perdrix rouge (*Alectoris rufa*) de l'ordre des galliformes s'est montrée sensible lors d'infections expérimentales avec les souches Maroc 2003 (Ma03) et Espagne 2007 (SP07) (Sotelo *et al.*, 2011). Tous les oiseaux inoculés étaient virémiques et ont présenté des signes cliniques avec des taux de mortalité de 70% (Ma03) et 30% (SP07).

Le niveau de virémie varie selon les espèces d'oiseaux et sa durée est assez courte (de l'ordre de quelques jours) : ainsi, les passériformes (passereaux), les charadriiformes (oiseaux aquatiques), les strigiformes (rapaces nocturnes) et les falconiformes (rapaces diurnes)

présentent des niveaux de virémie généralement suffisants pour infecter la plupart des moustiques, par contre les columbiformes, les piciformes (piverts) et les ansériformes (canards...), généralement résistants à l'infection, développent une virémie très faible (Komar *et al.*, 2003).

Des infections expérimentales réalisées sur de jeunes oies avec un isolat nord-américain ont permis d'observer des taux de mortalité similaires à ce qui est observé dans la nature avec des virémies suffisantes pour infecter les moustiques (Swayne *et al.*, 2001). La virulence d'un isolat nord-américain a été évaluée sur 25 espèces aviaires américaines. Parmi ces espèces, les corvidés dont le corbeau américain (AMCR, pour AMerican CRow) et le geai bleu (*Cyanocitta cristata*), présentent une virémie comprise entre 8 et 10 log₁₀ PFU/ml (Komar *et al.*, 2003).

Les espèces sensibles présentent de fortes virémies et des taux de mortalité élevés (Ladeau *et al.*, 2007). De façon paradoxale, la baisse d'une population aviaire, due à une forte mortalité, au lieu de diminuer la transmission du VWN, peut, au contraire, l'augmenter.

D'une part, parce que la survie d'animaux infectés et donc immunisés pourrait diluer l'effet/empêcher de futures transmissions (Foppa et Spielman, 2007), ensuite parce que la mortalité aviaire est associée à une forte virémie entraînant une infection efficace des moustiques moyennement sensibles/compétents (Brault *et al.*, 2004 ; Kinney *et al.*, 2006 ; Komar *et al.*, 2003).

Enfin une augmentation des signes pathologiques pourraient avantager l'infection des moustiques suite à une baisse des comportements de défense des oiseaux contre les moustiques (Day et Edman, 1983). De plus, les moustiques pourraient être davantage attirés par des oiseaux en hyperthermie (Kinney *et al.*, 2006).

Plus la population locale de moustiques a une faible compétence vectorielle à l'infection par le VWN, plus il est primordial pour le virus d'atteindre une virémie forte chez son hôte, ce qui est le cas pour certaines espèces américaines de *Culex spp.* Inversement, les vecteurs sensibles au VWN peuvent transmettre efficacement le virus même lorsque la virémie aviaire est plus faible, ce qui est le cas dans les régions endémiques (Afrique, Europe...) (Brault *et al.*, 2009).

Des cas de transmission directe par voie alimentaire ou par contacts directs entre oiseaux ont été décrits (McLean *et al.*, 2001). Ces modes de transmission, en particulier la prédation de petits oiseaux infectés par le VWN, pourraient jouer un rôle épidémiologique non négligeable dans le contexte nord américain (infection de corbeaux) ou en Hongrie (infection de rapaces) (Zientara *et al.*, 2010).

L'apparition de cas chez l'homme et le cheval est liée à une circulation importante du virus dans l'avifaune, via des vecteurs ornithophiles, et à la présence de moustiques vecteurs, à la fois ornithophiles et mammophiles, capables de s'infecter à partir d'oiseaux virémiques et de piquer ultérieurement un hôte sensible (figure 12) (Murray *et al.*, 2010). De très nombreuses espèces animales peuvent être infectées dont des reptiles, des amphibiens, des carnivores...

Cependant le VWN provoque des signes cliniques essentiellement chez l'homme et le cheval. Les signes cliniques rencontrés consistent en des atteintes pseudo- grippales avec fièvre, céphalées, myalgies, arthralgies, nausées, vomissements et parfois un exanthème de type maculo-papuleux. Plus rarement, des atteintes neuroméningées, pouvant être mortelles, de type méningite ou méningo-encéphalites sont rencontrées. Des cas de paralysies flasques aiguës semblables à celles rencontrées dans la poliomyélite ou des cas évoquant un syndrome de Guillain-Barré, ont été rapportés aux Etats-Unis chez l'homme (Ahmed *et al.*, 2000). A la différence de ce qui est observé chez les oiseaux, ces espèces ne développent généralement pas une virémie suffisante pour permettre la transmission du virus à des vecteurs compétents, lors d'un repas sanguin.

Chez le cheval, le niveau de virémie est au maximum de 10^3 particules virales/ml (Bunning *et al.*, 2002). L'homme et le cheval sont ainsi considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques (Zientara, 2002).

Les reptiles peuvent potentiellement contribuer à la persistance du virus dans un environnement donné par la virémie soutenue qu'ils développent (Desenclos *et al.*, 2009).

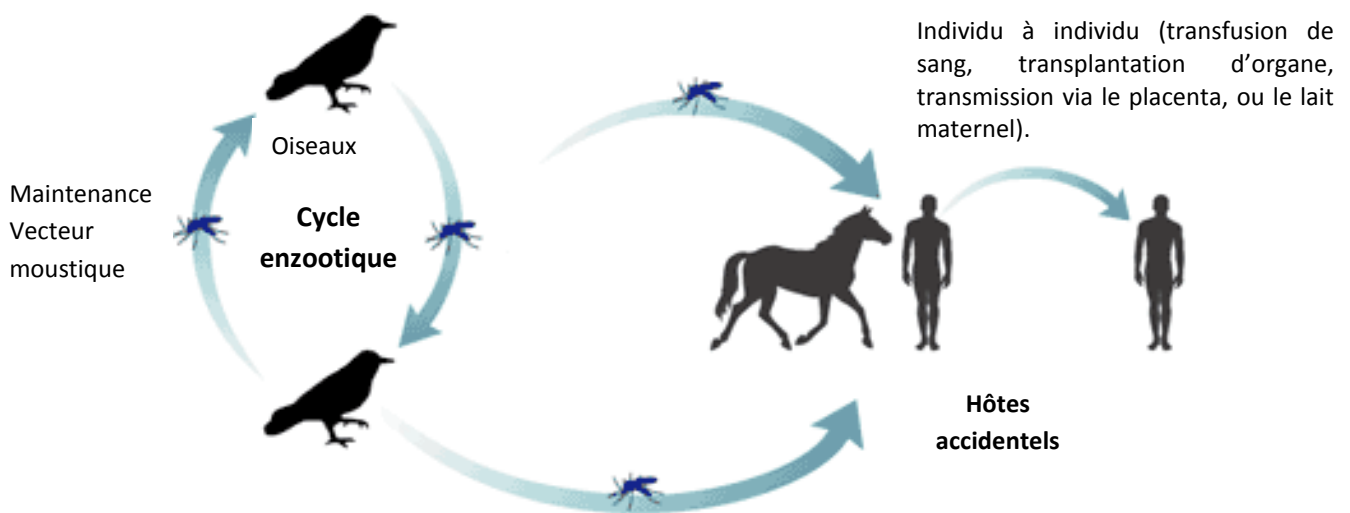


Figure 12: **Cycle de transmission du virus West Nile** (d'après Huhn *et al.* (2003)). Les oiseaux sont les hôtes amplificateurs du virus. Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin. La présence de moustiques vecteurs, à la fois ornithophiles et mammophiles est responsable de la transmission du virus à des mammifères sensibles dont l'homme et le cheval. Ces hôtes ne développent pas une virémie suffisante pour permettre la transmission du virus à des vecteurs compétents, lors d'un repas sanguins et sont des culs de sac épidémiologiques. En revanche, des cas de transmission directs suite à une transfusion sanguine, des greffes d'organes, par voie transplacentaire ou par le lait maternel ont été rapportés.

Les mécanismes de la persistance du virus en dehors de la période d'activité des vecteurs restent mal connus. La transmission transovarienne du virus à la descendance est décrite pour certains flavivirus, comme ceux de la dengue ou de la fièvre jaune, avec des vecteurs du genre *Aedes*. Elle a été rapportée pour certaines espèces de *Culex* avec des taux bien moindres, les *Culex* étant considérés comme des vecteurs peu efficaces en terme de transmission verticale pour le VWN (Goddard *et al.*, 2003).

Cependant, le phénomène de persistance hivernale du VWN chez les moustiques est décrit dans les conditions naturelles (Nasci *et al.*, 2001). Aux Etats-Unis, l'hiver, rigoureux dans les zones infectées en 1999, n'a pas empêché le virus de persister et de gagner peu à peu l'ensemble du territoire en 3-4 ans.

En plein hiver 1999-2000, des vecteurs adultes en hibernation ont été trouvés infectés. Le rôle des tiques dans la persistance du virus a aussi été évoqué, la transmission ayant été démontrée expérimentalement chez certaines espèces de tiques (Lawrie *et al.*, 2004). Un autre aspect concerne la durée de virémie chez les oiseaux, qui s'avère être relativement courte (de l'ordre d'une semaine). Le virus WN a été isolé sur des rapaces en hiver, ce qui laisserait supposer un état latent du virus associé possiblement à des phénomènes de réactivation (Zeller et Murgue, 2001).

A présent, je vais m'intéresser aux conséquences de l'infection à VWN chez les deux hôtes d'intérêt pour notre laboratoire : les oiseaux et les mammifères.

3- Infection à VWN chez les oiseaux et les mammifères

La figure 13 résume les différentes étapes de l'infection qui débute par une piqûre de moustique. Suite à l'injection du virus au niveau de la peau, le virus circule dans le sang. Le virus arrive alors au niveau de la tête où une infection du cerveau peut se produire. Une autre voie d'entrée se situe au niveau des motoneurones, ce qui aboutit à l'infection du système nerveux central (SNC) et à des lésions dont nous verrons les conséquences. Je discuterai plus tard dans cette partie des événements aboutissant au passage à travers la barrière hématoencéphalique (BHE).

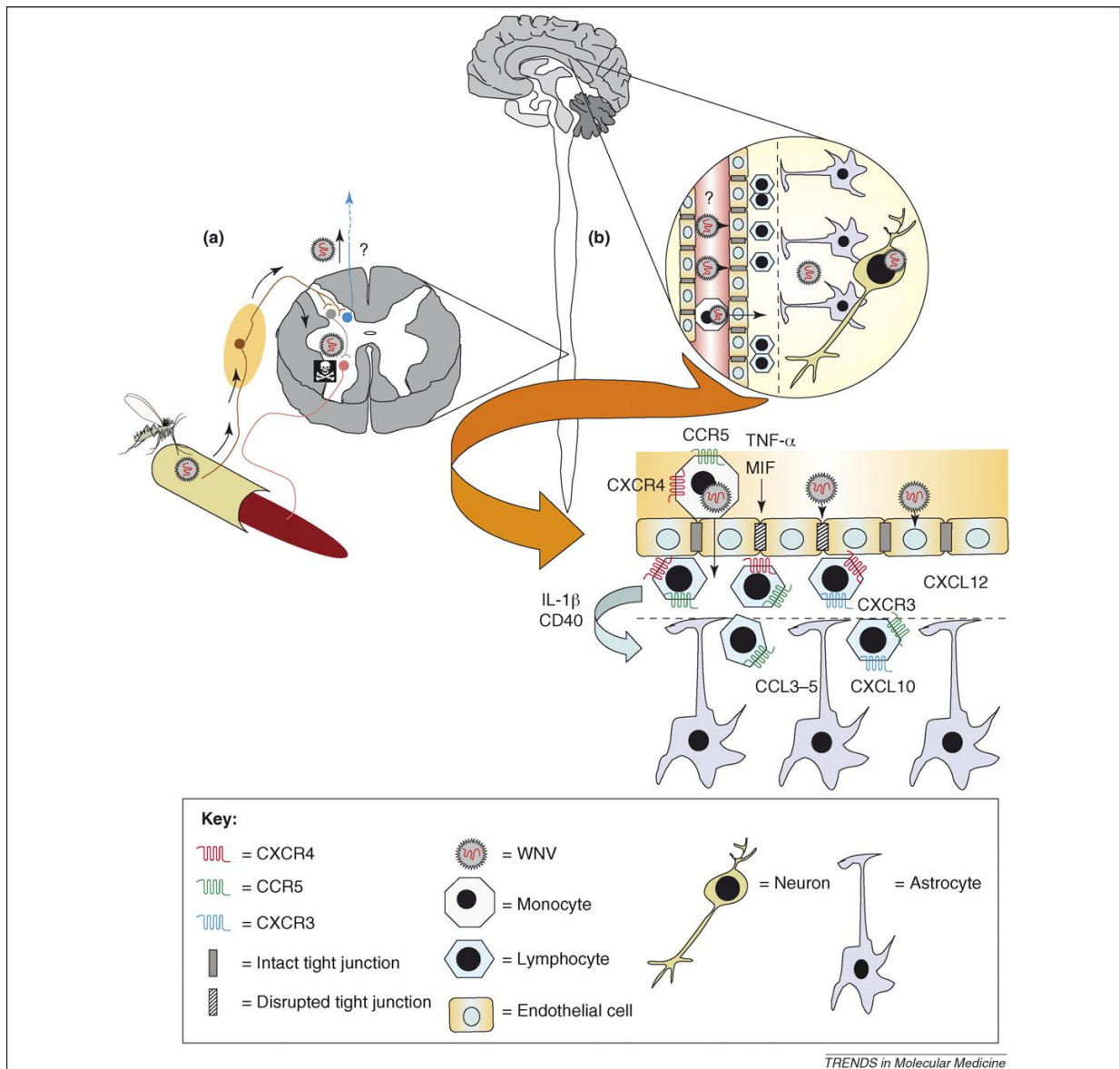


Figure 13: **Mécanismes de la neuro-invasion par le WNV**, induction de l'entrée des leucocytes dans le SNC (d'après Klein et Diamond (2008)). Le WNV pourrait entrer dans le SNC par transport rétrograde dans les neurones moteurs jusque dans la moelle épinière (a) ou par le passage de la BHE suite à une virémie (b). L'entrée via la moelle épinière serait le résultat d'une propagation inter-neuronale à l'origine de paralysies. Les voies d'entrée via la BHE incluent le transport intracellulaire via les macrophages, la propagation intra-endothéliale pendant la rupture de la BHE par les cytokines (TNF- α , MIF) ou par l'infection directe des cellules endothéliales. Les macrophages et les lymphocytes qui entrent par les espaces périvasculaires sont séquestrés par CXCL12 se liant à CXCR4, le ligand présent à la surface des leucocytes. La sortie des lymphocytes T de l'espace périvasculaire requiert IL-1 β et CD40. L'augmentation de l'expression de CXCL10 dans les neurones suite à l'infection permet le recrutement de lymphocytes CD8 $^{+}$ via l'activation de CXCR3, en particulier dans le cervelet. L'augmentation de l'expression de CCL3-5 dans le SNC permet le recrutement de leucocytes exprimant CCR5. **Intact tight junction** : jonction serrée intacte, **Disrupted tight junction** : jonction serrée interrompue, **WNV** : WNV, **Endothéliale cell** : cellule endothéliale, **Neuron** : neurone.

3-1 Les voies d'entrée du virus

3-1-1 L'inoculation virale cutanée

Le VWN est transmis via une piqûre de moustique. Les cellules de Langerhans ou d'autres cellules dendritiques des tissus cutanés pourraient être le siège initial de la réplication du VWN après l'inoculation par le moustique.

Dans l'épiderme, les cellules de Langerhans infectées deviennent des cellules fonctionnelles présentatrices d'antigène, exprimant des CMH de classe II, CD54 (ICAM-1), CD80 (B7.1) et la cadhérine-E (Byrne *et al.*, 2001). Ces cellules migrent dans les nœuds lymphatiques dans les premières 24 à 48h après l'inoculation, induisant ainsi l'expression de cytokines antivirales et de chémokines, l'activation du complément, l'expansion leucocytaire, la préparation de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes T (Johnston *et al.*, 2000). De plus, cette migration des cellules dendritiques infectées entraîne une virémie et l'infection des tissus périphériques.

Des modèles rongeurs ont permis de valider ce scénario. Au bout de six jours, le virus n'est plus détecté dans le sérum et les organes périphériques, et entre dans le SNC, ce qui induit des troubles neurologiques (Samuel et Diamond, 2006).

Une inoculation intranasale peut aussi aboutir à une entrée dans le SNC via la muqueuse olfactive (Nir *et al.*, 1965).

3-1-2 l'infection des motoneurones

Il a été démontré expérimentalement que le VWN infecte les motoneurones. Le virus est transporté dans les neurones en cultures et infecte les motoneurones de la moelle épinière chez le hamster (Wang *et al.*, 2009). Dans l'étude réalisée par Wang *et al.* (2009), le virus a été injecté directement dans le nerf sciatique gauche du hamster.

Un marquage de la protéine E du VWN a montré la présence du virus seulement dans les motoneurones de la corne ventrale homolatérale, mais pas dans le ganglion spinal (figure 14. L'infection des motoneurones est à l'origine de faiblesses musculaires et de paralysies (Wang *et al.*, 2009).

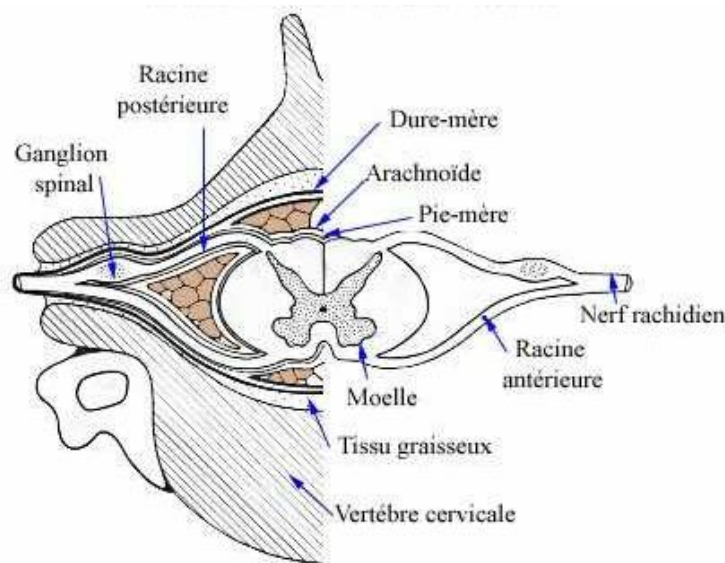


Figure 14: **Schéma d'une coupe transversale au niveau d'une vertèbre cervicale** (d'après le site <http://www.medecine-et-sante.com/anatomie/anatmoellepi.html>).

Le VWN est transporté à la fois de façon antérograde et rétrograde (Samuel *et al.*, 2007), préférentiellement par les motoneurones plutôt que par les neurones sensoriels (Wang *et al.*, 2009).

Une injection directe dans le nerf sciatique ou la moelle épinière de hamsters a permis de cartographier les lésions responsables de la paralysie des membres postérieurs, et de les localiser dans la région lombaire de la moelle épinière (Morrey *et al.*, 2008). Des analyses immunohistologiques de sections de moelle épinière de hamsters paralysés ont révélé que les neurones infectés étaient localisés essentiellement dans la corne ventrale de la moelle, ce qui correspond à ce qui se produit lors de la présentation de signes cliniques de type polio (Morrey *et al.*, 2008).

De même chez l'Homme, des données cliniques obtenues sur des patients atteints de paralysie ont permis de montrer la présence de lésions dans la corne antérieure (Kramer *et al.*, 2007). A ce jour, aucune démonstration n'a été faite de l'entrée du VWN dans le cerveau par cette voie.

3-1-3 Une transmission verticale est-elle possible?

La transmission verticale du VWN a été décrite chez la souris mais pas chez les oiseaux (Nemeth et Bowen, 2007). L'étude menée par Nemeth et Bowen (2007) n'a pas permis de montrer une transmission de la poule à l'œuf, le poulet présentant une virémie faible et de courte durée réduisant la potentialité de la transmission. Cependant une telle éventualité n'est pas à exclure chez d'autres espèces présentant des virémies supérieures mais qui survivent à l'infection comme la Crécerelle d'Amérique (*Falco sparverius*), le Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*), le Quiscale bronzé (*Quiscalus quiscula*), la Corneille de rivage (*Corvus ossifragus*), le Grand-duc de Virginie (*Bubo virginianus*) et le moineau domestique (Komar *et al.*, 2003 ; Nemeth *et al.*, 2006). En revanche, les anticorps neutralisants maternels sont transmis à l'œuf avec un effet protecteur qui décroît avec le temps (Nemeth et Bowen, 2007).

Suite à l'entrée du virus dans l'organisme une défense immunitaire d'abord innée puis adaptative se met en place. Nous verrons dans cette partie quels sont les mécanismes de défense de l'hôte et quels sont les mécanismes que le virus met en œuvre pour y échapper.

3-2 La réponse anti-virale

3-2-1 Rôle de l'immunité innée

L'activation de la réponse innée suite à la détection de la présence d'un pathogène est nécessaire pour contrôler rapidement la réplication virale (principalement via la voie interféron) mais aussi pour mettre en place la réponse immunitaire adaptative.

3-2-1-1 La reconnaissance du virus

Les récepteurs de la famille Toll (TLRs) de mammifères représentent un groupe de 11 glycoprotéines transmembranaires, homologues des récepteurs Toll identifiés chez la drosophile, et présentes soit à la surface externe des cellules ou sur les membranes des endosomes (Arjona *et al.*, 2011).

Chaque TLR possède un domaine reconnaissant des motifs spécifiques du pathogène, et un domaine cytoplasmique (TIR) activant la voie de signalisation. Suite à la reconnaissance du virus, le domaine TIR active des protéines telles que MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) ou TRIF (TIR containing adaptor-inducing IFN β), qui vont-elles même activer des facteurs de transcription comme NF- κ B et IRF-3, et la production de molécules pro-inflammatoires dont les IFNs de type I (Kawai et Akira, 2006) (figure 15). Les IFNs de type-I comprennent les IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω qui reconnaissent le même type de récepteur de surface cellulaire, les IFNAR (Pestka *et al.*, 2004 ; Pestka *et al.*, 1987).

Parmi les TLRs reconnaissant des motifs viraux, TLR3 est celui qui reconnaît les ARNdb (Alexopoulou *et al.*, 2001), ARNdb présents lors de la phase répliquative du VWN (Samuel, 2002). Wang *et al.* (2004) ont montré que des souris déficientes en TLR3 présentent une virémie plus importante, un niveau plus bas de cytokines antivirales et pro-inflammatoires, et un taux de mortalité plus faible après infection par voie intra-péritonéale (i.p). L'hypothèse soutenue par les auteurs est qu'au vu de l'effet de la cytokine TNF- α sur l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), une baisse du taux de TNF- α rend les souris plus résistantes à la neuro-invasion par le VWN.

TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARN simples brins (Kawai et Akira, 2006). Les souris déficientes en récepteurs TLR-7 ont des macrophages qui ne répondent plus aux interleukines IL-12 et IL-23 suite à l'infection, ce qui augmente la sensibilité des souris aux encéphalites létales. TLR7 et la voie IL-23 dépendante modulent la migration des cellules immunitaires, dont les cellules de Langerhans (LCs), vers les cellules infectées (Town *et al.*, 2009 ; Welte *et al.*, 2009).

Les hélicases à ARN, RIG-I et MDA-5, sont une autre famille importante de récepteurs reconnaissant des motifs viraux (Arjona *et al.*, 2011).

RIG-1 et MDA-5 ont dans leur domaine C-terminal, un motif DExD/H qui reconnaît les ARNdb, et deux domaines N-terminaux d'activation de caspases et de recrutement de la protéine IPS-1, activant l'expression de l'IFN- β et la réponse antivirale (Saito et Gale, 2007) (figure 15). Des souris déficientes en IPS-1 ont une réponse inflammatoire incontrôlée associée à une déficience dans l'expansion des cellules T régulatrices, ce qui augmente la sensibilité des souris à l'infection par le VWN (Suthar *et al.*, 2010).

Il existe des CLR (C-Lectin Receptor = Récepteur à lectine de type C) chez les mammifères qui reconnaissent les groupes sucres des protéines virales, parmi elles la protéine d'enveloppe (Takahashi *et al.*, 2006 ; Davis *et al.*, 2006a et b). Les CLR sont des récepteurs qui appartiennent à la famille des récepteurs PRR (PRR pour Pattern Recognition Receptor) qui détectent les hydrates de carbone des pathogènes. Ils activent le complément, la phagocytose, l'induction de l'expression de gènes antimicrobiens, et la présentation d'antigène (Robinson *et al.*, 2006).

Dans le cas du VWN, DC-SIGN et DC-SIGNR sont les CLR impliqués dans l'attachement cellulaire et l'infection mais aussi dans l'engagement de la réponse innée de l'hôte. La reconnaissance de la protéine d'enveloppe glycosylée du VWN par DC-SIGN entraîne une réduction de l'expression de TLR-3 chez les macrophages via la voie STAT-1 (Kong *et al.*, 2008b). Ce schéma est déficient chez les personnes âgées, ce qui a pour conséquence un niveau d'expression élevé de TLR-3 chez les macrophages et donc un niveau élevé de cytokines qui pourraient contribuer à une augmentation de la perméabilité de la BHE.

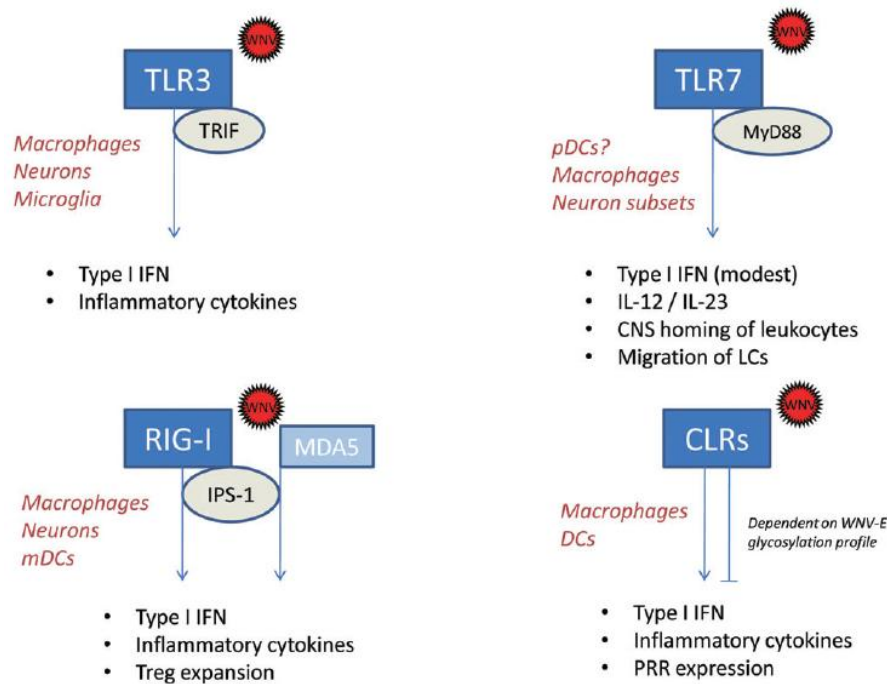


Figure 15: **Mécanismes de la réponse innée induits par les PRR** (d'après Arjona *et al.* (2011)). Les types cellulaires impliqués sont indiqués en rouge. **Neurons** : neurones, **Microglia** : microglie, **Type I IFN** : IFN de type I, **inflammatory cytokines** : cytokines pro inflammatoires, **Neuron subsets** : cellules neuronales, **modest** : modeste, **CNS homing of leukocytes** : infiltration de leucocytes dans le SNC, **Migration of LCs** : migration de cellules de Langerhans, **mDCs** : cellules dendritiques myéloïdes, **Treg expansion** : expansion lymphocyte T régulateurs, **Dependent on WNV-E glycosylation profile** : dépendant du profil de glycosylation de E, **PRR expression** : expression de PRR.

3-2-1-2 La voie de signalisation des IFNs : la voie JAK/STAT

Les IFNAR 1 et 2 constituent les sous unités des récepteurs aux IFNs de type I. Chacune des sous-unités interagit avec les kinases JAK (Ihle, 1995). IFNAR 1 est associée avec la tyrosine kinase 2 (TYK 2), alors qu'IFNAR 2 interagit avec JAK 1 (Ihle, 1995).

Suite à la reconnaissance des IFNs de type I à la membrane plasmique, IFNAR 1 et 2 se dimérisent et activent JAK par autophosphorylation (Bach *et al.*, 1997 ; Mogensen *et al.*, 1999, Stark *et al.*, 1998).

Les JAKs activées régulent la phosphorylation de différentes protéines STAT, qui sont des facteurs de transcription cytoplasmiques, et qui forment alors des homo ou des hétéro-dimères (Aaronson et Horvath, 2002 ; Darnell, 1997 ; Darnell *et al.*, 1994, Stark *et al.*, 1998). Les dimères STAT1/STAT2 se lient à IRF9, le complexe migre dans le noyau et se lie aux éléments de réponse stimulés par les IFN, les ISREs (IFN-stimulated response elements) ou ISGs des gènes stimulés par les IFN (IFN induced genes) (figure 16) (Samuel, 2001).

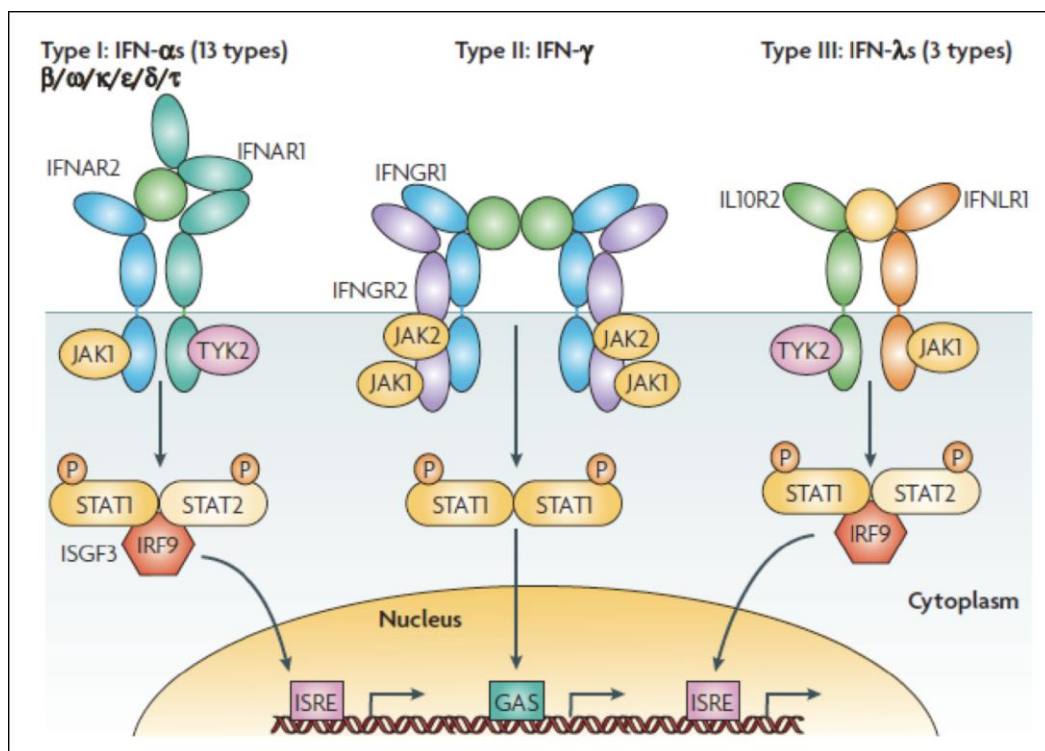


Figure 16: **Les différentes voies d'activation par les IFNs** (d'après Borden *et al.*, 2007). Ces récepteurs sont associés avec des kinases de la famille des JAK qui régulent la transcription de gènes via l'activation de STAT1, STAT2, JAK1 et TYK 2. Les récepteurs aux IFN de type II et III sont indiqués pour information. **Nucleus** : noyau, **Cytoplasm** : cytoplasme.

3-2-1-3 Les gènes de résistance au VWN

La réponse IFN de type-I induit l'expression de gènes impliqués dans la résistance à la réplication du VWN, les ISGs (Der *et al.*, 1998 ; Samuel, 2001). La plupart codent pour des récepteurs PRRs ou des facteurs de transcription (Der *et al.*, 1998). Certaines de ces protéines régulent des cascades enzymatiques anti-virales : ISG15, les kinases activées par les ARNdb (PKR), les adénosines désaminases ARN-spécifiques (ADAR), les MxGTPases et les OAS (2'-5' oligoadénylate synthétase).

Parmi la centaine de protéines cellulaires dont la régulation dépend des IFN, il y a la famille des 2'-5' oligoadénylate synthétase (Samuel, 2001 ; Rebouillat et Hovanessian, 1999). Cette famille de gènes code pour plusieurs enzymes dont la 2'-5'-oligoadénylate synthétase 1b (OAS 1b) qui a été identifiée comme candidat pour la résistance au VWN de certains sous-types de souris, telles que les MBT/Pas and C.MBT-Oas1b (Perelygin *et al.*, 2002 ; Mashimo *et al.*, 2002 ; Samuel, 2002). Les souris sensibles, comme les BALB/c, ont un gène Oas 1b tronqué pour lequel il manque 30% de la séquence C-terminale (Kramer *et al.*, 2007). OAS 1b a été identifiée comme une enzyme ayant une activité d'inhibition de l'expression protéique en réponse à la présence d'ARNdb (figure 17). OAS 1b activée catalyse la synthèse de ppp(A2_p)nAoligoadenylates (2-5A) (Kerr *et al.*, 1978) qui elle-même active la RNaseL conduisant à une dégradation de l'ARN (figure 17).

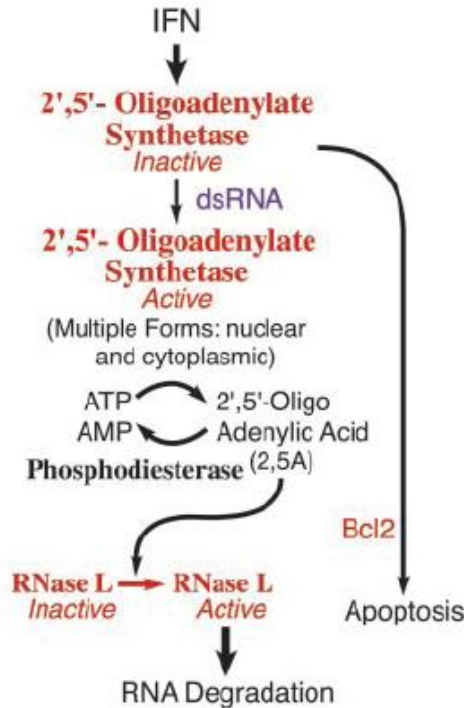


Figure 17: **Activation de la voie des 2'5'oligoadénylate synthétases** (d'après Samuel (2002)). La famille des 2'5'oligoadénylate synthétases et la nucléase RNaseL induisent la dégradation de l'ARN et l'apoptose. **Multiple Forms : nuclear and cytoplasmic** : formes multiples, **Apoptosis** : apoptose, **RNA degradation** : dégradation de l'ARN.

Il a aussi été montré que les équidés (Rios *et al.*, 2010) et les humains (Lim *et al.*, 2009) possèdent un gène orthologue, le gène OAS1. Des mutations observées sur ce gène chez chacune de ces deux espèces sont associées à une augmentation de la sensibilité à l'infection. Chez le cheval, des polymorphismes sont localisées dans la région du promoteur suggérant que des différences dans l'expression du gène OAS1 déterminent la capacité de l'hôte à résister aux manifestations cliniques associées à l'infection à VWN (Rios *et al.*, 2010).

ISG15 est un homologue des ubiquitines (Loeb et Haas, 1992). ISG15 se conjugue à ses protéines cibles ce qui engendre une réponse antivirale (Harty *et al.*, 2009 ; Sadler et Williams, 2008). Plusieurs protéines impliquées dans la réponse immunitaire antivirale sont des protéines cibles d'ISG15 :

PKR, MxA, ADAR (figure 18), RIG-1 et STAT1 (Giannakopoulos *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). L'action d'ISG15 se porte sur des protéines qui participent à la réponse innée : augmentation de l'activité de 4EHP qui contrôle la traduction cap-dépendante (Okumura *et al.*, 2007), stabilisation d'IRF3 et inhibition de sa dégradation liée à l'infection virale (Lu *et al.*, 2006) et inhibition de la phosphatase 2 β induisant une augmentation de la signalisation NF- κ B (Takeuchi *et al.*, 2006).

La conjugaison d'ISG15 avec ses protéines cibles est catalysée par des protéines dont l'expression dépend des IFNs de type I (Sadler et Williams, 2008).

Les PKR agissent en tant qu'antiviraux en agissant sur la traduction (Hovanessian, 2007; Sadler et Williams, 2008; Samuel, 2001). Les IFN de type I et III induisent l'expression de PKR sous forme d'un monomère (Ank *et al.*, 2006) qui est activé par un certain nombre de ligands dont les ARNdb viraux (Meurs *et al.*, 1990; Nanduri *et al.*, 2000). Suite à l'activation, le monomère se phosphoryle et se dimérise pour donner la forme active de l'enzyme (Dey *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1996). La PKR activée phosphoryle le facteur eucaryotique d'initiation de la traduction, eIF2 α , empêchant ainsi la synthèse des protéines virales (figure 18) (Meurs *et al.*, 1992; Samuel, 1979). Les différents membres de la famille des *Flaviviridae* ne sont pas tous sensibles à l'action des PKR. Le VWN fait partie de ceux pour qui l'action des PKR s'est révélée nocive (Samuel *et al.*, 2006a).

Les protéines Mx appartiennent à la super famille des GTPases de type dynamine (Haller *et al.*, 2007). L'expression des protéines Mx est régulée par les IFNs (figure 18). Chez l'Homme et la souris, deux formes de la protéine existent, MxA/B et Mx1/2, respectivement. Mx1 est localisée dans le cytoplasme, alors que Mx2 se retrouve au niveau du RE (Stertz *et al.*, 2006). La transcription de Mx1 est activée par les IFN de type I (Staeheli *et al.*, 1986), chez la souris Mx1 est activée par les IFN de type I et III (Holzinger *et al.*, 2007; Meager *et al.*, 2005). Une activité antivirale de MxA inhibant la réplication a été démontrée pour le VWN (Hoenen *et al.*, 2007). Le VWN échappe à l'action de MxA en étant protégé par les structures membranaires (Hoenen *et al.*, 2007).

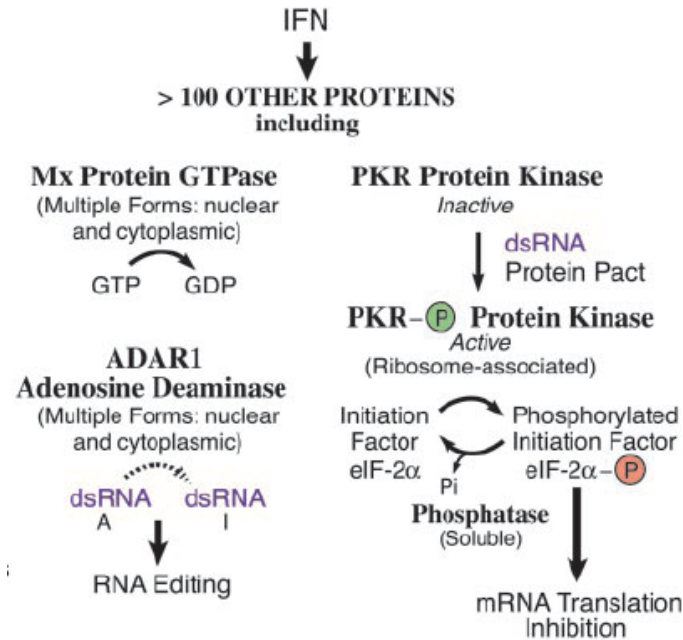


Figure 18: **Fonctions biochimiques de protéines induites par la voie IFN** (d'après Samuel, 2002). La famille des GTPases Mx semble cibler la nucléocapside virale et inhiber la synthèse de l'ARN. Les kinases PKR inhibent l'initiation de la traduction par la phosphorylation du facteur d'initiation de la synthèse protéique, eIF-2 α . ADAR1, adénosine désaminase participe à l'édition de l'ARN. **OTHER PROTEINS** : autres protéines, **including** : incluant, **Protein** : protéine, **Multiple Forms** : formes multiples, **nuclear and cytoplasmic** : nucléaire et cytoplasmique, **dsRNA** : ARNdb, **RNA editing** : édition de l'ARN, **Protein pact** : pack protéique, **Ribosome-associated** : associée au ribosome, **Initiation Factor** : facteur d'initiation, **Phosphorylated** : phosphorylé, **mRNA Translation Inhibition** : inhibition de la traduction de l'ARNm.

3-2-1-4 Cytokines impliquées dans la réponse innée

L'expression d'IL-1 β augmente dans les macrophages de souris dès 12h post infection (Shirato *et al.*, 2006). L'expression de cette cytokine augmente aussi dans les tissus neuronaux de patients présentant une encéphalite, ainsi que dans des cultures de névroglie humaine infectées par le VWN (van Marle *et al.*, 2007). IL1- β est nécessaire pour la migration des cellules de Langerhans (LCs), et leur accumulation dans les ganglions lymphatiques suite à une infection cutanée (Byrne *et al.*, 2001).

Des souris déficientes en IFN- γ ou en récepteur à IFN- γ ont des taux de mortalité, suite à l'infection à VWN, plus élevés et des temps de survie plus courts, que des souris contrôles. La virémie est plus élevée et la réplication virale est plus importante dans les tissus périphériques, ce qui amène à une neuro-invasion plus précoce et plus forte (Shrestha *et al.*, 2006). Un traitement des cellules dendritiques primaires (DCs) par de l'IFN- γ réduit drastiquement la réplication virale (Shrestha *et al.*, 2006). L'IFN- γ est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T- γ/δ , mais pas pour celle des lymphocytes CD8+, pour limiter la dissémination du virus (Wang *et al.*, 2003a ; Shrestha *et al.*, 2006).

Paradoxalement, le MIF (facteur d'inhibition de la migration des macrophages) favorise la neuro-invasion, en augmentant la perméabilité de la BHE via les cytokines pro-inflammatoires (Arjona *et al.*, 2007) ; de plus, il n'est pas exclu que MIF induise l'expression de métallo-protéinases de matrice (MMPs). MMP-9, en particulier, facilite l'entrée du VWN dans le cerveau (Wang *et al.*, 2008). Chez la souris, l'infection à VWN provoque l'augmentation du MIF durant la phase précoce de l'infection. Chez l'Homme, des niveaux importants de MIF ont été détectés dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Arjona *et al.*, 2007).

3-2-1-5 Cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée

Chez l'Homme, les macrophages représentent une fraction importante des infiltrats cellulaires retrouvés dans le système nerveux central (SNC) suite à une infection à VWN (Kelley *et al.*, 2003). Les macrophages peuvent fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigène (APCs), stimulant la prolifération des lymphocytes T anti-VWN (Kulkarni *et al.*, 1991a).

Des données expérimentales indiquent que des molécules clés de la défense de l'hôte, telles que RIG-1, MDA-5, PKR et RNase L, sont nécessaires dans les macrophages pour contrôler l'infection indépendamment ou non de la production d'IFN de type I (Samuel *et al.*, 2006a ; Daffis *et al.*, 2007). L'infection de cultures primaires de macrophages humains avec le VWN induit la production d'IL-8 mais inhibe l'expression d'IL-1 β et des IFN de type-I du fait de l'interférence avec la voie JAK/STAT importante dans l'activation des macrophages (Kong *et al.*, 2008a).

Les cellules de Langerhans sont les cellules dendritiques localisées dans la peau. Dans un modèle murin, elles transportent le virus jusque dans les ganglions lymphatiques sous contrôle de l'IL-1 β (Johnston *et al.*, 2000; Byrne *et al.*, 2001). Ces cellules sont capables de présenter un antigène (Kulkarni *et al.*, 1991). Des études menées chez l'Homme ont montré que les DCs de personnes âgées produisent moins d'IFN de type-I que les sujets plus jeunes (Qian *et al.*, 2011).

Les lymphocytes T γ/δ sont une population de lymphocytes intra-épithéliaux (Holtmeier et Kabelitz, 2005). La population de lymphocytes T γ/δ augmente de façon significative après une infection à VWN, et les souris déficientes en lymphocytes T γ/δ ont des charges virales plus fortes et une mortalité plus élevée (Wang *et al.*, 2003a). Suite à l'infection les lymphocytes T γ/δ produisent des taux importants d'IFN- γ nécessaires pour un contrôle précoce de la dissémination du VWN (Shrestha *et al.*, 2006b).

De plus les lymphocytes T γ/δ jouent un rôle dans la promotion de la réponse adaptative en facilitant la maturation des DCs (Fang *et al.*, 2010).

Enfin, les polynucléaires neutrophiles (PNNs) sont rapidement recrutés sur le site d'infection, chez la souris, et sont le lieu d'une réplication efficace du VWN (Bai *et al.*, 2010). Les PNNs constituent des réservoirs pour la réplication et la dissémination du virus. Les méningo-encéphalites sont souvent associées à une présence de neutrophiles dans le LCR chez l'Homme (Rawal *et al.*, 2006; Tyler *et al.*, 2006).

3-2-2 La réponse adaptative

3-2-2-1 La réponse humorale

Les anticorps neutralisants (AcN), dont les IgM, limitent la dissémination du virus (Campbell *et al.*, 2002). Le taux d'IgM fait un pic 2 à 8 jours après le début des symptômes (figure 19) et diminue rapidement dans les semaines qui suivent (Roerhig *et al.*, 2002), mais peuvent être détectés jusqu'à 16 mois après le début de l'infection chez l'Homme (Kramer *et al.*, 2007). Les IgM ne passent pas la barrière hémato-encéphalique (Tardei *et al.*, 2000).

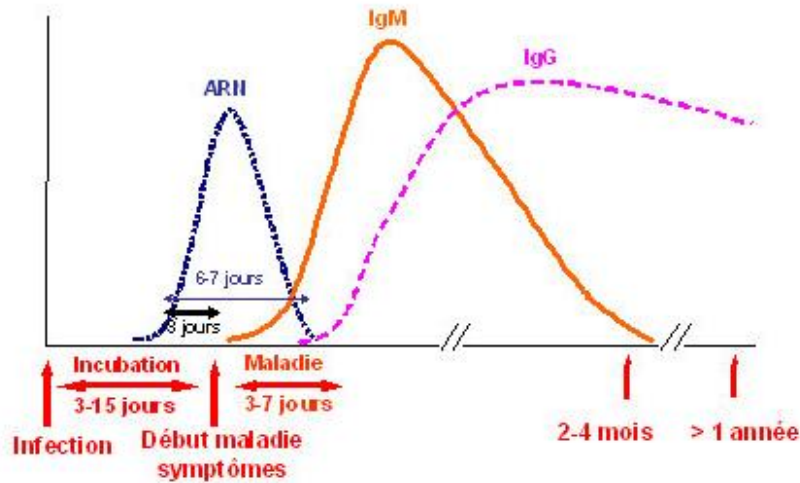


Figure 19: **Cinétique du virus et des anticorps IgM et IgG au cours d'une infection par le virus West Nile** (d'après l'INVS).

Les IgG apparaissent dans les 12 jours après l'apparition des symptômes chez l'Homme, 6-8 jours chez la souris (Samuel et Diamond, 2006) et peuvent persister plusieurs années (Roerhig *et al.*, 2002 ; Tardei *et al.*, 2000 ; Petersen *et al.*, 2002) (figure 19). Ces immunoglobulines permettent effectivement l'élimination du virus et apportent une immunité protectrice à long terme (Dauphin et Zientara, 2007).

La plupart des AcN sont dirigés contre la protéine E, mais aussi la protéine prM (Colombage *et al.*, 1998 ; Falconar, 1999 ; Pincus *et al.*, 1992 ; Vazquez *et al.*, 2002).

La protéine E possède trois domaines structuraux (voir paragraphe 1-3-1-3). Les trois domaines sont reconnus par des AcN (Beasley et Barrett, 2002 ; Oliphant *et al.*, 2005 ; Volk *et al.*, 2004). Cependant, les anticorps les plus puissants reconnaissent un épitope situé sur le domaine III (DIII) (Beasley *et al.*, 2002 ; Oliphant *et al.*, 2005 ; Volk *et al.*, 2004). Des AcN dirigés contre DIII ont été détectés dans le sérum de patients convalescents et ont permis la protection de souris après transfert des sérums après que le VWN ait atteint le SNC (Samuel et Diamond, 2006).

Les anticorps anti-DIII sont de très bons inhibiteurs de l'entrée du VWN du fait qu'ils bloquent l'épitope lors de la phase de reconnaissance du récepteur, inhibant la fusion (Gollins et Porterfields, 1986b ; Nybakken *et al.*, 2005).

Même si la plupart des AcN reconnaissent des protéines structurales, certains AcN reconnaissent NS1 (Chung *et al.*, 2006). NS1 est détectée dans les sérums des animaux infectés, lors de la phase aigüe de la maladie (Chambers *et al.*, 1990 ; Macdonald *et al.*, 2005).

3-2-2-2 La réponse cellulaire, les lymphocytes T

Les lymphocytes T cytotoxiques prolifèrent suite à l'identification de cellules infectées qui expriment à leur surface des CMH de classe I (CMH I), et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (Douglas *et al.*, 1994 ; Kesson *et al.*, 1987 ; Kulkarni *et al.*, 1991b). Les cellules infectées sont alors lysées sous l'effet des perforines et des granzymes A et B ou via les interactions Fas-Fas ligand (Harty *et al.*, 2002 ; Russell et Ley, 2002). Les souris déficientes en lymphocytes T CD8⁺ ou en CMH I présentent une réponse humorale normale mais ont des charges virales plus importantes dans le foie et le SNC (Shrestha et Diamond, 2004 ; Wang *et al.*, 2003b). Les lymphocytes T CD8⁺ requièrent la présence de perforine pour contrôler les souches de lignage I, les souris déficientes en perforines ont en effet des charges virales et une mortalité plus élevées après infection par la souche NY99 (Shrestha *et al.*, 2006a). Les lymphocytes T CD4⁺ contribuent largement au contrôle de l'infection à travers de multiples mécanismes dont la sensibilisation des lymphocytes T CD8⁺, la production de cytokines, l'activation et la sensibilisation des lymphocytes B, et la cytotoxicité directe.

Une déplétion en lymphocytes T CD4⁺ ou une déficience génétique en CMH de classe II résulte en une réponse anticorps atténuée et une augmentation de la létalité (Samuel et Diamond, 2006).

3-2-3 Exemple chez l'oiseau du rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'infection à VWN et de l'effet de l'âge

La réponse humorale est cruciale dans le contrôle des premières phases ainsi que pour assurer la survie à l'infection (Diamond *et al.*, 2003 a, b ; Dauphin et Zientara, 2007). Des poulets de 10 semaines (*Gallus gallus domesticus*) infectés par le VWN séroconvertissent 8 jours post infection (p.i) (Fair *et al.*, 2011 ; Langevin *et al.*, 2001; Weingartl *et al.*, 2003). La réponse lymphocytaire B joue un rôle important par la sécrétion des immunoglobulines G (IgG) (Diamond *et al.*, 2003a) et des immunoglobulines M (IgM) (Diamond *et al.*, 2003b). Nemeth *et al.* (2009) ont établi que la réponse humorale anti-VWN est de longue durée et protectrice chez le moineau domestique (*Passer domesticus*), espèce résistante à l'infection à VWN.

De plus, l'âge joue aussi un rôle dans le contrôle de l'infection. Ainsi aucune mortalité n'a été observée chez le poulet adulte. Des infections expérimentales sur des poulets adultes ont montré que les virémies sont relativement faibles ($10^{2.4} - 10^{5.0}$ PFU/ml) sans signes cliniques (Langevin *et al.*, 2001), alors que des poussins de 1 à 3 jours présentent une virémie plus forte ($10^{6.5} - 10^{7.5}$ PFU/ml) et une morbidité significative (Turell *et al.*, 2000, 2001, 2002a). Dans l'étude publiée par Nemeth et Bowen (2007), aucun poussin de plus de 14 jours ne présente une virémie à un niveau assez haut pour infecter un moustique ($> 10^5$ PFU/ml) (Turell *et al.*, 2002b). De plus aucun signe clinique n'est observé chez le poussin de plus de 1 jour.

L'importance de l'âge est liée à l'immaturité du système immunitaire à l'éclosion du poussin. Le développement immunitaire débute durant l'embryogénèse et atteint sa maturité des semaines voire des mois après l'éclosion (Dibner *et al.*, 1998). Lowenthal *et al.* (1994) ont observé que, chez le poulet, la réactivité des lymphocytes T aux mitogènes augmente progressivement entre J2 et J4 post-éclosion, et qu'à 1 semaine, le niveau de réponse est équivalent à ce qui est observé avec les lymphocytes T des adultes. Ainsi, l'immunosuppression observée chez le poulet de moins de 2 semaines est due à l'immaturité de la réponse lymphocytaire T (Lowenthal *et al.*, 1994).

La rate est un organe lymphoïde jouant un rôle important dans la maturation et la différenciation des lymphocytes (Jeurissen, 1991).

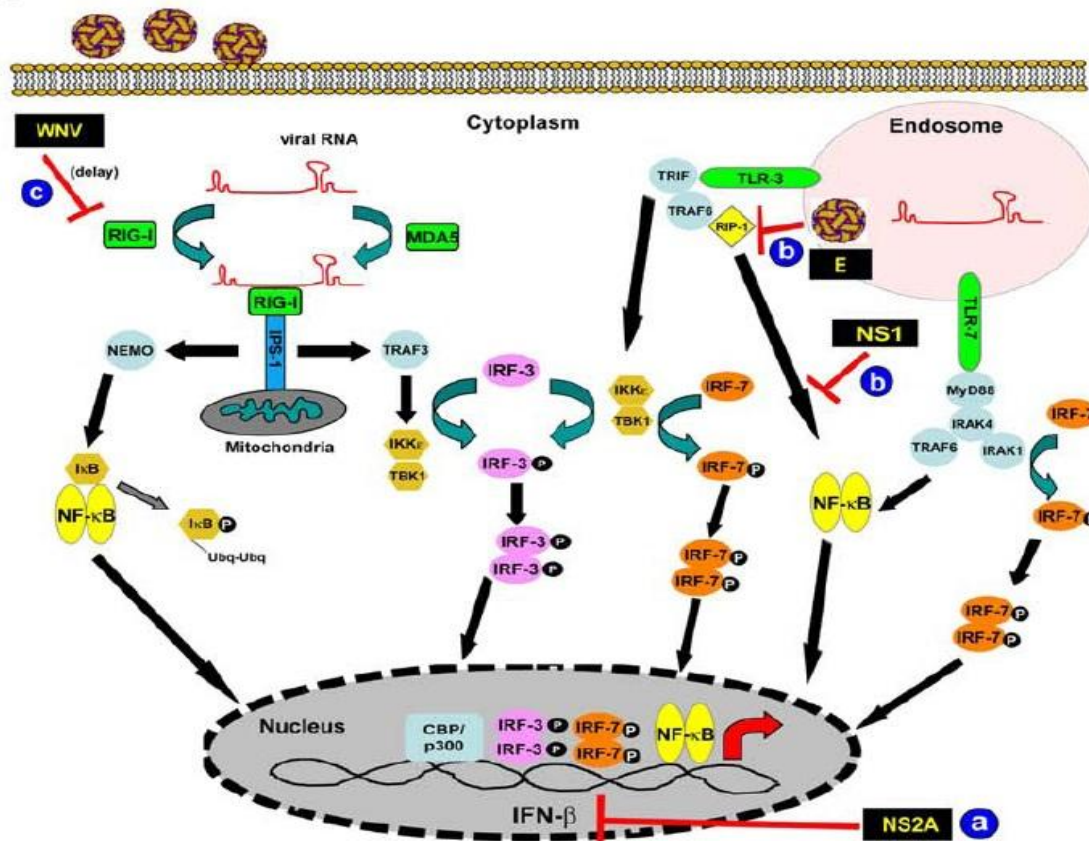
Les interleukines IL-4, IL-10 et IL-18, ainsi que l'IFN- γ sont détectables dans les rates des embryons de poulet de 12 jours (Abdul-Careem *et al.*, 2007). L'expression des cytokines est supérieure dans les rates de poussins à celles des embryons, avec une augmentation constante durant l'embryogénèse et un pic à J7 post-éclosion (Abdul-Careem *et al.*, 2007).

3-2-4 Mécanismes d'évasion du VWN au système immunitaire de l'hôte

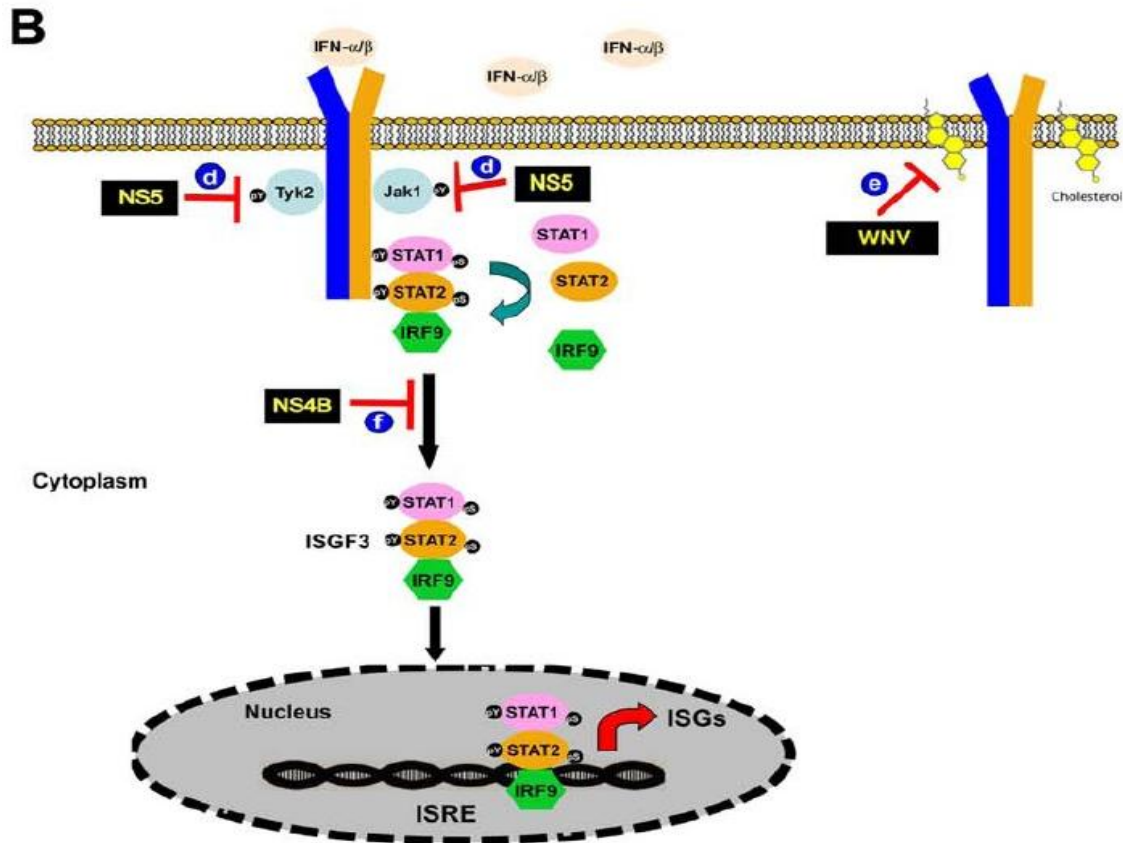
Les protéines non structurales du VWN inhibent la phosphorylation de JAK1 et TYK2 ainsi que l'activation des facteurs de transcriptions STAT1 et STAT2, (Guo *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2005a). NS4 empêche la phosphorylation de STAT1 et STAT2, et leur translocation vers le noyau (figure 20) (Evans et Seeger, 2007; Liu *et al.*, 2005; Munoz-Jordan, 2003; Muñoz-Jordán *et al.*, 2005). NS2A inhibe la transcription des gènes sous contrôle de l'IFN- β (figure 20) (Liu *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2006). NS5 inhibe la phosphorylation de JAK1 et TYK2, bloquant le signal IFN (figure 20) (Best *et al.*, 2005 ; Mazzon *et al.*, 2009). La transduction du signal et la sécrétion de cytokines induites par TLR3 sont bloquées par NS1 (Wilson *et al.*, 2008). IRF3 et IRF7 sont des facteurs de transcription cellulaires induisant la production d'IFN et stimulant l'expression d'ISGs.

Ces facteurs jouent un rôle dans la défense anti-VWN (Daffis *et al.*, 2007 ; Daffis *et al.*, 2008b) mais il a été montré que le VWN retarde l'activation d'IRF3 jusqu'à ce que la production virale soit bien établie (Fredericksen et Gale, 2006), permettant ainsi au virus de se multiplier dans la cellule avant que la réponse IFN ne limite sa diffusion (Diamond, 2009).

A



(A) Lors de l'infection, le VWN produit des intermédiaires ARN doubles brins, présents dans le cytoplasme, qui possèdent des motifs moléculaires reconnus par RIG-1 et MDA5. La liaison de l'ARN viral avec ces protéines conduit à l'activation d'IPS, induisant le recrutement de protéines signales (NEMO et TRAF3), qui vont activer IRF3 et NF-κB. Ces facteurs migrent dans le noyau et se lient au promoteur du gène de l'IFN β. Dans certaines cellules, les récepteurs TLR-3 et TLR-7 de l'endosome reconnaissent les motifs ARNdb et ARNsb, ce qui conduit au recrutement de molécules cytoplasmiques (MyD88 et TRIF), qui initient des cascades de réactions activant IRF-3, IRF-7, et NF-κB, ayant pour conséquence la transcription de l'IFN β. Les mécanismes d'évasion du VWN incluent : (a) la réduction de la transcription du gène de l'IFN-β par NS2A, (b) le blocage de la voie RIP-1 par E et l'atténuation du signal TLR-3 par NS1 et (c) un retardement de la reconnaissance des ARN viraux par RIG-1. **WNV** : VWN, **delay** : retard, **viral RNA** : ARN viral, **Cytoplasm** : cytoplasme, **Mitochondria** : mitochondrie, **Nucleus** : noyau.



(B) La sécrétion d'IFN par les cellules infectées résulte dans l'activation de voies de signalisation autocrines et paracrines à travers les récepteurs pour les IFN- α et IFN- β (IFNAR). La liaison d'une molécule d'IFN à ces récepteurs induit l'activation et la phosphorylation de la tyrosine des membres de la famille JAK (JAK1 et Tyk2) et de la fraction cytoplasmique du récepteur à l'IFN- α/β . Cette étape permet le recrutement de STAT1 et STAT2, qui sont alors phosphorylées par les JAKs. Les protéines STAT1 et STAT2 phosphorylées s'hétérodimérisent, s'associent à IRF-9 et migrent dans le noyau, où elles se lient aux séquences ISRE et induisent l'expression de centaines de gènes ISGs. Les mécanismes d'évasion du VWN incluent (d) le blocage de la phosphorylation de Tyk2 et JAK1 par NS5, (e) blocage des IFNAR suite au réarrangement du cholestérol membranaire et (f) atténuation de la voie STAT par NS4B. **WNV** : VWN, **delay** : retard, **viral RNA** : ARN viral, **Cytoplasm** : cytoplasme, **Mitochondria** : mitochondrie, **Nucleus** : noyau.

Figure 20: Voie de signalisation IFN et mécanismes d'évasion du VWN (d'après Diamond (2009)).

Les oiseaux ont une température corporelle plus élevée que les mammifères et les insectes (Kuno, 1997). Pour compléter son cycle viral, le VWN doit pouvoir se répliquer sur une gamme de température large, ce qui restreint les modifications génomiques viables (Dunster *et al.*, 1990 ; Huang *et al.*, 2000; Weaver *et al.*, 1999).

Une des caractéristiques majeures du VWN est sa capacité à envahir le SNC, ce qui est à l'origine de graves complications physiopathologiques. Dans le prochain paragraphe, je vais vous développer les différentes étapes conduisant à l'entrée du virus dans le SNC et aux conséquences.

3-3 L'infection du système nerveux

3-3-1 Les différentes voies d'entrée dans le SNC

Le système nerveux central est la partie du système nerveux constitué du cerveau et de la moelle épinière. Le contrôle de la charge virale dans le sang est primordial pour prévenir la dissémination dans le SNC (Klein et Diamond, 2008). Même si la voie d'entrée préférentielle du VWN dans le SNC n'est pas clairement définie, des études chez l'animal ont montré que le VWN entre via la voie neuronale (Samuel *et al.*, 2007) par l'infection de neurones olfactifs et/ou transport axonal rétrograde à partir des neurones périphériques (Wang *et al.*, 2009) et/ou la voie circulatoire (Samuel et Diamond, 2006). Dans ce dernier cas, il reste à définir si l'infection du SNC se fait par le sang via le transport de cellules infectées, comme des monocytes et/ou des macrophages ou par passage des virions à travers les cellules endothéliales (Samuel et Diamond, 2006).

Chez la souris, le virus se réplique très vite dans les tissus périphériques, avec un pic virémique à 3-4 jours p.i, et ensuite le virus est peu à peu éliminé au fur et à mesure que la réponse immunitaire se met en place (Diamond *et al.*, 2003c). C'est pendant le pic virémique que le virus commence à envahir le cerveau, une charge virale étant clairement détectable dès 5 jours post infection.

La fenêtre de temps laissant au virus le temps d'atteindre le cerveau est donc étroite et l'entrée virale doit être efficace. L'une des voies d'entrée la plus importante est sans doute la BHE (Lustig *et al.*, 1992 ; Wang *et al.*, 2004). La BHE sert à réguler le milieu (homéostasie) dans le cerveau, en le séparant du sang. Elle protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines et des hormones circulant dans le sang. Elle représente un filtre extrêmement sélectif, à travers lequel les éléments nécessaires au cerveau sont transmis, et les déchets sont éliminés. La BHE est composée de plusieurs types cellulaires (figure 21) : Les endothéliums sanguins sont constitués de cellules endothéliales aux jonctions serrées, entourées de péricytes dont la membrane basale est principalement composée de collagène de type IV, de laminine, de protéoglycane, et de plusieurs glycoprotéines (Pardridge, 1983). L'ensemble vaisseau/péricyte est entouré par les pieds vasculaires astrocytaires.

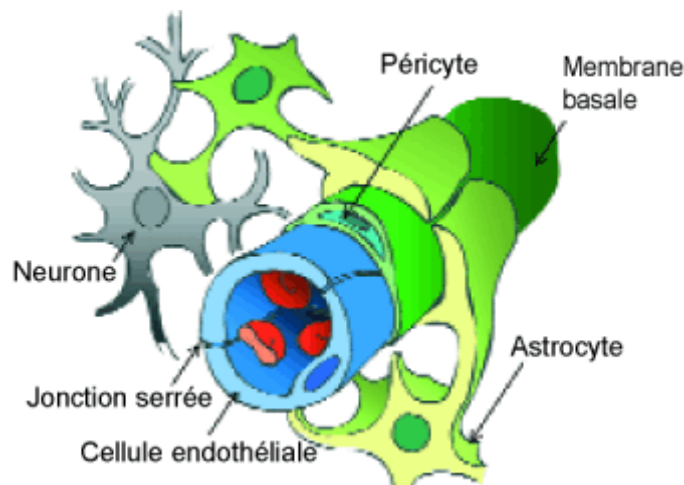


Figure 21: **Schéma de la barrière hémato-encéphalique** (d'après <http://hepato-neuro.ca>). La barrière hémato-encéphalique est la barrière cellulaire délimitant la circulation sanguine et le tissu cérébral. Les cellules endothéliales forment des jonctions serrées qui ne laissent passer les composés que par un transport actif et sélectif (par opposition à une diffusion passive). Les vaisseaux sont enserrés par les pieds des péricytes et des astrocytes, isolant les neurones.

Des particules virales libres peuvent traverser la BHE sans compromettre son intégrité (Verma *et al.*, 2009). Des cultures primaires de cellules endothéliales humaines de la BHE (HBMVE, pour Human Brain MicroVascular Endothelial cells) ont été infectées avec la souche neurovirulente, NY99 (Verma *et al.*, 2009).

Le niveau de réplication virale a été mesuré ainsi que l'évolution de l'expression des protéines des jonctions serrées (TJP, pour Tight Junction Proteins), ainsi que des molécules d'adhésion cellulaire (CAM, pour Cell Adhesion Molecules). Une multiplication virale a été objectivée par analyse qRT-PCR, sans observer d'effet cytopathique. Une augmentation de l'expression de TJPs (Claudin-1) et de CAMs (sélectine-E et molécules d'adhésion de cellules vasculaires) a été observée 2 à 3 jours p.i, respectivement, ce qui coïncide avec le pic de réplication virale. Ces données suggèrent que l'infection de cellules HBMVE peut faciliter l'entrée de particules virales libres dans le SNC sans compromettre la BHE. Une augmentation de l'expression de protéines CAMs peut favoriser l'entrée de cellules immunitaires infectées via un mécanisme de type « cheval de Troie ». La protection contre l'infection à VWN requiert une reconnaissance rapide du virus et la mise en route d'une réponse IFN. La présence du VWN dans le SNC est précédée d'une virémie et d'une multiplication périphérique transitoire.

Elle est corrélée à une évolution de la perméabilité de la BHE qui pourrait être due à l'action du TNF- α médiée par le TLR-3 ou par effet du MIF produit par les leucocytes en réponses aux cytokines et qui pourrait altérer la fonction de la BHE en activant les métalloprotéinases de matrice (MMP) (Yu *et al.*, 2007). Une déficience en TLR3 est associée à une augmentation de la réplication virale (Daffis *et al.*, 2008a) et une meilleure résistance à l'infection au VWN du fait du maintien de la perméabilité de la BHE (Wang *et al.*, 2004), ce qui suggère que l'entrée du virus dans le SNC dépend surtout de l'intégrité de la BHE.

La perte de l'imperméabilité de la BHE et la rétraction des pieds vasculaires astrocytaires sont caractérisées par la perte des jonctions serrées et la dégradation des membranes basales des péricytes, qui est catalysée en partie par les MMPs (Wang *et al.*, 2008). Les MMPs ont été associées à la rupture de la perméabilité de la BHE dans des modèles transgéniques (Gidday *et al.*, 2005). En particulier, MMP9 est impliquée dans l'entrée du VWN dans le cerveau chez la souris (Wang *et al.*, 2008). Son expression dans le cerveau murin est augmentée et MMP9 est retrouvée dans les vaisseaux sanguins. La résistance des souris MMP9^{-/-} est corrélée avec la présence d'une BHE intacte. Les charges virales dans le cerveau, les niveaux de cytokines inflammatoires et des infiltrats leucocytaires sont significativement réduits (Wang *et al.*, 2008).

Dans le SNC, le VWN cible les neurones du cortex, du cerveau moyen, du cervelet et de la moelle épinière, conduisant à leur altération voir leur mort (Samuel *et al.*, 2006b, Shrestha *et al.*, 2003 ; Hunsperger et Roehrig, 2006). L'infection et la destruction des neurones moteurs dans la corne antérieure de la moelle épinière coïncide avec des paralysies flasques (Shrestha *et al.*, 2003) (figure 22).

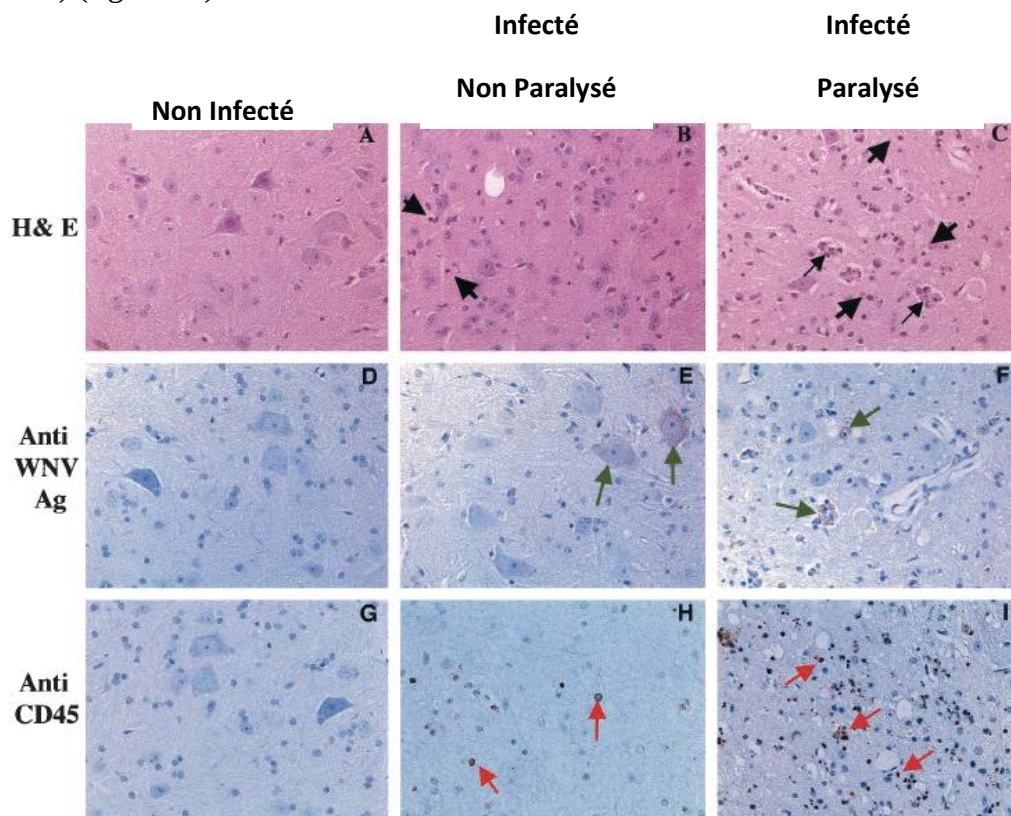


Figure 22: **Histopathologie, expression antigénique et infiltration leucocytaire suite à une infection à VWN chez la souris C57BL/6 (n=10)** (d'après Shrestha *et al.*, 2003). (A à C) Histopathologie. (A) moelle épinière de souris non infectées. (B) souris infectée mais non paralysée (C) souris infectée et paralysée, 10 jours p.i. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline et éosine (H et E). Les flèches noires en gras indiquent les leucocytes infiltrés, les flèches noires fines indiquent les neurones dégénérés. (D à F) Expression des antigènes du VWN sur des sections de moelle épinière de souris non infectées (D), infectées et non paralysées (E), infectées et paralysées (F). Un sérum polyclonal de rat infecté par le VWN a été utilisé. Les flèches vertes indiquent les neurones fortement infectés. (G à I) Infiltration des leucocytes dans la moelle épinière. Souris non infectée (G), infectée et non paralysée (H), infectée et paralysée (I). Un anticorps monoclonal anti-CD45, un antigène commun des leucocytes, a été utilisé. Les flèches rouges indiquent les leucocytes CD45+.

3-3-2 Rôle du système immunitaire dans l'entrée du virus dans le SNC

La production importante de MMP9 par les macrophages et les lymphocytes T (Leppert *et al.*, 1995 ; Welgus *et al.*, 1990) pendant l'infection virale pourrait promouvoir la sortie des leucocytes des vaisseaux afin de combattre le virus dans le cerveau. Paradoxalement l'afflux de cellules immunitaires pourrait apporter avec lui des particules virales (Berger et Avison, 2004 ; Rios *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2004). La perméabilisation de la BHE est influencée par ICAM-1, ligand pour les leucocytes présent sur l'endothélium. ICAM-1 transmet les signaux qui influencent la perméabilisation de la BHE, et la progression de la neuro-inflammation (Drevets et Leenen, 2000, Greenwood *et al.*, 2002 ; Hubbard et Rothlein, 2000). ICAM-1 joue un rôle important dans la neuro-invasion par le VWN. Le knockout d'ICAM-1 réduit la charge virale dans le cerveau sans affecter la virémie périphérique (Dai *et al.*, 2008). En réduisant la perméabilité de la BHE, l'influx viral est limité à un niveau jugulable par les cellules microgliales résidentes, et les dommages causés aux neurones par les cellules immunitaires sont limités (Dai *et al.*, 2008).

La migration des lymphocytes dans le SNC est limitée par la BHE, entraînant une localisation des cellules dans l'espace périvasculaire. Cette séquestration protège le SNC des dégâts causés par les cellules immunitaires. Cependant, les infections du SNC par des virus neurotropes hautement cytopathiques, comme le VWN, requiert la pénétration des lymphocytes T dans le parenchyme (McCandless *et al.*, 2008). Des souris présentant des délétions en CD8 ont des charges virales significatives dans le foie et le SNC, et des taux de mortalité plus élevés après infection à VWN. Une persistance du virus dans le SNC est observée chez les survivantes, ce qui suggère que les lymphocytes T sont nécessaires pour complètement éliminer le virus dans le SNC (Klein et Diamond, 2008).

Les lymphocytes T présentent un ligand à leur surface, le CXCR4, qui est reconnu par un récepteur, CXCL12, localisé dans l'espace péri-vasculaire (figure 13). L'inhibition de CXCR4 favorise l'entrée des lymphocytes T dans le parenchyme du SNC et améliore l'élimination du virus dans cette région (McCandless *et al.*, 2008).

3-3-3 Physiopathologie de l'infection au sein du SNC

3-3-3-1 Neuro-toxicité de la réaction immunitaire

L'équilibre entre l'élimination du virus et l'immuno-pathologie dans le SNC est probablement modulé par la réponse immunitaire anti-virale qui nécessite une mobilisation efficace des lymphocytes T. Les leucocytes impliqués produisent des cytokines pro-inflammatoires qui induisent une pathologie suite à la présence de protéinases, de cytokines neurotoxiques et de dérivés réactifs de l'oxygène sécrétées par les cellules gliales (Dheen *et al.*, 2007 ; Ghoshal *et al.*, 2007 ; Heppner *et al.*, 2005). Cependant, l'altération des neurones peut aussi être dû à l'effet cytopathique du virus (Nargi-Aizenman *et al.*, 2004 ; Mishra *et al.*, 2007).

3-3-3-2 Destruction neuronale

3-3-3-2-1 Rôle du virus

Afin de déterminer le rôle intrinsèque du virus en dehors de l'action du système immunitaire, des infections ont été réalisées sur des cultures de neurones murins dérivés de cellules embryonnaires (Shrestha *et al.*, 2003). Dans les 72h post infection par la souche New York 2000, toutes les cellules neuronales étaient infectées, et beaucoup d'entre elles étaient en apoptose. Des observations similaires ont été faites sur des cultures primaires de cellules neuronales de rats (Li *et al.*, 2005a).

La protéine de capsid est capable à elle seule d'induire une condensation nucléaire rapide et d'induire la mort cellulaire sur des cultures de cellules HeLa, 293-T, RD ou SH-SY5Y (Yang *et al.*, 2002). L'apoptose est induite par la voie mitochondriale suite à l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3 (Yang *et al.*, 2002).

La neuropathogénèse a été étudiée sur des neuroblastomes humains ainsi que sur des cultures primaires de neurones de rat de la région de l'hippocampe. Une phosphorylation transitoire d'eIF2 (kinase-dépendant eukaryotic initiation factor 2) et une induction de la réponse pro-apoptotique CHOP-dépendante (cyclic AMP response element binding

transcription factor homologous protein) a été observée (Medigeshi *et al.*, 2007). Les cellules infectées par le VWN présentent les caractéristiques de cellules en apoptose (i) induction de l'arrêt de la multiplication cellulaire et induction de l'expression de gènes induisant l'endommagement de l'ADN (ii) activation de la caspase-3 et (iii) clivage de la poly(ADP-ribose) polymérase. Les protéines non structurales seules suffisent à induire l'expression de CHOP (Medigeshi *et al.*, 2007).

3-3-3-2-2 Rôle des cellules du SNC

L'autopsie de cerveaux humains infectés par la souche NY99 du VWN, et présentant des encéphalomyélites (VWNE) a révélé qu'à la fois les neurones et la névroglie étaient infectés. Les cellules astrocytaires sécrètent des facteurs cytotoxiques, qui sont la cause d'apoptose neuronale (van Marle, 2007). Une augmentation de l'expression de gènes de la réponse pro-inflammatoire, de CXCL10, de l'interleukine-1 et de l'indolamine-2, 3 désoxygénase, simultanément avec une diminution de l'expression de la protéine protectrice OASIS, spécifique des astrocytes a été observée chez les patients VWNE par rapport aux témoins non VWNE. De même l'expression de la protéine de capsid du VWN, souche NY99, par un vecteur dérivé du virus Sindbis, dans les neurones et la microglie en culture (astrocytes (U373), monocytes (U937), neurones (Human cholinergic neuronal, LAN-2)), et aussi chez le rat, a conduit à la libération de facteurs neurotoxiques par les astrocytes infectés et à l'augmentation de l'expression de gènes de la réponse pro-inflammatoire, ainsi qu'à la suppression d'OASIS (van Marle, 2007).

Cependant, les vecteurs dérivés du virus Sindbis expriment de fortes quantités de protéine de capsid, ce qui a peut-être conduit à une mort des neurones par nécrose. A la fois une mort cellulaire nécrotique et apoptotique ont été rapportées dans les tissus infectés humains et animaux (Cantile *et al.*, 2001 ; Sampson *et al.*, 2000 ; Senne *et al.*, 2000, Shieh *et al.*, 2000). Ce mécanisme de mort cellulaire titre-dépendant joue un rôle important dans la pathologie du VWN (Chu et Ng, 2003 ; Solomon et Vaughn, 2002). Ainsi, les charges virales dans le SNC et systémique pourraient déterminer les conséquences pathologiques et expliquer la variété des tableaux cliniques observés (van Marle *et al.*, 2007).

3-3-3-2-3 *Persistence du virus dans le SNC ?*

Le VWN pourrait se maintenir dans le SNC via les astrocytes. En effet, des infections expérimentales de cellules astrocytaires de souriceaux nouveaux-nés avec la souche NY-385-99 ont montré une persistance du virus (Diniz *et al.*, 2006). De plus, Appler *et al.* (2010) ont montré que le VWN persiste dans le SNC de souris infectées jusqu'à 6 mois p.i. Des expériences menées chez le hamster ont montré que le virus persiste dans les neurones et est à l'origine de dysfonctionnements (Siddhartan *et al.*, 2009). En effet, le virus colocalise avec les lésions, suggérant que la persistance du virus contribue à la neuropathogénèse.

Chez l'humain, il n'y a pas à ce jour de données sur la persistance du VWN dans le SNC. Cependant, la présence d'IgM dans le LCR jusqu'à 5 mois p.i permet de penser que le virus persiste dans le SNC des patients en convalescence.

Les dommages et lésions décrites plus haut dans le SNC des animaux infectés par le VWN sont responsables de troubles neurologiques.

3-3-3-2-4 *Les signes cliniques*

La plupart des individus infectés par le VWN ne présentent pas de symptômes par contrôle précoce de l'infection et élimination rapide du virus. Chez l'Homme, approximativement 20% des individus développent des symptômes de type grippaux pendant 3 à 6 jours (fièvre, maux de tête, malaise et parfois éruption cutanée).

Moins de 1% des patients infectés développent une forme nerveuse (méningite, encéphalite ou myélite) qui peut être fatale, particulièrement chez les personnes âgées ou immuno-déprimées (Sejvar *et al.*, 2003 ; Petersen et Marfin, 2002).

Les symptômes peuvent durer plusieurs semaines, et dans certains cas aboutir à des séquelles permanentes (Kramer *et al.*, 2007). Parmi les patients hospitalisés à New York et dans le New Jersey, lors de l'épidémie de 2000, seulement un tiers des patients avait retrouvé une mobilité complète au bout d'un an. Lors de l'épidémie qui a touché les Etats-Unis, des cas de paralysie flasque aigüe (syndrome de type polio) sont apparus comme des conséquences de l'atteinte du SNC (Saad *et al.*, 2005). Ce syndrome est associé à une mortalité significative et une morbidité à long terme (Dauphin et Zientara, 2007). Les régions touchées dans le cerveau peuvent être la substance noire (Kramer *et al.*, 2007), les noyaux gris centraux (Sejvar *et al.*, 2003), le cervelet (Fratkin *et al.*, 2004), le pont de l'encéphale (Jeha *et al.*, 2003 ; Sejvar *et al.*, 2003) et le thalamus (Kramer *et al.*, 2007).

Quelques cas de maladie hémorragiques ont été décrits aux Etats-Unis (Paddock *et al.*, 2006), ainsi que quelques cas d'hépatites en Roumanie, de pancréatites en Russie et de myocardites en Israël (Tsai *et al.*, 1998 ; Platonov *et al.*, 2001 ; Weinberger *et al.*, 2001).

Les infections chez les équidés (cheval, âne, mule) sont similaires aux infections humaines (Dauphin et Zientara, 2007). Comme chez l'Homme, des signes cliniques ne sont observés que sur une faible proportion d'individus (environ 10%) (Petersen et Roehrig, 2001). La sévérité des signes cliniques dépend de plusieurs facteurs dont : l'âge, les méthodes d'élevage, la virulence de la souche, les conditions de stabulation, la sensibilité génétique, et des infections précédentes à d'autres flavivirus (Autorino *et al.*, 2002 ; Steinman *et al.*, 2002 ; Tesh *et al.*, 2002a).

Les signes neurologiques les plus courants sont l'ataxie, la paralysie des membres postérieurs, pouvant être associée à des frissons, de la fasciculation, de l'atonie, un défaut de sensibilité musculaire et/ou d'autres symptômes caractéristiques de méningo-encéphalite (Ward *et al.*, 2004 ; Cantile *et al.*, 2000). Le taux de mortalité chez les chevaux cliniquement affectés a atteint jusqu'à 20-57% aux Etats-Unis, en France, en Italie et en Israël (Steinman *et al.*, 2002 ; Ward *et al.*, 2004 ; Cantile *et al.*, 2000 ; Murgue *et al.*, 2001).

Chez les oiseaux la sensibilité à l'infection varie en fonction des espèces. Le corbeau américain et le geai bleu (*Cyanocitta cristata*) sont deux espèces sensibles chez qui le virus est retrouvé dans le cerveau, le cœur, les reins, les poumons, les gonades, le foie, la rate, les intestins, l'œsophage et la peau (Komar *et al.*, 2003 ; Steele *et al.*, 2000). En revanche aucune mortalité n'a été enregistrée chez la poule même suite à une infection avec des charges virales pouvant aller jusqu'à 5log10 PFU/ml de sérum (Brault, 2009). Le virus est pourtant retrouvé dans le myocarde, le foie, les reins, les poumons et les intestins. Des examens histologiques montrent des lésions de nécrose dans le myocarde, des néphrites, et des congestions pulmonaires (Senne *et al.*, 2000). Les mécanismes impliqués dans la différence de sensibilité à l'infection par une même souche parmi différentes espèces d'oiseaux ont été peu explorés. Le fond génétique et l'immunocompétence pourraient jouer un rôle (Fair *et al.*, 2011).

A présent, après avoir décrit le virus et les conséquences de l'infection qu'il provoque chez différents hôtes, je vais vous présenter un compte rendu de la situation épidémiologique suivi de la phylogénie du VWN.

4- Epidémiologie

Le virus circule de façon enzootique et endémique en Afrique et en Asie. Dans le reste du monde, notamment en Europe et en Amérique, il provoque régulièrement des épidémies et des épizooties.

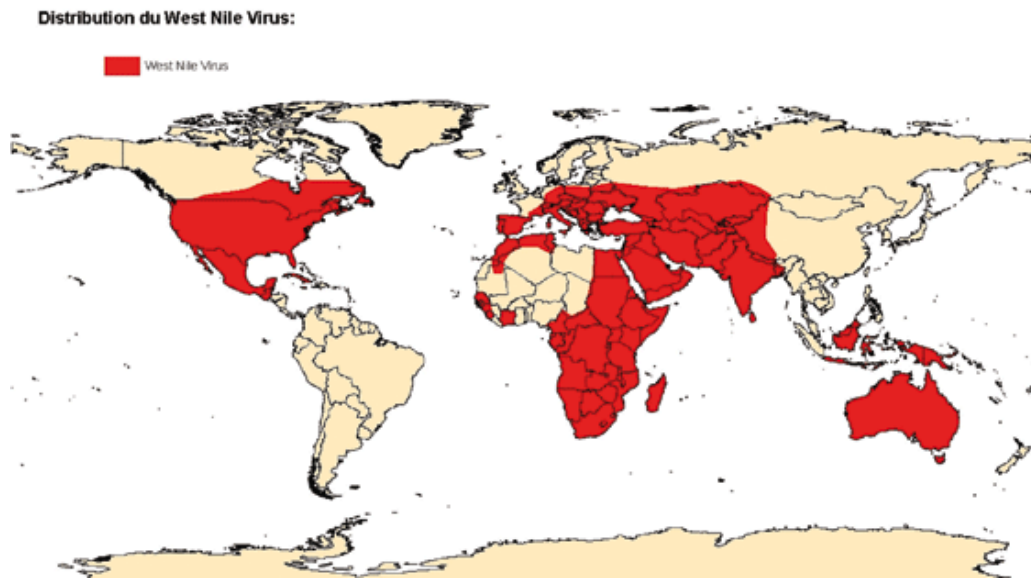
En Israël en 1951, puis en 1957, plusieurs épisodes épidémiques ont été rapportés avec des cas d'encéphalites parfois mortelles. Puis deux épidémies importantes ont eu lieu en Afrique du Sud, en 1974 puis en 1983, avec des milliers de cas d'atteintes pseudogrippales. En 1994, une épidémie est survenue dans une oasis en Algérie, atteignant principalement les enfants, avec quelques cas mortels.

En Europe, deux épisodes importants en zone urbaine ont été observés en Roumanie, en 1996 à Bucarest, et en Russie (Volgograd), avec plus de 800 cas d'encéphalites survenus principalement chez des personnes âgées. Plusieurs flambées ne touchant que des chevaux ont été décrites dans le bassin méditerranéen : en Italie en 1998, au Maroc en 1996 et 2003, en France en 2000, 2004 et 2006 (Lecollinet *et al.*, 2008). Les différents virus identifiés au cours de ces épisodes sont proches au niveau phylogénétique et appartiennent au lignage 1. Les différentes flambées sont toutes observées en période estivale en liaison directe avec l'abondance des vecteurs, généralement entre mi-juillet et octobre dans l'hémisphère nord.

En Israël, une mortalité aviaire anormale liée au virus WN a été observée chez des oiseaux migrateurs et des oies domestiques en 1997-1998, par la suite un épisode a été rapporté en 2000 chez l'Homme et chez les chevaux. L'émergence inattendue du VWN dans le Nouveau Monde en 1999, avec une souche proche de celle ayant circulé en 1998 en Israël, s'est manifestée par l'apparition de plusieurs cas d'encéphalites humaines avec quelques décès à New York, qui furent considérés initialement comme des cas d'encéphalite de Saint-Louis.

En parallèle, une mortalité importante des *Corvidae*, en particulier des geais bleus (*Cyanocitta cristata*) et des corbeaux américains (*Corvus brachyrhynchos*), a permis la mise en évidence du virus WN. Rapidement le virus s'est répandu, avec des cas rapportés dans 4 états en 1999, puis 21 en 2001, 43 en 2002, pour atteindre l'ensemble du territoire (carte 1).

Pour les années 2002-2003 correspondant au pic de transmission, 5812 cas d'encéphalites ont été dénombrés, dont 548 décès. Le Canada a été touché en 2000, puis la Caraïbe (avec la Guadeloupe en 2002) (Quirin *et al.*, 2004) et le Mexique (Estrada-Franco *et al.*, 2003), pour atteindre l'Amérique du Sud et l'Argentine en 2006 (Petersen et Hayes, 2008). La situation sur le continent américain est particulièrement contrastée, avec les Etats-Unis et le Canada ayant rapporté de nombreux cas humains et équins, alors que dans les pays d'Amérique centrale et du Sud, la transmission du virus WN a été mise en évidence seulement par l'enregistrement de séroconversions chez les chevaux ou les oiseaux, peu de cas neurologiques d'infection à VWN ayant été enregistrés (7 cas au Mexique et 5 cas dans les Caraïbes) (Komar et Clark, 2006).



Carte 1: **Répartition mondiale du VWN en 2011** (zones rouges) (d'après <http://www.moustiquesinfos.sante.gouv.fr/spip.php?rubrique39>).

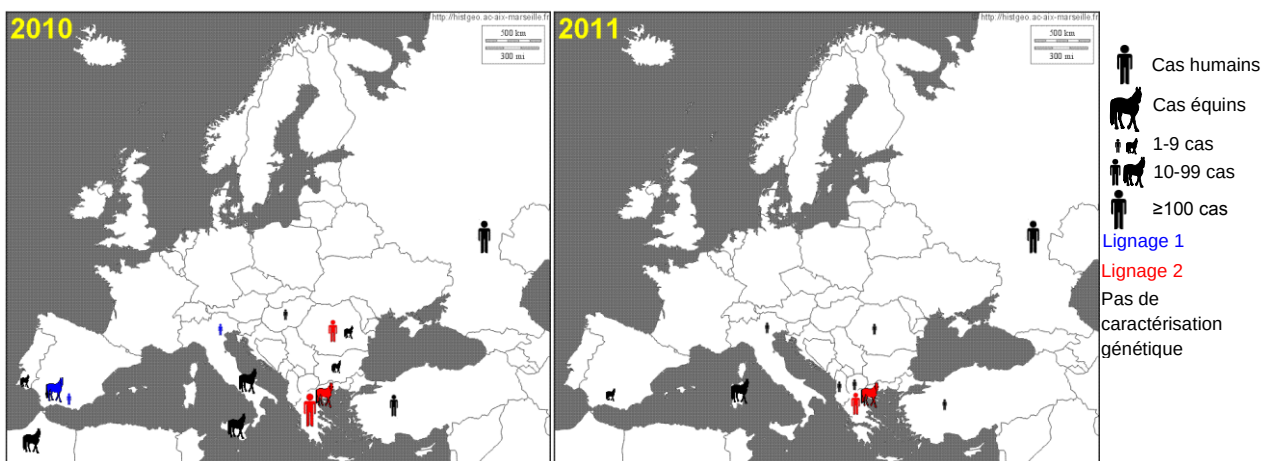
De même, en Europe, la situation n'a rien de comparable avec la spectaculaire épidémie/épizootie nord-américaine. Même en considérant les deux importants foyers urbains de Roumanie et de Russie à la fin des années 1990, moins de 100 décès associés à une infection à VWN chez l'homme et environ 200 cas équins avaient été enregistrés début 2010. De plus, les foyers de transmission apparaissent limités dans le temps et dans l'espace.

Il est cependant à noter que sur ces quatre dernières années, la circulation du VWN s'est intensifiée en Europe avec des cas cliniques humains et/ou équins dans trois pays en 2008 et 2009, dans neuf en 2010 et dans huit en 2011 (carte 2). La flambée la plus spectaculaire a eu lieu en 2010 (Pradier *et al.* 2012), avec au bilan 261 cas humains confirmés en Grèce dont 34 décès, 57 cas en Roumanie et cinq décès et 480 cas en Russie et six décès.

Une surveillance accrue, consécutive à l'amélioration et l'harmonisation des systèmes de surveillance et des outils diagnostiques dans les différents pays européens, peut expliquer, en partie, l'augmentation de la notification des cas d'infections par le VWN. Cependant, d'autres facteurs semblent favoriser cette activité exceptionnelle du VWN, en particulier les conditions climatiques de l'été 2010, associant des pluies abondantes et des températures élevées, propices à la multiplication des moustiques vecteurs du genre *Culex*.

La situation épidémiologique des pays européens au regard du risque d'infection par le VWN devra être suivie précisément dans le futur. Une caractérisation génétique fine du virus à l'origine des foyers devra être menée. En particulier en Hongrie et en Grèce où un virus du lignage 2, inhabituel en Europe et contre lequel la faune européenne est probablement naïve, s'est installé et a été responsable de cas équins et humains depuis 2008 en Hongrie (plus de 18 cas de méningo-encéphalite chez le cheval et 14 chez l'Homme en 2008) (Kutasi *et al.*, 2011 (Annexe)) et depuis 2010 en Grèce. La transmission de ce virus de lignage 2 est en outre associée à une mortalité importante de rapaces en Hongrie, les autours de palombe (*Accipiter gentilis*) en particulier (Erdelyi *et al.* 2007), alors que la mortalité d'oiseaux sauvages des suites d'une infection par le VWN est un phénomène rare en Europe (Zeller et Schuffenecker, 2004).

L'augmentation de la pathogénicité de ce virus du lignage 2, déjà décrite en 2008, est donc à nouveau d'actualité. Une analyse nucléotidique intéressant l'ensemble du génome viral a été conduite pour tenter d'expliquer cette virulence accrue. L'augmentation de virulence pourrait provenir d'une mutation génétique ayant entraîné la modification d'un acide aminé dans NS3 (Papa *et al.* 2011).



Carte 2: Flambée de cas cliniques d'infection par le virus West Nile en Europe en 2010 et 2011 (d'après Lecollinet *et al.*, 2012). La distribution géographique et l'ampleur des épizooties équines ou des foyers humains sont indiqués pour les pays européens touchés [Sources : ECDC au 6 octobre 2011 et OIE au 10 octobre 2011]. En 2010, plus de la moitié des foyers européens n'ont pas pu faire l'objet d'une caractérisation génétique du virus (foyers représentés en noir).

Les facteurs à l'origine des situations épidémiologiques radicalement différentes entre les Etats-Unis et l'Europe ou l'Amérique centrale et du Sud sont encore mal connus. Des différences de virulence dans les souches circulantes du VWN ont été avancées. En particulier, les souches comportant un résidu proline au niveau d'un acide aminé critique de NS3 (NS3-249) pourraient être associées à une virulence accrue pour les oiseaux, comme les souches nord-américaines ou la souche grèque de lignage 2 (Brault *et al.*, 2007) ; cependant, la plupart des isolats sud-américains sont très proches des isolats nord-américains et ne semblent pas présenter un phénotype atténué à l'exception d'un isolat au Mexique (Beasley *et al.*, 2004).

La présence de flavivirus proches du VWN peut conférer une immunité croisée protectrice contre une infection ultérieure par le virus WN : un grand nombre de flavivirus, comme les virus de l'encéphalite de Saint-Louis, de la Dengue, Ilheus, Bussuquara, Rocio, Cacipacore et Iguape circulent en Amérique du Sud, mais leur prévalence est généralement trop faible pour expliquer une différence si marquée sur le continent américain. Le virus de la Dengue, plus courant, n'expliquerait pas l'absence de symptômes cliniques chez les chevaux et les oiseaux, puisqu'il ne se multiplie pas chez ces hôtes vertébrés (Blitvich, 2008). De même en Europe, des flavivirus autres que West Nile circulent. En Europe centrale, le virus de l'encéphalite à tiques est endémique (Bakonyi *et al.*, 2008), causant de nombreuses infections chez l'homme chaque année (Charrel *et al.*, 2004). Récemment un virus proche du VWN, USUV, rencontré en Afrique et jusqu'à présent sans caractère pathogène identifié, a été isolé en Autriche en 2001 (Bakonyi *et al.*, 2008). Il a été à l'origine d'une épizootie chez certaines espèces d'oiseaux dont des Corvidés (Chvala *et al.*, 2004 ; Weissenböck *et al.*, 2003 ; Weissenböck *et al.*, 2002) et a depuis été également identifié en Hongrie, en Suisse, en Italie, en Allemagne et en Espagne (Bakonyi *et al.*, 2007 ; Busquets *et al.*, 2008 ; Manarolla *et al.*, 2010 ; Steinmetz *et al.*, 2007). La prévalence de ces infections chez les hôtes réservoirs du virus West Nile est certainement très faible à l'heure actuelle. L'explication la plus probable repose donc sur des différences dans l'écologie complexe du VWN, en termes de nature, d'abondance et de susceptibilité/compétence de l'avifaune et des vecteurs, entre l'Europe, l'Amérique du Nord et du Sud.

Il n'existe pas à ce jour de vaccins pour l'homme, en revanche il existe quatre types de vaccins équins : (i) un vaccin basé sur une souche inactivée (DUVAXIN ND WNV, Fort Dodge) (ii) un vaccin basé sur une chimère avec un squelette Fièvre Jaune souche 17D (PreveNile ND, Intervet) (iii) un vaccin chimère canarypox (Recombitek ND equine WNV vaccine, Merial) (<http://www.aaep.org/wnv.htm>) (iv) un vaccin ADN adjuvé (West Nile Innovator DNA ND, Fort Dodge).

5- **Phylogénie**

Les études phylogénétiques portant sur les alignements de la région génomique allant des nucléotides 1402 à 1656 (255 bp) du gène de l'enveloppe E (Zeller et Scuffenecker, 2004) d'isolats de différentes régions géographiques, ont montré l'existence de deux lignages majeurs divergeant de 25 à 30% en nucléotides (Berthet *et al.*, 1997 ; Lanciotti *et al.*, 2002) et de plusieurs sous-types ou clusters (Lanciotti *et al.*, 1999 ; Berthet *et al.*, 1997 ; Charrel *et al.*, 2003 ; Savage *et al.*, 1999 ; Scherret *et al.*, 2001) (figure 23).

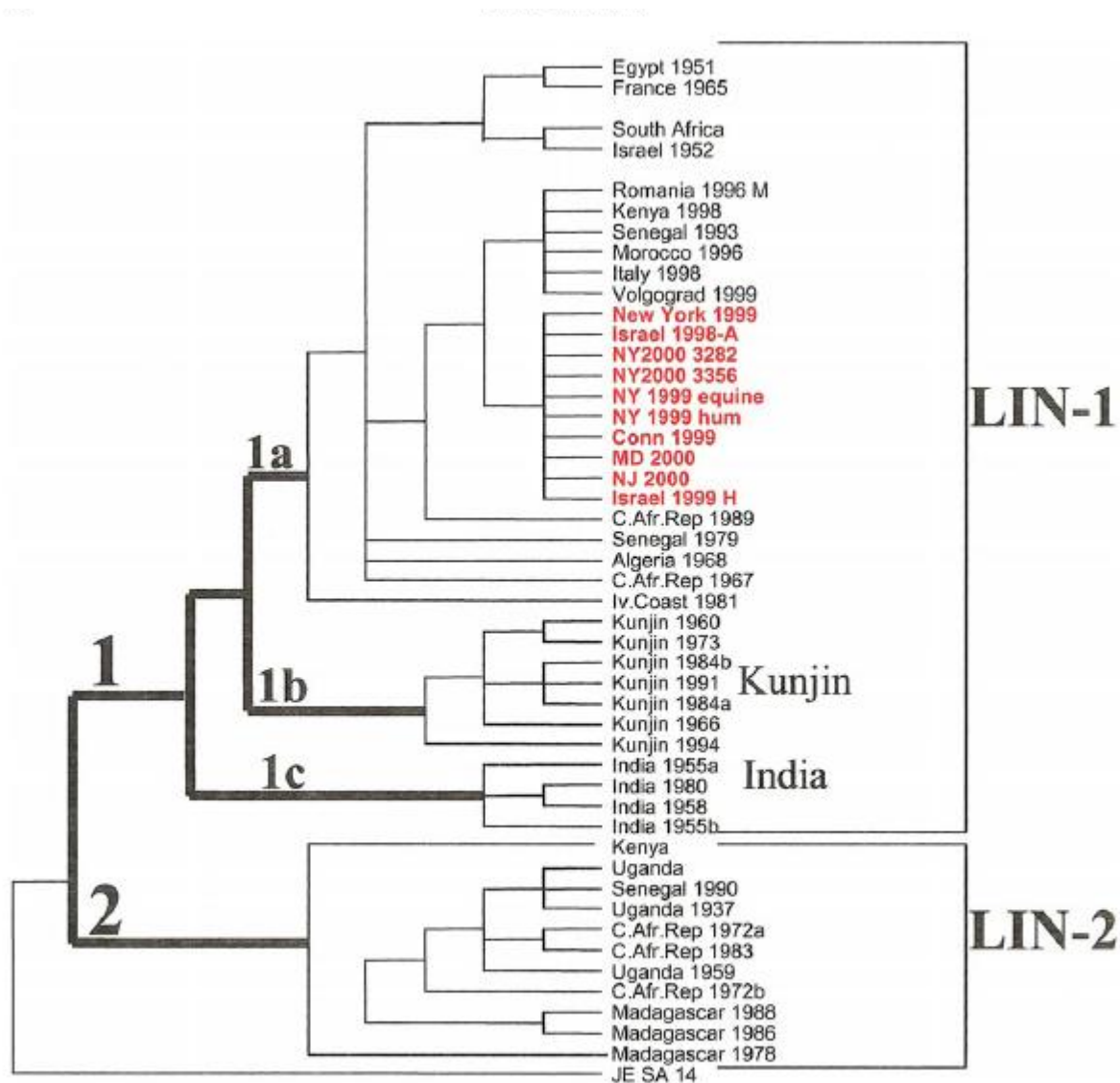


Figure 23: **Arbre phylogénétique** généré par analyse de 47 souches de VWN et une souche d'encéphalite japonaise (utilisée comme groupe externe), selon la méthode PAUP (d'après Lanciotti *et al.*, 2002). L'arbre a été construit en comparant une région de 255 bp du gène de l'enveloppe (position 1402-1656 sur le génome). Les lignes grasses délimitent les lignages 1 (LIN-1) et 2 (LIN-2) et les sous-types (1a, 1b et 1c, depuis Bondre *et al.* (2007), le sous-type 1c a été classé en lignage 5). Le groupe Amérique/Israël est représenté en rouge. La longueur des lignes horizontales ne sont pas proportionnelles à la distance génétique.

Le lignage 1 est composé de souches ayant une distribution géographique large, allant de l'Afrique de l'Ouest au Moyen-Orient, l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Australie (Monini *et al.*, 2010). Le lignage 1 peut être divisé en 3 sous-types (May *et al.*, 2011). Le sous-type 1a est constitué par des souches d'Europe, du Moyen-Orient, d'Asie, d'Afrique et d'Amérique (Monini *et al.*, 2010) et présentent différents clusters, au nombre de 6 (May *et al.*, 2011) (figure 24) dont : (i) les souches américaines et israéliennes isolées entre 1997 et 2000 (cluster 4), (ii) les souches isolées en Europe et en Russie entre 1996 et 2000 (Roumanie/1996-1997, Russie 1999 et 2000) (cluster 2, sous-type européen de l'Est) (Charrel *et al.*, 2003), (iii) les deux souches Italie 1998 et 2008, France 2000 (cluster 2, sous-type méditerranéen) (Monaco *et al.*, 2010).

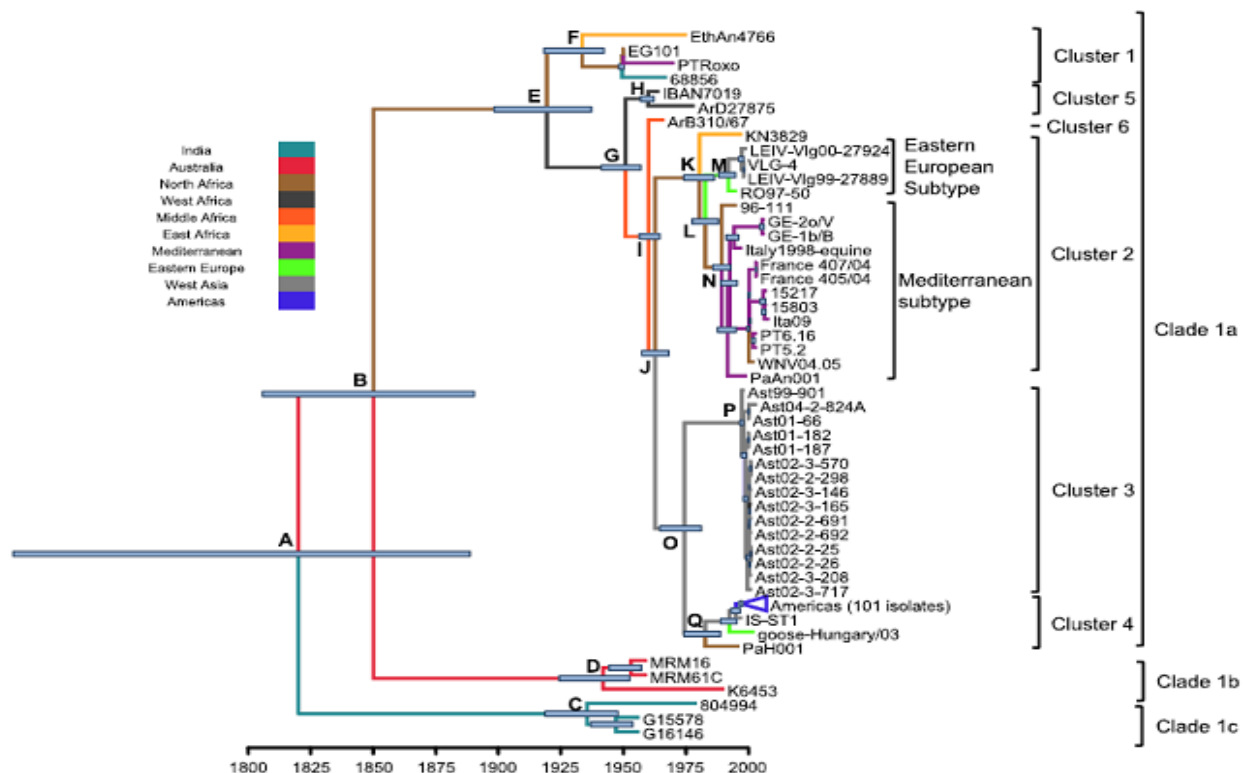


Figure 24: **Arbre phylogénétique du lignage 1** (d'après May *et al.*, 2011). Les couleurs indiquent l'origine géographique. La longueur des branches correspond au temps, comme indiqué sur l'échelle. **India** : Inde, **Australia** : Australie, **North Africa** : Afrique du Nord, **West Africa** : Afrique de l'Ouest, **East Africa** : Afrique de l'Est, **Mediterranean** : Méditerranée, **Eastern Europe** : Europe de l'Est, **West Asia** : Asie occidentale, **Americas** : Amériques du Nord et du Sud, **Eastern European Subtype** : sous-type Europe de l'Est, **Mediterranean subtype** : sous-type méditerranéen, **Cluster** : groupe.

Le sous-type 1b comprend les souches australiennes hautement homologues, à savoir plusieurs souches Kunjin, isolées de 1960 à 1994 (Scherret *et al.*, 2001 ; Zeller et Schuffenecker, 2004). La souche Kunjin peut être distinguée des autres souches du lignage 1 à l'aide d'anticorps monoclonaux et des analyses de neutralisation virale (Lanciotti *et al.*, 1999 ; Savage *et al.*, 1999).

Le sous-type 1c comprend les isolats collectés en Inde entre 1955 et 1980 (Lanciotti *et al.*, 2002) (depuis Bondre *et al.* (2007) le sous-type 1c a été classé en lignage 5).

Les souches nord américaines et israéliennes sont très proches, partageant 99,7% d'homologie nucléotidique, et elles appartiennent au même cluster au sein du sous-type 1a (Monini *et al.*, 2010). Ce fort degré d'identité de séquence suggère que la souche américaine serait originaire du Moyen-Orient (Lanciotti *et al.*, 1999). Cependant, des études portant sur l'évolution des souches de lignage 1 (May *et al.*, 2011), tendent à montrer que la souche israélienne n'est pas la souche mère de la souche new-yorkaise. En effet, l'isolat israélien diverge du pro-géniteur de la souche nord américaine un certain nombre d'année avant son isolement, et comme l'isolat israélien a acquis 8 substitutions d'acides aminés depuis la divergence, il est probable que la flambée épidémique israélienne ne soit pas à l'origine de l'épidémie américaine, mais plutôt que les deux épidémies ont été engendrées par l'introduction de souches indépendantes, d'origine inconnue, probablement d'Afrique.

Le lignage 2 comprend la souche prototype africaine B956, et d'autres isolats d'Afrique subsaharienne et de Madagascar (Lanciotti *et al.*, 1999 ; Berthet *et al.*, 1997 ; Savage *et al.*, 1999). Jusqu'en 2004, les souches de lignage 2 étaient limitées au continent africain et réputées moins pathogènes pour l'Homme contrairement aux souches de lignage 1. Or, en 2004, une épidémie due à une souche de lignage 2 et responsable de mortalités aviaires a éclaté en Hongrie (Erdelyi *et al.*, 2007).

Depuis des souches de lignage 2 ont été isolées en Grèce en 2010 et 2011, avec des cas de mortalités humaines (Papa *et al.*, 2010), mais aussi en Roumanie et en Russie (Sirbu *et al.*, 2011 ; Platonov *et al.*, 2011) .

Récemment, d'autres lignages ont été proposés pour des virus présentant des différences génétiques avec les lignages 1 et 2 (Bondre *et al.*, 2007) (figure 25) : le lignage 3 comprend une souche (Rabensburg) isolée en Europe centrale (République Tchèque) et le lignage 4 une souche russe (Leiv) (Bakonyi *et al.*, 2005). Le lignage 5 comprend des souches isolées en Inde (Bondre *et al.*, 2007).

Un isolat particulier de Kunjin (souche Sarawak) et le virus africain Koutango (Sénégal), appartiennent à des lignages distincts de West Nile, les lignages 6 et 7 respectivement (Hall *et al.*, 2001). Enfin, des séquences de VWN isolées de moustiques *Culex pipiens* au sud de l'Espagne pourraient correspondre à une souche constituant le lignage 8 (Vazquez *et al.*, 2010 ; Papa *et al.*, 2011).

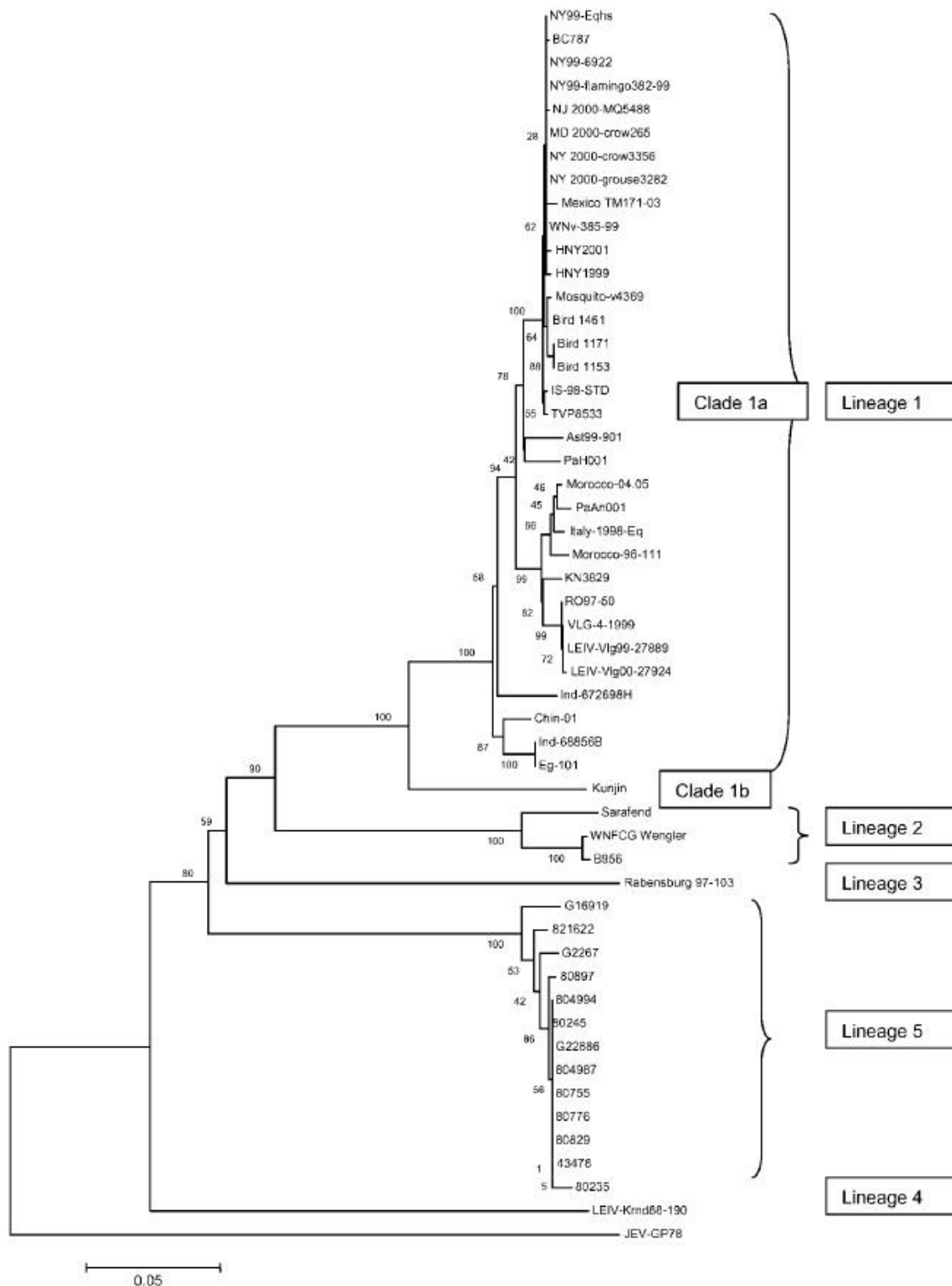


Figure 25: **Arbre phylogénétique des lignages 1 à 5** (d'après Bondre *et al.*, 2007). Arbre phylogénétique basé sur l'alignement d'un fragment de 921 nucléotides dans la région C-prM-E. Le JEV (Virus Encéphalite Japonaise) est utilisé comme groupe externe. Les références GenBank des séquences génomiques complètes incluses dans l'analyse phylogénétique sont : WNFCG Wengler (humain, Ouganda, 1937; M12294), B956 (humain, Ouganda, 1937; AY532665), Eg-101 (humain, Egypte, 1951; AF260968), RO97-50 (*Culex pipiens*, Roumanie, 1996; AF260969), Morocco-96-111 (équin, Maroc, 1996; AY701412), Rabensburg isolate 97-103 (*Culex pipiens*, République Tchèque, 1997; AY765264), IS-98-STD (cigogne, Israël, 1998; AF481864), Italy-1998-Eq (équin, Italie, 1998; AF404757), LEIV-Krnd88-190 (*Dermacentor marginatus*, Russie, 1998; AY277251), KN3829 (*Culex univittatus*, Kenya, 1998; AY262283), NY99-Eqhs (équin, New York, 1999; AF260967), NY99-6922 (AB185915), VLG-4-1999 (humain, Russie, 1999; AF317203), HNY1999 (humain, New York, 1999; AF202541), NY99-flamingo382-99 (flamand, New York, 1999; AF196835), Ast99-901 (humain, Russie, 1999; AY278441), LEIV-Vlg99-27889 (humain, Russie, 1999; AY277252), WNv-385-99 (harfang des neiges, USA, 1999; AY842931), NY 2000-crow3356 (corbeau, New York, 2000; AF404756), NY 2000-grouse3282 (gélinoite huppée, New York, 2000; AF404755), NJ 2000-MQ5488 (*Culex pipiens*, New Jersey, 2000; AF404754), MD 2000-crow265 (corbeau, Maryland, 2000; AF404753), LEIV-Vlg00-27924 (humain, Russie, 2000; AY278442), HNY2001 (humain, New York, 2001; AF533540), TVP8533 (humain, Texas, 2002; AY289214), Morocco-04.05 (équin, Maroc, 2003; AY701413), Sarafend (Israël; AY688948), Mexico TM171-03 (Mexique; AY660002), BC787 (AB185917), Mosquito-v4369 (*Culex quinquefasciatus*, USA; AY712948), Bird 1461 (USA; AY712947), Bird 1171 (geai bleu, USA ; AY712946), Bird 1153 (tourterelle triste, USA; AY712945), Chin-01 (Chine; AY490240), PaH001 (France; AY268133), PaAn001 (cheval, France, 2000; AY268132), Kunjin (souche MRM61C, *Culex annulirostris*, MRM Australie, 1980; D00246), JEV-GP78 (Inde; AF075723).

Les différents lignages ne sont pas corrélés avec une distribution géographique du virus, montrant ainsi l'importance des oiseaux migrateurs dans la dispersion du virus (Monini *et al.*, 2010). De plus, les analyses phylogénétiques sont intéressantes en termes d'épidémiologie pour tracer la dispersion géographique des souches, mais elles ne permettent pas d'expliquer les différences en termes de pathogénicité chez la souris (Zeller et Schuffenecker, 2004).

En conclusion : le VWN présente une grande diversité à la fois au niveau génétique que de sa distribution géographique. Les différentes souches identifiées à ce jour peuvent être classées en divers groupes, allant du lignage au cluster. Le continent africain semble être la source des différentes souches introduites par la suite dans les autres régions du globe (May *et al.*, 2011).

Beaucoup des clusters ont comme source une souche africaine (par exemple le cluster 2 (figure 24) a une souche nord-africaine comme source) (Holmes, 2008). L'isolement géographique des virus indiens et australiens représente un exemple de forte subdivision spatiale. Dans ces régions, le VWN a évolué de façon distincte des autres groupes depuis son introduction à partir de la source africaine (May *et al.*, 2011). Une surveillance soutenue de l'évolution des souches africaines apparaît comme importante pour comprendre l'épidémiologie du VWN dans ce qui semble être « le berceau » de l'évolution du VWN, en particulier puisque ce virus a pris et prend encore de l'importance dans les régions peuplées d'Amérique du Nord et d'Europe.

Chapitre 2 – Les outils de génétique inverse

Les souches circulant en Europe diffèrent dans leur capacité à induire des maladies sévères, avec symptômes neurologiques, chez différents hôtes. Comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces différences de virulence permettra aux autorités sanitaires de mieux contrôler les infections à VWN en Europe. De plus, de nouveaux outils de diagnostic aussi bien que de nouvelles stratégies de traitement pour les personnes infectées, pourront être mis en place.

L'étude des déterminants moléculaires de la virulence s'appuie sur des outils moléculaires, comme un clone infectieux ou un réplicon, permettant de maîtriser les conditions de modification du génome viral. Le clone infectieux et le réplicon, sont deux outils de génétique inverse qui ont été utilisés à de nombreuses reprises dans le cadre de la détermination des facteurs de virulence du VWN. Le clone infectieux est principalement utilisé pour des études *in vivo*, le réplicon d'avantage pour le criblage d'antiviraux.

1- Le réplicon

Le réplicon est un outil génétique non infectieux codant pour les protéines non structurales d'un virus. Les séquences non codantes en 5' et en 3', essentielles pour la réplication (voir paragraphe 1-3-3) sont conservées. Un gène rapporteur est inséré dans le cadre de lecture afin de pouvoir suivre la réplication. Cet outil permet d'étudier le comportement d'un virus au sein d'une cellule en évitant l'influence des protéines structurales et la réalisation d'un cycle infectieux complet. Une caractéristique importante de ces systèmes est leur capacité à se répliquer (Varnavski *et al.*, 2000). Les ARN peuvent être transfectés directement dans les cellules cibles (Johannig *et al.*, 1995 ; Ying *et al.*, 1999) ou introduits par infection avec des VLPs (Virus Like Particles) contenant les ARN encapsidés (Bredenbeek *et al.*, 1993 ; Caley *et al.*, 1997 ; Liljestrom *et al.*, 1991 ; Pushko *et al.*, 1997).

Les ARN peuvent aussi être transcrits à partir du plasmide transfecté en s'appuyant sur la machinerie cellulaire de transcription par l'ARN polymérase II (Agapov *et al.*, 1998 ; Berglung *et al.*, 1998 ; DiCiommo *et al.*, 1998 ; Dubensky *et al.*, 1996).

La découverte de drogues anti-flavivirus nécessite le développement d'essais biologiques fiables (Puig-Basagoiti *et al.*, 2005). Traditionnellement, les essais biologiques sont basés sur l'infection de cellules, puis le suivi de l'effet de la drogue testée sur la réplication virale par observation de l'effet cytopathique, la quantification des charges virales par PCR en temps réel ou par titrage (Jordan *et al.*, 2000 ; Morrey *et al.*, 2002). Ces méthodes sont cependant peu adaptées au criblage d'antiviraux à haut débit. Le développement d'outils de génétique inverse comme le réplicon a facilité le criblage des drogues. En effet, en clonant un gène rapporteur comme le gène de la luciférase sur un réplicon en lieu et place des protéines structurales, la transfection de cellules résulte dans l'expression de la luciférase (Puig-Basagoiti *et al.*, 2005). L'intensité du signal lumineux émis après ajout du substrat de la luciférase est mesurée et permet de suivre le niveau de réplication virale (Shi, 2003). Alternativement, les protéines structurales peuvent être amenées en *trans* pour produire des particules de type VLP, contenant l'ARN transcrit à partir du réplicon et codant la luciférase. Ce type de particules permet de suivre l'effet de drogues sur les étapes précoces de l'infection de cellules cibles (entrée virale, expression des protéines virales, réplication...).

Des réplicons de flavivirus ont été construits pour: le virus de l'encéphalite à tiques (Gehrke *et al.*, 2005), le virus de la fièvre jaune (Jones *et al.*, 2005b ; Corver *et al.*, 2003 ; Molenkamp *et al.*, 2003), le virus de la Dengue (Pang *et al.*, 2001, Alvarez *et al.*, 2005 ; Holden *et al.*, 2006 ; Puig-Basagoiti *et al.*, 2006), le virus West Nile souche Kunjin (Khromykh et Westaway, 1997, Evans et Seeger, 2007), le virus West Nile souche NY99 (Shi *et al.*, 2002b, Rossi *et al.*, 2005), le virus West Nile NY2000 souche 3356 (Puig-Basagoiti *et al.*, 2005 ; Deas *et al.*, 2005). Des VLPs ont aussi été développées pour les flavivirus suivants : le virus de l'encéphalite à tiques (Gehrke *et al.*, 2003), le virus de la fièvre jaune (Jones *et al.*, 2005b), le virus West Nile souche Kunjin (Harvey *et al.*, 2004 ; Khromykh *et al.*, 1998), le virus West Nile souche Texas 2002 (Scholle *et al.*, 2004).

Lorsque le réplicon n'est pas cytotoxique, des lignées cellulaires exprimant des réplicons peuvent être créées, notamment en sélectionnant les cellules avec un antibiotique, comme la néomycine (Puig-Basagoiti *et al.*, 2005, Rossi *et al.*, 2007) dont le gène est codé dans le plasmide du réplicon. Ces lignées cellulaires servent pour des études de complémentation pour la polymérase (Khromykh *et al.*, 1999), des études sur l'assemblage des virions (Khromykh *et al.*, 1998 ; Puig-Basagoiti *et al.*, 2005), et le criblage d'anti-viraux (Lo *et al.*, 2003 ; Puig-Basagoiti *et al.*, 2006).

Ainsi, des réplicons ont été utilisés pour le criblage de composés antiviraux comme l'acide mycophénolique, la ribavirine et la glycyrrhizine (Puig-Basagoiti *et al.*, 2005). Il a aussi été démontré que les PMOs (**P**hosphoro-diamidate **M**orpholino **O**ligomers) suppriment la traduction et la réplication des ARN viraux (Deas *et al.*, 2005).

Cet outil génétique a permis d'étudier les interactions entre les protéines virales non structurales et la voie interféron (Rossi *et al.*, 2005, Ma *et al.*, 2009). La possibilité d'effectuer des mutations a permis d'étudier les déterminants moléculaires impliqués dans les interactions du VWN avec les éléments de la voie interféron. Ainsi, Liu *et al.* (2006) ont montré que la substitution d'un acide aminé sur NS2A réduisait la capacité du virus à inhiber l'induction de la synthèse d'interféron α/β . L'utilisation des réplicons du virus West Nile souches NY99 et Kunjin a permis de démontrer que l'inhibition de la voie interféron par les protéines non structurales est due au blocage de l'activation de STAT1 et STAT2 (Liu *et al.*, 2005).

La génétique inverse par des réplicons a aussi permis de mettre en évidence le rôle de NS4B dans la réplication (Puig-Basagoiti *et al.*, 2007).

Evans et Seeger (2007) ont montré que des mutations dans NS4B influent sur la réplication virale et l'inhibition de la voie interféron, mais cette influence disparaît dans le cas où un clone infectieux est utilisé, suggérant que les protéines structurales ont un rôle déterminant dans l'interaction avec les protéines de la voie interféron. L'adaptation forcée du réplicon de la souche NY99 dans une lignée cellulaire en l'absence de mort cellulaire induit des mutations dans les gènes codant pour NS2A, NS3, NS4B et NS5 (Rossi *et al.*, 2005).

Ces changements génomiques engendrent une baisse de la réplication, une diminution de l'accumulation d'antigène, une diminution de l'effet cytopathique, et une augmentation de la capacité à persister en culture cellulaire. Ces mêmes mutations répercutées sur un clone infectieux débouchent sur un virus atténué *in vivo*.

2- Le clone infectieux

Le génome des flavivirus est composé d'un ARN simple brin de polarité positive. Ainsi dans le cas des flavivirus, les clones infectieux sont des outils moléculaires constitués d'une copie ADN du génome viral entier obtenue à partir des ADN complémentaires (ADNc) produits suite à une reverse transcription à partir des ARN viraux. Ils permettent l'obtention de particules virales en cellules de mammifères suite à une transfection *in vitro*, soit directement de la construction clone infectieux dans le cas d'un plasmide comportant un promoteur eucaryote, soit d'ARN génomiques synthétisés *in vitro* si un promoteur pour une ARN polymérase est utilisé. Des chimères peuvent être construites ou des mutations ponctuelles peuvent être apportées au génome viral, permettant ainsi d'identifier les déterminants moléculaires de la virulence.

Une difficulté fréquemment rencontrée dans la construction des clones infectieux de flavivirus est leur instabilité en système bactérien (Shi *et al.*, 2002). Shi *et al.*, (2002) ont observé que la région 5' du génome est la plus instable et que cette région doit être insérée dans le clone en dernier. Cette observation est cohérente avec ce qui avait été observé précédemment concernant l'instabilité des régions structurales lors des étapes de clonage (Yamshchikov *et al.*, 2001 a et b). Afin d'éviter les mutations, une température d'incubation des bactéries à température ambiante plutôt qu'à 37°C est conseillée. Cette démarche a été suivie pour la construction d'un clone infectieux du virus de la Dengue souche DENV2 (Sriburi *et al.*, 2001) et pour un clone infectieux du VWN souche NY2000 (Shi *et al.*, 2002).

- (1) Pour contrer ces difficultés différentes approches ont été abordées : Le génome complet peut être assemblé *in vitro* par ligation des fragments d'ADNc. Cette approche permet d'éviter le clonage et les étapes de propagation en système bactérien. Cette stratégie a été fructueuse pour générer des clones infectieux des virus de la Fièvre Jaune (Rice *et al.*, 1989), de l'Encéphalite Japonaise (Sumiyoshi *et al.*, 1992), de la Dengue sérotype 2 (DENV2) (Kapoor *et al.*, 1995), et de la souche Hypr du virus de l'encéphalite à Tiques (Mandl *et al.*, 1997) mais aussi plus récemment pour la souche NY99 du VWN (Audsley *et al.*, 2011). La limite de cette approche est l'obtention d'une population d'ARN hétérogène due aux erreurs de la polymérase ou des quasi-espèces présentes dans le stock viral initial.
- (2) Un ADNc complet auquel un promoteur a été inséré en 5' et obtenu à partir d'une RT-PCR intéressant le génome viral entier (PCR long fragment) peut servir à une transcription directement sans passer par une étape de clonage. C'est ce qui a été fait pour générer des ARN infectieux de virus de l'encéphalite à Tiques (Gritsun *et al.*, 1995). La limite de cette approche est l'obtention d'une population d'ARN hétérogène due aux erreurs de la polymérase ou des quasi-espèces présentes dans le stock viral initial.
- (3) La recombinaison d'un ADNc complet avec un ADN de levure a permis l'obtention d'un clone infectieux du virus DENV2 (Polo *et al.*, 1997).
- (4) Les ADNc complets peuvent être clonés sous le contrôle d'un promoteur eucaryote ne permettant pas l'expression des gènes viraux dans la bactérie, et/ou des introns peuvent être insérés dans les régions problématiques pour la stabilité des fragments d'ADNc lors de leur propagation en bactérie. Cette approche nécessite la transfection de la construction complète d'ADNc dans des cellules eucaryotes. Cette stratégie a été utilisée pour obtenir des virus recombinants du VWN souches NY99 et Kunjin respectivement (Borisevich *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003), mais aussi pour un clone infectieux du virus de l'encéphalite japonaise (Yamshchikov *et al.*, 2001b).

- (5) D'autres clones infectieux ont été obtenus en utilisant des vecteurs à faible nombre de copies et des bactéries sélectives, comme pour le virus DENV4 (Lai *et al.*, 1991), le virus de l'encéphalite à Tiques souche Neudoerfl (Mandl *et al.*, 1997), et souche Langat (Li *et al.*, 2001), pour Kunjin (Khromykh *et al.*, 1994), pour une souche de lignage 2 du VWN (Yamshchikov *et al.*, 2001), et pour une souche de lignage 1 (Shi *et al.*, 2002).

Parmi les clones infectieux construits, certains se sont révélés porteurs de mutations. Kinney *et al.* (2006) ont observé la présence d'une mutation C3342A aboutissant à l'apparition d'un codon stop en position 291 dans NS1. De façon surprenante, des virus recombinants révertants A3342T, A3342C, A3342C/T et A3342T/C ont été obtenus. Liu *et al.* (2003) a aussi observé ce phénomène de réversion vers la séquence sauvage sur des plasmides clone infectieux de la souche Kunjin. Ces mutations étaient situées dans les séquences de NS2A et NS3. D'autres mutations ont été constatées sur ces plasmides, 13 dont 7 non silencieuses pour un des clones, et 17 dont 11 non silencieuses pour l'autre clone, dans les cadres de lecture de prM, E, NS1, NS2A, NS3 et NS4B. Le clone infectieux souche NY2000 de Shi *et al.* (2002) possédait lui aussi de nombreuses mutations (11), dont 10 se sont révélées silencieuses. Une seule mutation non silencieuse V→A est présente dans NS5. 6 des mutations sont situées dans NS5, les autres étant dans NS2A ou NS2B.

Des clones infectieux du VWN lignage 2, souche Africaine B956 (Yamshchikov *et al.*, 2001), du lignage 1, souche américaine NY99 (Kinney *et al.*, 2006; Beasley *et al.*, 2005; Audsley *et al.*, 2011; Schlick *et al.*, 2009; Borisevich *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2002) et souche australienne Kunjin (Liu *et al.*, 2003; Khromykh et Westaway, 1994) ont été construits et utilisés pour déchiffrer le rôle des protéines virales dans la virulence, la neuro-invasion et l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte en travaillant sur l'impact de mutations ponctuelles ou de chimères, voir tableau 1.

Mutation/Chimère	Gène	Clone Infectieux	Conclusion	Modèle	Auteur
Mutations/délétions multiples	Région 3' non codante, sur les boucles	B956	Altération de l'interaction de la région 3'NC avec les protéines cellulaires TIA-1 et TIAR, affectant la réplication de l'ARN viral	Culture cellulaire	Emara <i>et al.</i> , 2008
Mutations successives de chacun des 7 nucléotides	séquence 5' ACAGUGC 3' au sein de la région 3' non codante	B956	Stabilité des structures secondaires nécessaire pour les interactions avec l'ARN et les protéines virales	Culture cellulaire	Elghonemy <i>et al.</i> , 2005
Mutations multiples	Région 3' non codante	B956	Baisse de la virulence	Souris	Yu <i>et al.</i> , 2008
Délétions	C, délétion de fragments plus ou moins longs dans sa région hydrophobe	NY99	Région hydrophobe indispensable à l'assemblage des virions	Culture cellulaire	Schlick <i>et al.</i> , 2009
Mutations	E	B956	Atténuation de la neurovirulence et des propriétés neuro-invasives	Souris	Yu <i>et al.</i> , 2008
Mutation	E _{N154S}	NY99	Perte de la glycosylation. Altération de la neuroinvasion	Souris	Beasley <i>et al.</i> , 2005
Mutations	E _{L107F} , et E _{L107F/A316V/K440R}	NY99	Atténuation de la neuro-invasion	Souris	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Mutations	E	NY99	Rôle de certains résidus (notamment Y329) dans la formation d'une boucle nécessaire pour la viabilité du virus et le repliement du domaine III, et donc influence sur l'antigénicité de E. Importance des résidus G331 et D333 dans l'infectivité du virus	Culture cellulaire et souris	Zhang <i>et al.</i> , 2010
Mutations	E _(154S) /NS1 _(130A/175A/207A)	NY99	Atténuation de la neuroinvasion Virémie non détectable	Souris	Whiteman <i>et al.</i> , 2010
Mutation	NS2A _{A30P}	Kunjin	Induit une augmentation de la réponse IFN Atténuation de la neuro-invasion et de la neuro-virulence	Cellules BHK Souris	Liu <i>et al.</i> , 2006
Mutations	NS2A _{R175K} et NS3 _{T518H}	Kunjin	Identification d'acides aminés clés dans le rôle de NS2A dans l'assemblage des particules virales et de NS3 dans la réplication de l'ARN	Culture cellulaire	Liu <i>et al.</i> , 2003

Mutation/Chimère	Gène	Clone Infectieux	Conclusion	Modèle	Auteur
Mutations obtenues sur virus amplifiés sur culture cellulaire exprimant la protéine OAS1B	NS3 _{S365G}	NY99	Altération du recrutement de l'ATP pour l'activité ATPase de NS3	Culture cellulaire exprimant la protéine OAS1b	Mertens <i>et al.</i> , 2010
	2K _{V9M}	NY99	Atténuation de l'activité anti-accumulation de l'ARN viral d'OAS1B Rétablissement de la multiplication virale		
Mutation	NS3 _{T249P}	NY99 et Kenya (KN-3829)	Atténuation de la virulence des virus NY99 et augmentation de la virulence des virus KN-3829	AMCR (Corbeaux Américains)	Brault <i>et al.</i> , 2007
Mutation	NS4B _{C102S}	NY99	Atténuation de la neuro-invasion et de la neuro-virulence	Souris	Wicker <i>et al.</i> , 2006
Mutation	NS4B _{E249G}	NY99	Plages de lyse plus petites, altération de la vitesse de réplication	Culture cellulaire	Puig-Basagoiti <i>et al.</i> , 2007
Mutations	Combinaison de mutations dans NS4B _(E249G) , NS5 _(A804V) et région 3' non codante _(A10596G, C10774U, A10799G)	NY99	altération du phénotype (petites plages de lyse, sensibilité à la température, et atténuation de la virulence chez la souris)	Culture cellulaire et souris	Davis <i>et al.</i> , 2007
Mutation	NS5 _{S653F}	Kunjin	Antagonisme de la voie de signalisation JAK/STAT de l'interféron	Culture cellulaire	Laurent-Rolle <i>et al.</i> , 2010
Mutations	Régions 5' et 3' non codante, nucléotides impliqués dans la cyclisation	B956	Diminution de l'efficacité de la réplication	Culture cellulaire	Basu et Brinton, 2011
Chimère	prM et E	Gènes ETH76a dans le clone infectieux NY99	Altération de la virulence	Souris	Beasley <i>et al.</i> , 2005

Mutation/Chimère	Gène	Clone Infectieux	Conclusion	Modèle	Auteur
Chimères	prM et E	Echanges de gènes NY99/ souches Mexico (TM171-03-ppp1)	Augmentation de la virulence de la souche mexicaine Atténuation de la virulence de la souche américaine	Corbeau américain, moineaux et roselin du Mexique Lignée de macrophages de poulet	Langevin <i>et al.</i> , 2011
Chimères	Protéines Structurales	Gènes NY99 dans le clone infectieux W956	Réplication virale Atténuation de la neuro-invasion Augmentation de l'immunogénicité	Cultures cellulaires Souris	Borisevich <i>et al.</i> , 2006
Chimères	Non Structurales	Gènes NY99 dans le clone infectieux W956	Effet cytopathique	Cultures cellulaires	Borisevich <i>et al.</i> , 2006
Chimère	NS et/ou les Régions Non Codantes	Gènes NY99 dans le clone infectieux Kunjin et NS2A Kunjin dans le clone infectieux NY99	Région 5' Non codante et NS (NS2A) sont des déterminants de la virulence	Souris	Audsley <i>et al.</i> , 2011
Chimères	Tous les Gènes et régions non codantes, individuellement	Gènes de la souche Wengler dans le clone infectieux souche Sarafend	Région 5' non codante a un rôle majeur dans la maturation des particules virales à la membrane plasmique	Culture cellulaire	Li <i>et al.</i> , 2005

Tableau 1: **Tableau récapitulatif des travaux effectués sur des clones infectieux du virus West Nile.**

Les travaux réalisés sur des clones infectieux ont ainsi permis de mettre en lumière le rôle des protéines virales dans la virulence du VWN, notamment l'importance de la glycosylation de la protéine structurale d'enveloppe, mais aussi des protéines non structurales, NS1 et NS4B, dans la neuro-invasion. D'autres déterminants majeurs de la virulence, comme le rôle des régions 3' et 5' NC, ainsi que NS3, dans la réplication, NS2A et NS5 dans l'évitement de la réponse interféron, ont aussi été mis en évidence grâce à l'utilisation de l'outil clone infectieux.

CADRE ET OBJECTIFS

CADRE ET OBJECTIFS

Ce travail a pour objectif de contribuer à la mise en évidence des déterminants moléculaires de la virulence des souches du virus West Nile circulant dans le bassin méditerranéen et d'établir de nouveaux modèles *in vivo* et/ou *in vitro* permettant d'évaluer la virulence de souches issues du terrain ou de virus recombinants.

Le virus West Nile est endémique en Afrique, en Asie, en Russie, en Inde et en Europe, mais aussi plus récemment en Amérique (Shi *et al.*, 2002a et b). Des études phylogénétiques ont permis d'identifier 8 lignages, dont le lignage 1 est le plus important (divisé en 2 sous groupes, 1a et 1b) (May *et al.*, 2011; Bondre *et al.*, 2007). Le lignage 1 est présent dans de nombreuses régions dont l'Afrique, l'Europe, le Moyen-Orient, la Russie, l'Inde et l'Amérique du Nord (Shi *et al.*, 2002a et b). Depuis le milieu des années 1990, des épidémies caractérisées par des proportions importantes de maladies neurologiques et de forts taux de mortalité ont éclaté en Europe de l'Est et dans le bassin méditerranéen, en Israël depuis 1998, ainsi que sur le continent nord-américain, en particulier aux Etats-Unis depuis 1999 (Beasley *et al.*, 2005 ; Shi *et al.*, 2002a et b). L'émergence du virus West Nile en Amérique du Nord est associée à un taux de mortalité élevé chez l'oiseau, un phénomène qui n'avait pas été rapporté précédemment (Beasley *et al.*, 2005). Les souches circulant en Europe appartiennent au sous-groupe 1a Europe du Sud/Kenya ou Israël/Amérique, ou au lignage 2 (Calistri *et al.*, 2010; Papa *et al.*, 2010).

Les études menées pour mettre en évidence les déterminants moléculaires de la virulence du virus West Nile utilisent principalement la souche NY99 (Beasley *et al.*, 2002; Botha *et al.*, 2008; Audsley *et al.*, 2011 ; Beasley *et al.*, 2005 ; Borisevich *et al.*, 2006 ; Mertens *et al.*, 2010; Wicker *et al.*, 2006 ; Brault *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Langevin *et al.*, 2011 ; Whiteman *et al.*, 2010 ; Schlick *et al.*, 2009 ; Davis *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2010 ; Laurent-Rolle *et al.*, 2010 ; Puig-Basagoiti *et al.*, 2007), la souche B956 (Borisevich *et al.*, 2006 ; Elghonemy *et al.*, 2005 ; Emara *et al.*, 2008 ; Basu et Brinton, 2011 ; Yu *et al.*, 2008) ou la souche Kunjin (Audsley *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2003 ; Laurent-Rolle *et al.*, 2010). En particulier, des clones infectieux dérivés de souches américaines (NY99), africaines (B956) et australiennes (Kunjin) ont été construits. Ces clones ont permis d'étudier des facteurs viraux impliqués dans la neuropathogénicité (Shi *et al.*, 2002a ; Beasley *et al.*, 2005 ; Yamshchikov *et al.*, 2001a ; Evans and Seeger, 2007 ; Liu *et al.*, 2005 ; Khromykh et Westaway, 1997). A ce jour, il n'y a pas de résultats d'études menées sur des souches issues d'Europe ou du bassin méditerranéen.

En 1998, une importante épidémie a éclatée en Israël. La souche IS-98-ST1 a été isolée d'une cigogne présentant des symptômes neurologiques sévères (Malkinson *et al.*, 2002). Cette souche est pathogène chez la souris et peut servir à l'étude des déterminants moléculaires de la virulence ainsi qu'à celle des facteurs dépendants de l'hôte impliqués dans la pathogénèse virale (Mashimo *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2004, Mertens *et al.*, 2010, Kajaste-Rudnitski *et al.*, 2006; Simon-Chazotte *et al.*, 2011).

Les travaux exposés dans ce mémoire traitent de la construction d'un clone infectieux dérivé de la souche IS-98-ST1, afin de pouvoir étudier les facteurs de virulence d'une souche issue du sous-groupe Européen appartenant au lignage 1, très présent en Europe. Le chapitre 3, relate les étapes de construction du clone infectieux et les étapes de validation des propriétés biologiques du virus recombinant *in vitro* et *in vivo*. Actuellement, les études de virulence sont réalisées en modèle murin pour le volet *in vivo*, et les lignées cellulaires Vero (Singe) ou BHK (Hamster) ou encore des neurones d'origine murine, pour le volet *in vitro*, mais peu sur les hôtes naturels du virus.

Il n'existe pas de modèle aviaire de laboratoire pour étudier la virulence du virus West Nile. Le modèle œuf embryonné de poulet est proposé et fera l'objet d'une première partie du chapitre 4. La deuxième partie du chapitre 4 porte sur un essai de comparaison de multiplication virale sur des cellules humaines embryonnaires neuronales, les cellules SK-N-SH.

PARTIE II :
CONSTRUCTION D'UN CLONE INFECTIEUX DE
LA SOUCHE IS-98-ST1 DU VIRUS WEST NILE ET
VALIDATION DE NOUVEAUX MODELES
D'EVALUATION DE LA VIRULENCE

Chapitre 3 : Construction d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 du virus West Nile et validation des propriétés biologiques des virions recombinants *in vitro* et *in vivo*

1- Introduction

Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée: "IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus" Bahuon *et al.* (2012).

Un système de génétique inverse est primordial pour l'étude des déterminants moléculaires de la neurovirulence et des propriétés neuroinvasives du virus West Nile. Les clones infectieux sont les outils les plus pertinents dans l'étude des déterminants moléculaires de la virulence dans le sens où cet outil permet de modifier le génome viral de manière maîtrisée et de mesurer l'impact de ces modifications sur l'ensemble du cycle viral.

Les clones infectieux de flavivirus sont très instables en système procaryote (Seregin *et al.*, 2006 ; Beasley *et al.*, 2005 ; Shi *et al.*, 2002a; Yamshchikov *et al.*, 2001a). Différentes stratégies ont été abordées par le passé (voir chapitre 2) (Shi *et al.*, 2002a). La stratégie que nous avons choisi a permis d'obtenir des clones infectieux de souches de VWN en système bactérien (Shi *et al.*, 2002a ; Yamshchikov *et al.*, 2001a; Liu *et al.*, 2003).

Les particules virales produites à partir des plasmides recombinants peuvent avoir des propriétés biologiques différentes des virus sauvages, si les transcrits recombinants n'ont pas une structure identique à celle des ARN viraux sauvages et si les populations de quasi-espèces diffèrent. Afin de valider l'infectiosité des virions recombinants, des étapes de validation *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires. Les propriétés répliquatives et lytiques ont été validées sur cellules Vero. La virulence des virions recombinants a été validée sur souris et sur un nouveau modèle, le modèle œuf embryonné de poulet.

2- Article soumis à Plos One le 14/06/2012 et acceptation avec corrections mineures le 14/08/12

Title: IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus

Standard Research Article

Bahuon Céline^{*1}, Desprès Philippe², Pardigon Nathalie², Panthier Jean-Jacques³, Cordonnier Nathalie⁴, Lowenski Steeve¹, Richardson Jennifer¹, Zientara Stéphan¹, Lecollinet Sylvie¹

1. UMR 1161 VIROLOGIE ANSES-INRA-ENVA, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 23 avenue du Général De Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France.
2. Unité des Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes, Department of Virology, Institut Pasteur, 75724 Paris, France.
3. Mouse functional Genetics, Institut Pasteur, 75724 Paris, France.
4. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

*Corresponding author: Céline Bahuon

Email: celine.bahuon@anses.fr

Telephone: 00 33 1 43 96 73 76

Fax number: 00 33 1 43 96 73 96

Funding: This study was funded by the French agency for food, environmental and occupational health and safety (ANSES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No external funding was received for this study.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Summary word count: 215

Number of figures: 9

Abstract:

Infectious clones of West Nile virus (WNV) have previously been generated and used to decipher the role of viral proteins in WNV virulence. The majority of molecular clones obtained to date have been derived from North American, Australian or African isolates. Here, we describe the construction of an infectious cDNA clone of a Mediterranean WNV strain, IS-98-ST1. We characterized the biological properties of the recovered recombinant virus in cell culture and in mice. The growth kinetics of recombinant and parental WNV were similar in Vero cells. Moreover, the phenotype of recombinant and parental WNV was indistinguishable as regards viremia, viral load in the brain and mortality in susceptible and resistant mice. Finally, the pathobiology of the infectious clone was examined in embryonated chicken eggs. The capacity of different WNV strains to replicate in embryonated chicken eggs closely paralleled their ability to replicate in mice, suggesting that inoculation of embryonated chicken eggs could provide a practical *in vivo* model for the study of WNV pathogenesis.

In conclusion, the IS-98-ST1 infectious clone will allow assessment of the impact of selected mutations and novel genomic changes appearing in emerging European strains pathogenicity and endemic or epidemic potential. This will be invaluable in the context of an increasing number of outbreaks and enhanced severity of infections in the Mediterranean basin and Eastern Europe.

Introduction

The zoonotic West Nile virus (WNV), which belongs to the *Flavivirus* genus (family *Flaviviridae*), circulates in natural transmission cycles involving avian hosts and ornithophilic mosquito *Culex* ssp, whereas horses and humans are regarded as dead-end hosts [1,2,3]. Arthropod-borne WNV can infect the central nervous system (CNS) of various host species and neurological disease is a grave, albeit infrequent, complication of WNV infection [4]. Once inside the CNS, WNV infects neurons and gives rise to severe immunopathology. Although asymptomatic in the majority of cases, WNV infection has been associated with severe meningo-encephalitis and acute flaccid paralysis in humans.

WNV contains a positive single-stranded RNA genome of about 11,000 nucleotides comprising a single open reading frame flanked by two untranslated regions (UTRs) at the 5' and 3' ends. Genomic RNA codes for a single and long polyprotein which is co- and post-translationally cleaved by cellular and viral proteases. There are three structural proteins (C, prM/M and E) followed by seven nonstructural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [5], along with NS1', which results from a -1 ribosomal frameshift event [6]. Structural proteins provide the structural elements of viral particles, while nonstructural proteins play a role in viral replication, virion assembly, and evasion of host antiviral immune responses [7, 8, 9, 10, 11].

WNV is maintained in endemic cycles in Africa, West Asia, Russia, India and Europe, and more recently in North America [3]. Phylogenetic analysis has permitted identification of lineages 1 (divided into clades 1a to 1b) to 5 [12, 13]. Lineage 1 WNV strains have been reported in many regions, including Africa, Europe, the Middle East, Russia, India, and North America since 1999 [3]. WNV subsequently spread to South America [14]. Since the mid-1990's, epidemics with a high incidence of neurological disease and death have occurred in Eastern Europe and the Mediterranean area, e.g. in Israel in 1998, and more regularly in North America since 1999 [1, 3]. WNV emergence in North America has also been associated with significant mortality in birds, a phenomenon that had not been previously reported [1].

WNV transmission in Europe involves strains that belong to the South Europe/Kenyan and the Israeli/American clusters of lineage 1a, or to lineage 2 [15, 16]. Lineage 1 has been involved in most of recent WNV epidemics in the world. However, analysis of molecular determinants of virus virulence has mainly concerned North American isolates with a particular focus on NY99 strains [17, 18]. In contrast,

few studies have been conducted to elucidate the virulence of WNV isolates from Europe/Middle East in common hosts such as horses and avian species [19].

During the 1998 epidemic in Israel, WNV strain IS-98-ST1 was isolated from a stork with severe neurological symptoms [20]. IS-98-ST1 is suitable for the study of viral determinants of WNV virulence, as well as host factors involved in viral pathogenicity [21, 22, 23, 24, 25]. To date, a few molecular clones derived from North American, African and Australian strains of WNV are available for the study of viral neuropathogenicity [1, 3, 9, 26, 27, 28]. We report here that WNV strain IS-98-ST1 recovered from an infectious cDNA clone reproduces the pathobiological properties of the parental strain, and is thus well-suited for studying the virulence of WNV isolates from Europe/West Asia. Also, the pathobiology of the novel WNV infectious clone and other WNV strains was examined in embryonated chicken eggs. The capacity of different WNV strains to replicate in eggs closely paralleled their growth properties in mice, suggesting that inoculation of embryonated chicken eggs could provide a practical *in vivo* system for the study of WNV pathogenesis.

Results

Construction of a European/Mediterranean infectious clone

WNV strain IS-98-ST1 is a highly pathogenic isolate originating from a sick stork during the 1998 epidemic in Israel [20]. Its ssRNA⁺ genome was amplified into four pieces for generating the infectious clone construct. After RT-PCR amplification of viral RNA genome, each of the four amplicons was subcloned in pCR2.1, a high-copy vector used for the cloning of RT-PCR products. Propagation of bacteria at room temperature allowed maintenance of intact inserts in pCR2.1. Difficulties in the sequential insertion of each fragment in pBR322 led us to devise an alternative two plasmid strategy (Fig.1). Fragment 1 (nt 120-2559) was inserted in pBR322 and transferred along with the SP6 promoter upstream of fragment 2 (nt 2560-5781) to pCR2.1 (Fig. 1). This construction will be referred to as plasmid A. Fragment 4 (nt 8023-10473) and then fragment 3 (nt 5782-8022) were inserted into pBR322. A 1740 bp sequence at the 3' end of fragment 2 was inserted upstream of fragments 3 and 4 within pBR322. This construction will be referred to as plasmid B. The sequence encompassing fragment 2 to fragment 3 was excised from plasmid B, and inserted downstream of fragments 1 and 2 in plasmid A. A *Sna*BI restriction endonuclease site was introduced into the NS4A gene within fragment 4 and further used as a genetic marker. The resulting plasmid was introduced in *E.coli* DH5 α strain. It carries the full-length cDNA from WNV IS-98-ST1 in a single plasmid and was designated WNV-infectious clone (IC) cDNA. The stability of the clone was evaluated by propagating the DH5 α *E.coli* hosting the full-length IC cDNA plasmid for six continuous passages as described in the paper published by Shi *et al.* [3]. Resulting plasmids were digested with *Ava*I, and displayed the same digestion pattern (data not shown).

The RNA transcript of the WNV-IC cDNA clone was highly infectious

In vitro transcription of WNV-IC cDNA generated a transcript of ~ 11,000 nt. Transcripts were used to electroporate Vero cells. Vero supernatants were harvested at day 2 post-infection (p.i) in order to minimize emergence of quasi-species and used to infect new Vero cells (P1). Viral titers in supernatant obtained for P1 reached 7×10^7 Plaque Forming Unit (PFU)/ml. The parental virus was used as a positive control in the titration experiments. A similar plaque morphology was observed for parental and IC viruses (Fig. 2 (a)). IFA was performed to check for the antigenicity of viral particles, and intracellular NS1 was detected for both parental and recombinant viruses (Fig. 2 (d)).

WNV recovered from the cDNA clone retained its genetic marker

To exclude the possibility that recovery of virus from transfected cells resulted from contamination by the parental virus, we tested the presence of the *SnaBI* restriction site in RT-PCR products amplified from the virus produced in the transfected Vero cells (Fig. 2 (b)). The parental virus genomic cDNA was not digested by *SnaBI*. In contrast, the IC virus PCR product generated fragments of 812 bp and 386 bp following *SnaBI* digestion, indicating that the virus recovered from the transfected cells was derived from infectious full-length RNA from the WNV-IC plasmid.

Identification of reversion mutation during cloning

Every intermediary construct and the final IC plasmid were entirely sequenced. A G3401A mutation was identified in the WNV-IC plasmid that changed a UGG (Trp) codon into a UAG stop codon within the NS1 coding region. This mutation must have been positively selected during plasmid amplification in *E. coli*. Nevertheless, and surprisingly, the mutation was absent from the recovered WNV genome. That is, the sequence of packaged RNA genomes was identical to the expected IS-98-ST1 genomic sequence. To test whether the recovery of infectious RNAs was due to recombination with wild-type virus, a truncated transcript was designed that did not encompass the region bearing the restriction endonuclease site *SnaBI* in the corresponding cDNA. This truncated transcript was used to transfect Vero cells. A cytopathic effect (CPE) was seen 3 days after transfection in cells transfected with the full-length WNV-IC RNA transcript. In contrast, no CPE was observed up to 7 days post-transfection with the truncated transcript. In addition, quantitative RT-PCR on total RNA extracted 7 days post-transfection with primers specific for the 3'NC region detected no truncated viral RNA (data not shown). Therefore, infectious particles recovered from the transfection of Vero cells with WNV-IC transcripts were not the product of a recombination event.

Parental and recombinant WNV displayed indistinguishable replicative capacities

To test the viral replication rate, Vero cells were infected with WNV parental or IC virus (Fig. 2 (c)). At 48 h post-infection (p.i.), CPE was observed in Vero cells infected with either virus. Viral RNA amounts were higher during the first 24 hours. However, at later stages, 48h and 72h p.i., viral RNA amounts decreased due to increasing cell death (data not shown). Infectious virus recovered from cell supernatants noticeably increased in the first 24h p.i. and peaked at 48h p.i (Fig. 2(c)). Growth curves exhibited no significant difference between the WNV parental and IC viruses.

Therefore, the two viruses were indistinguishable with regard to replication in mammalian cells.

Parental and recombinant WNV displayed the same virulence, pathogenicity and capacity for neuroinvasion *in vivo*.

Conventional laboratory mice develop encephalitis and die after inoculation by the peripheral route [21]. To compare the virulence of the WNV parental and IC viruses, adult BALB/cJ mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 1, 10, 100 or 1000 PFU. No control mice died consecutive to PBS injection. The survival curves did not differ significantly at each dose of infection for parental and IC viruses with death occurring between days 7 and 13-15 (Fig. 3). These data agree with previous reports [22, 29]. We measured the viremia at day 3 p.i. and the viral load in the brain at time of death. There was no significant difference in the viremia at day 3 p.i. and in the viral load in the brain (Fig. 4 and 5). The *SnaBI* endonuclease restriction site was present in the cDNA of the WNV-IC virus recovered from infected mice, thus confirming that the mice were indeed infected with the recombinant virus (data not shown). In addition, inflammatory lesions were observed in the brain, within the meninges. They were characterized by diffuse lymphocytic or lymphoplasmocytic infiltrates, typical of lymphocytic meningitis, while some lymphocytic perivascular cuffs were also visible in the brain parenchyma, revealing encephalitis (Fig. 6). No lesions were observed in PBS-treated mice. Thus, the virulence of WNV parental and IC viruses was indistinguishable in susceptible BALB/cJ mice.

To exclude the possibility that the susceptibility of BALB/c mice may have concealed differences in the virulence of the parental and cloned virus, we examined whether the WNV parental and IC viruses were equally avirulent in resistant inbred strains of mice. Indeed, Mashimo *et al.* [21] established that susceptibility of BALB/c mice to infection with WNV strain IS-98-ST1 correlates with a premature stop codon within exon 4 of the oligoadenylate synthetase 1b (*Oas1b*) gene. Mice expressing a full-length OAS1B protein are resistant to infection with WNV strain IS-98-ST1 [21, 25]. To test the virulence of WNV parental and IC viruses in resistant hosts, we took advantage of MBT/Pas and C.MBT-*Oas1b* mice. MBT/Pas mice derive from *Mus m. musculus* progenitors; they carry a wild-type allele at the *Oas1b* locus. C.MBT-*Oas1b* mice carry the *Oas* gene cluster of the MBT/Pas mice within a BALB/c genetic background. MBT/Pas and C.MBT-*Oas1b* express a full-length OAS1B protein and are resistant to infection with WNV [25]. MBT/Pas, C.MBT-*Oas1b* and BALB/c mice were inoculated with 1000 PFU of WNV parental or IC virus. All BALB/c mice died within 9 days p.i. In contrast, all MBT and C.MBT-*Oas1b* mice survived the infection (Fig. 7 (a)) independent of the WNV stock. Viremia at day 3 p.i. was measured by

qRT-PCR. Fig. 7 (b) shows that viral RNA was detected in the blood of all infected mice. Viral RNA levels were not significantly different in mice infected with either the WNV parental or IC virus. However, viral RNA levels were significantly higher in susceptible BALB/c mice than in resistant MBT/Pas and C.MBT-*Oas1b* mice. Interestingly, viral RNA levels were significantly lower in MBT/Pas mice than in C.MBT-*Oas1b* mice, indicating that viral replication is lower in MBT/Pas mice than in C.MBT-*Oas1b* mice during the first days p.i. This suggests that MBT/Pas mice might carry resistance alleles that are not present in the C.MBT-*Oas1b* congenic mice.

Parental and recombinant WNV displayed the same virulence and capacity for neuroinvasion in an embryonic avian model

Birds are the principal amplifying hosts for WNV. Previous studies have shown that American crows and chicken embryos are susceptible to WNV infection [30, 31]. In experiments conducted by Crespo *et al.* [31], WNV was recovered from embryonated chicken eggs after inoculation with organ extracts from wild birds. Here, we evaluated the embryonated chicken model as a practical avian-based system to compare the virulence of WNV strains. To test the susceptibility of chicken embryos to infection, eggs (N=6) were inoculated intravascularly with 0.1, 1, 10 or 100 PFU of the WNV IS-98-ST1 parental strain. The mortality was monitored for 7 days. Similar curves were obtained for the infectious doses of 1, 10 and 100 PFU, with 100 % of embryos dying between day 4 and 5 p.i (supplementary figure). However, eggs infected with 0.1 PFU exhibited a 50% lethality rate. The 1 PFU dose (ten-fold the fifty percent lethal dose [LD50]) was chosen for the following experiments. The brain, heart, lung, liver, intestine and kidney are targets for WNV in birds [32, 33]. Therefore, the viral loads were measured in these organs. No significant differences were observed between the viral loads in these organs (Fig. 8).

We chose to focus our analysis on the brain and the heart. Mortality and viral load in these tissues were monitored in groups of 6 eggs (Fig. 9). The WNV strain Kunjin served as a low pathogenic control [34]. A delay in mortality was observed in eggs infected with the Kunjin strain, with death occurring between days 4 and 7. When eggs were infected with either the parental strain or the IC virus, death was massive at day 4. The mortality rate was not significantly different in eggs inoculated with the WNV parental or the IC virus (Fig. 9 (a)). We measured the viral load in the brain and heart at day 4 p.i. The viral load in these tissues was not significantly different in the eggs infected with the parental strain or its cognate IC (Fig. 9 (b)). By contrast, the viral load was significantly lower in the eggs infected with Kunjin strain. Interestingly, similar macroscopic lesions appeared on the skin (petechia) and hemorrhages were observed in the brain, heart, kidneys and liver at the time of death for all viruses

tested. Altogether these data show that the virulence of WNV parental and IC virus was indistinguishable in this avian model.

Discussion

We report the generation of a full-length cDNA derived from the highly virulent Mediterranean WNV strain IS-98-ST1 that permitted recovery of a fully replicative virus. The establishment of a reverse genetic system for WNV is essential for the study of viral neurovirulence and neuroinvasiveness. Infectious clones allow introduction of genetic modifications and facilitate identification of the molecular determinants of viral virulence. Nevertheless, cDNA constructs comprising the full flavivirus genome have been widely reported to be unstable in prokaryotic expression systems [1, 3, 26, 35]. To avoid constructs all together, genome-length RT-PCRs have been employed, but pose the risk of generating a heterogeneous RNA population, owing to mutations occurring during RT-PCR or to viral diversity in the original virus stock. Different approaches have thus been used to improve the stability of full-length flavivirus cDNA clones [3]. Introns have been inserted to interrupt genes encoding products that may be toxic in bacteria [8, 36], and relatively permissive *E.coli* strains have been identified. Full-length flavivirus cDNA from NY99, B956 and Kunjin WNV strains have previously been cloned in plasmids amplified in the HB101 *E.coli* strain [3, 8, 26]. In the present study, we employed a plasmid cloning strategy to construct an infectious clone of the IS-98-ST1 WNV strain (WNV-IC). Selection of the appropriate plasmid is critical [3, 37]. The pBR322 plasmid was chosen because it had been used successfully to generate West Nile infectious clones in the past [3, 8, 26]. Plasmids encoding flavivirus sequences downstream of cytomegalovirus (CMV) or lac promoters displayed high instability due to expression of products that were toxic for *E.coli* [38]. To avoid such problems we selected the promoter for the bacteriophage SP6 RNA polymerase for *in vitro* transcription of viral RNA [8, 26, 39, 40]. An additional G nucleotide was inserted downstream of the promoter to ensure more efficient transcription initiation [26]. To this end, the pBR322 plasmid was modified (GeneCust, Dudelange, Luxemburg) to incorporate the SP6 promoter, the WNV 5'UTR (from position 1 to 97), part of the gene encoding the WNV capsid (from position 97 to 120) and the WNV 3'UTR (from position 10437 to 11029), along with the hepatitis δ virus ribozyme (HDVR). The HDVR mediated termination of WNV transcripts at their natural 3' end, thereby ensuring removal of nonviral sequences downstream of the WNV 3'UTR that might have interfered with the initiation of viral RNA replication [26, 41]. Although infectious clones have been generated in the past,

they were found to comprise mutations with respect to their parental virus or have been very difficult to handle [3, 8, 26, 42]. As a consequence, many of the infectious WNV clones currently in use have been obtained in two pieces [1, 30, 43]. Our infectious clone was constructed as a single piece and ensures propagation of recombinant virus. It also displayed remarkable stability, even after numerous passages in bacterial hosts (data not shown).

A G3401A mutation was identified in the NS1 coding region in the WNV-IC plasmid, as well as plasmid B that changed a UGG (Trp) codon into a UAG stop codon. When it appeared during cloning, the fragment encoding the 3' end of the NS1 open reading frame (ORF) could be stably inserted in frame of the fragment coding the 5' end, thus reconstituting the complete NS1 ORF. Moreover, repeated efforts to correct the stop mutation by site-directed mutagenesis failed, even though parallel mutagenesis of other areas of the IC plasmid succeeded. This suggests that this change might stabilize the recombinant plasmid by neutralizing the leaky expression of NS1 in *E. coli*. The toxicity of the NS1 protein in *E. coli* is supported by previous observations made in other laboratories [1, 43]. Nevertheless, we observed that the stop codon is spontaneously corrected at an early time point after RNA transfection and that viral genomes recovered from newly formed viral particles carried the fully corrected gene. Thus, the molecular clone described in the present study supports efficient generation of viral particles bearing the fully intact genome of the parental virus. It is interesting to note that a nonsense mutation was observed in the NS1 ORF at a nearby position (C3342A) in a plasmid bearing an IC derived from the NY99 isolate [30]. This unnatural stop codon was not, however, detected in the genome of viral particles that were subsequently recovered, in which a A3342T plasmid-to-virus mutation had actually restored the original cysteine residue. Kinney *et al.* [30] hypothesized that a T7 polymerase transcription error had substituted the correct nucleotide. As such a reversion was observed twice in our hands and four times by others, we suggest that a more complex molecular mechanism may account for this event, such as translational stop codon readthroughs that have been described for viral genomes, for RNA viruses in particular [44, 45, 46], and that could explain the obtention of viral particles from an RNA transcript with a premature stop codon.

Crucially, the replicative and pathogenic properties of parental and recombinant viruses were indistinguishable in murine and avian *in vivo* models. Thus, the recombinant virus may be used to identify molecular determinants of virulence. Embryonated chicken eggs constitute a convenient *in vivo* system, and have previously proved to be a practical tool for the amplification of low doses of WNV [31]. In the present study, we show for the first time that chicken embryos can be used as an avian model to compare the virulence of WNV strains. The differences in the replication rate between Kunjin (attenuated strain) and IS-98-ST1 (highly virulent)

parental or WNV-IC virus were observed here in the context of the embryonic avian immune system [47, 48]. The embryonated chicken egg model has been shown to be useful to study the virulence of various bacteria and fungal pathogens [49]. Our results strongly suggest that this model may also be exploited to investigate viral virulence.

Infectious clones of lineage 2, African strain B956 [26], lineage 1, American NY99 [1, 3, 30, 36, 43, 50], and Australian Kunjin strains [8, 40] have been generated and used to decipher the role of viral proteins in virulence [43, 51], neuroinvasiveness [1, 36] and escape from host defences [23, 52], as well as to evaluate the impact of point mutations [23, 53, 54]. These tools have substantially facilitated identification of molecular determinants of WNV virulence, albeit in a non-European context. WNV epidemiology differs between Europe and North America, in that outbreaks in Europe are more limited in space and duration. It is presumed that at least part of the difference stems from genetic divergence between North American and Mediterranean viral isolates. It is thus important to extend molecular studies of WNV to European strains, for which results have sometimes been at odds with those for the NY99 strain. Brault *et al.* [54] identified a point mutation, T249P, in NS3, as playing an important role in the virulence of NY99 in American crows, while Sotelo *et al.* [55] showed that a 2007 Spanish strain bore the same mutation but was much less virulent than the NY99 strain in mice. Clearly, comparison of molecular clones derived from different continents is indispensable for identifying the genetic differences underlying the different epidemiological patterns.

Finally, the IS-98-ST1 infectious clone will be useful to assess the impact of selected mutations or novel genomic changes appearing in emerging European strains, in the context of increasing numbers of outbreaks and severity of infection in the Mediterranean basin and Eastern Europe.

Materials and methods

Cell lines and viruses Vero cells, ATCC® CCL-81, were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Lonza), and 1 mM sodium pyruvate. 1U/ml of penicillin and 1µg/ml of streptomycin were added to all media (Invitrogen). Cells were maintained in CO₂ incubators (5% CO₂) at 37°C. The Israeli isolate IS-98-ST1 of WNV has been described elsewhere [20]. Briefly, IS-98-ST1 was isolated from the cerebellum of a stork in Israel in 1998 on Vero cells and the recovered virus was used to infect mosquito AP61 cells. A third-passage stock of IS-98-ST1 on AP61 cells was used in the following experiments. WNV Kunjin virus (KUN) was provided by the National Reference Center for Arboviruses at the Pasteur Institute, Paris.

Plaque Assay 7x10⁵ Vero cells were seeded into each well of a 6-well plate and infected with parental virus or infectious clone for 1h 30 min at 37°C. The cells were overlaid with 2% seaplaque agarose (Lonza) in MEM (Gibco) containing 5% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% sodium pyruvate, 1U/ml of penicillin and 1µg/ml of streptomycin. 72h post-infection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.4% crystal violet for 24h in a humid chamber at 37°C.

cDNA synthesis and cloning Vero cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 1 to 10 with parental IS-98-ST1 WNV, and virus was harvested from cell culture media at 72h postinfection. Genomic RNA was extracted with the RNeasy kit (Qiagen). cDNA fragments covering the complete viral coding genome were reverse transcribed from genomic RNA by using Superscript III (Invitrogen) followed by PCR with Phusion Taq polymerase (New England Biolabs) according to the manufacturers' instructions. In particular, four genomic fragments were amplified using primers 95F 5'-CGA TGT CTA AGA AAC CAG GAG- 3', 2585R 5'-GTG GCG TTT CAG GGT AAT AC- 3' for fragment 1, 2539F 5'-GAT GTG GAG GCT TGG ATG GAC- 3', 5804R 5'-CAT TTT GGG TAC TCC GTC TCG-3' for fragment 2, 5743F 5'-CGT GCT GGA AAG AAA GTA GTC-3', 8082R 5'-GTA GAA CAC ATC CAC TCC ACTC-3' for fragment 3, 7975F 5'-GAA GTC AGA GGG TAC ACA AAG G-3', 10552R 5'-CAG CAC CGT CTA CTC AAC TTC-3' for fragment 4. They were first subcloned into the pCR2.1 plasmid and then cloned into pBR322 following enzymatic digestions using standard procedures [56]. All restriction endonucleases were purchased from New England Biolabs. Sequences were verified after cloning.

The chemically competent *E.coli* bacterial strain DH5α (Invitrogen) was used as the host for construction and propagation of WNV-IC cDNA clone. Standard cloning procedures were followed [57], except that transformed bacteria were propagated at 25°C.

Sequencing Nucleotide sequencing was performed by Eurofins MWG Operon (France).

RNA transcription and transfection Plasmid WNV-IC, containing the full-length cDNA of WNV flanked by the Sp6 promoter and Hepatitis δ virus (HDV) ribozyme, was amplified in *E. coli* DH5 α and purified with the Miniprep kit (Qiagen). For *in vitro* transcription, 1 μ g of WNV-IC plasmid was linearized with *Bam*HI. The digestion reaction mix was purified with the QIAQuick purification Kit and the linearized plasmid was quantified by spectrophotometry. The Sp6 MEGAscript High yield transcription kit (Ambion) was used to *in vitro* transcribe 1 μ g of DNA in a 20 μ l reaction mixture in the presence of 4 mM Cap Analog (New England Biolabs). The reaction mixture was incubated at 37°C for 4h, followed by the addition of DNase I for 45 min at 37°C to remove the DNA template. RNA was stored at – 80°C.

For transfection, the 20 μ l (~ 20 μ g) RNA transcript mix was used to electroporate 6x10⁶ Vero cells resuspended in 0.4 ml cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, in 0.4 cm cuvettes with the GenePulser apparatus (Bio-Rad); the following settings were applied: 4 pulses of 0.29 kV and 25 μ F at 4s intervals. After a 10 min recovery, cells were mixed with D-MEM supplemented with 2% FBS and incubated in a T-25 flask (5% CO₂ at 37°C) until a cytopathic effect (CPE) was observed (referred to as passage 0, P0). A 1 ml aliquot of P0 tissue culture supernatant at day 2 was used to infect a new flask of Vero cells (referred to as passage 1, P1) and incubated until a CPE was observed. Virus was harvested as tissue culture supernatant, clarified by centrifugation at 600g for 5 min, stored in aliquots at -80°C, and designated as infectious clone derived virus (IC virus).

Genetic marker analysis of the recombinant and parental viruses An *Sna*BI restriction site was inserted into the cDNA using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) as a silent genetic marker in order to distinguish recombinant progeny virus from the corresponding parental virus, by substitution of an A for a T at position 6555 in the viral cDNA. RNA was extracted from recombinant virus harvested from supernatant on day 3 post-transfection and parental virus by using the RNeasy kit (Qiagen). A 1198 bp fragment including the genetic marker was amplified by RT-PCR from RNA extracted from either recombinant or parental virus with primers 5743F 5'- CGT GCT GGA AAG AAA GTA GTC-3' and 6941R 5'- CTG CTT ATG TCA CTC TTG GTC TTA TC-3'. The RT-PCR products were purified using the QIAQuick PCR purification protocol (Qiagen), and then digested with *Sna*BI and analyzed by electrophoretic migration on a 1% agarose gel. When the *Sna*BI restriction site is present, digestion of the PCR product generates fragments of 812 and 386 bp.

Replication curves Subconfluent Vero cells seeded in 12-well plates were inoculated with either parental or WNV-IC derived virus diluted in D-MEM at an MOI of 1 in quintuplet wells. Following incubation for 1h30 min in 5% CO₂ at 37°C, viral inoculum was removed. Monolayers were washed twice with fresh D-MEM, and 1 ml of complete D-MEM was added to each well. The plates were incubated for up to 3 days in 5% CO₂ at 37°C. At 10, 24, 48, and 72h time points, medium was removed. At the indicated time post-infection, culture supernatants were collected and viral titers were determined by plaque assay on Vero cells.

Immunofluorescence Expression of viral NS1 protein in cells infected at an MOI of 1 was monitored by immunofluorescence (IFA) analysis with murine IgM antibodies directed against the WNV NS1 protein (Millipore) and with a fluorescein isothiocyanate-conjugate of goat anti-murine IgM antibody (Abcys), as described elsewhere [58]. Fluorescence was monitored under a fluorescence microscope equipped with a video documentation system (Zeiss).

Quantitative RT-PCR RNA was reverse-transcribed and amplified using conditions described by Linke *et al.* [59] using the AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems), with primers WNproC-10F 5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3'/WNproC-153R 5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3' in the 5' untranslated region (UTR) or primers WN3'NC-F 10538 5'-GAGTAGACGGTGCTGCCTGC-3'/WN3'NC-R 10627 5'-CGAGACGGTTCTGAGGGCTTAC-3' in the 3'UTR for amplification of viral RNA and primers ACTB-966F 5'-CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC-3'/ACTB-1096R 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3' for amplification of cellular RNA, and probes WNproC 5'-FAM-CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT-TAMRA-3' or WN3'NC 10564c 5'-FAM-ACCCAGTCCTCCTGGGGT-MGB-3', or ACTB1042-67 5'-VIC-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMRA-3', respectively. Primers and probes were used at 0.4 and 0.2µM concentrations, respectively. Reaction mixtures (25µL) contained 5µL RNA and all samples were analyzed in duplicate. Amplification was performed in an AB 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The thermal profiles of the reaction were as follows: 45°C for 10 min (RT), 95°C for 10 min (Taq activation), and 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1min (amplification).

For quantification, quantified WNV RNA and β-actin RNA were used as a viral standard and to standardize RNA extractions, respectively. WNV RNA was obtained from viral cultures on Vero cells. β-actin RNA was kindly provided by the FMDV French Reference Laboratory (ANSES, Maisons-Alfort).

Virulence in mice Mice were housed in an environmentally controlled room under biosafety level 3 conditions and were given food and water *ad libitum*. Female

outbred BALB/c mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) and MBT/Pas and C.MBT-*Oas1b* mice provided by Jean-Jacques Panthier (Pasteur Institute, Paris) were obtained at 5 weeks of age and were acclimatized for 1 week. All mice were 6 weeks of age at the start of the experiment. 5 mice per group were inoculated intraperitoneally (i.p.) with diluent alone (PBS, endotoxin free, pH 7.4) or with 1, 10, 100 or 1000 PFU of parental virus or infectious clones thereof. Mice were evaluated clinically for 2 weeks. Observed clinical signs included ruffled fur, paresis, hind leg paralysis and tremors. Blood was collected in EDTA at day 3 post-infection (p.i), and the presence of viral RNA was confirmed by quantitative RT-PCR [53] after RNA extraction with the QIAamp viral kit (Qiagen). Brains were recovered from mice shortly after their death, and the presence of virus was confirmed by quantitative RT-PCR after RNA extraction with the RNeasy kit (Qiagen). Control mice were euthanized at day 15 and checked for absence of virus in their brains.

Ethical Treatment of Animals This study was performed in strict accordance with the French guidelines and recommendations on animal experimentation and welfare. The protocol was approved by the local Animal Ethics Committee (ANSES/ENVA/UPEC) (Permit Number: 15/02/11-13). Every effort was made to minimize suffering.

Histology Groups of 4 female outbred BALB/c mice, aged 6 weeks at the start of the experiment, were inoculated with 100 PFU of parental virus or infectious clones thereof or diluent alone i.p. Mice were euthanized at day 7 p.i and brains were recovered. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. Tissue sections (4 µm) were prepared and stained with hematoxylin, eosin and saffron.

Virulence in embryonated chicken eggs 10-day-old pathogen-free chicken eggs (INRA, Jouy-en-Josas, France) were inoculated by the intravascular route. Eggs were inoculated with diluent alone (PBS, endotoxin free, pH 7.4 supplemented with 1U/ml of penicillin and 1µg/ml of streptomycin) or with either Kunjin, IS-98-ST1 parental or IC viruses. The eggs were incubated at 37°C and were observed regularly for up to 8 days. Viral RNA was analysed in the brain, heart, lungs, liver, intestines and kidneys after extraction using the RNeasy Kit (Qiagen), and amplified by quantitative RT-PCR as described above.

Statistical analysis A Mann-Whitney test was applied to evaluate differences in survival curves. Paired T-test and One-way ANOVA were used to determine statistical significance for viral loads between groups infected with the parental or the IC derived viruses.

Acknowledgments

We thank Serge Kouamé for helpful assistance with animal experiments, Dr Damien Vitour for his scientific advice and Matthieu Chaumien for his valuable support with Photoshop.

References

1. Beasley DWC, Whiteman MC, Zhang S, Huang CYH, Schneider BS *et al.* (2005) Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 west nile virus strains. *J Virol* 79 (13): 8339-8347
2. Deas TS, Tilgner M, Ren P, Stein DA *et al.* (2005) Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication. *J Virol* 79 (8): 4599-609.
3. Shi PY, Tilgner M, Lo MK, Kent KA, Bernard KA (2002) Infectious cDNA clone of the epidemic west nile virus from new york city. *J virol* 76 (12): 5847-5856
4. Samuel MA, Diamonds MS (2006) Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol* 80 (19): 9349-9360
5. Puig-Basagoiti F, Tilgner M, Bennett CJ, Zhou Y, Muñoz-Jordan JL *et al.* (2007) A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology* 361(1): 229-241
6. Melian EB, Hinzman E, Nagasaki T, Firth AE, Wills NM *et al.* (2010) NS1 of Flaviviruses in the Japanese Encephalitis Virus serogroup is a product of a ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *J Virol* 84 (3): 1641-1647
7. Kummerer, BM, Rice, CM (2002) Mutations in the yellow fever virus nonstructural NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 76 (10): 4773-4783
8. Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA (2003) Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol* 77 (14): 7804-13
9. Liu W, Wang X, Mokhonov V, Shi P, Randall R *et al.* (2005) Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile Virus involves

blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. J Virol 79 (3) : 1934-42

10. Muñoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A (2003) Inhibition of interferon signaling by dengue virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (24): 14333-14338

11. Pugachev K, Guirakhoo F, Ocran S, Mitchell F, Parsons M *et al.* (2004) High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. J Virol 78 (2): 1032-8

12. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT (2011) Phylogeography of West Nile Virus : from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. J Virol. 85 (6) : 2964-2974

13. Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA (2007) West Nile virus isolates from India : evidence for a distinct genetic lineage. J Gen Virol 88: 875-884

14. Ma D, Jiang D, Qing M, Weidner JM, Qu X *et al.* (2009) Antiviral effect of interferon lambda against West Nile virus. Antiviral Res 83: 53-60

15. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F *et al.* (2010) Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. The Open Virology J 4: 29-37

16. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Douglas G *et al.* (2010) Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July – August 2010. Eurosurveillance 15 (34): 1-5

17. Beasley DWC, Li L, Suderman MT, Barrett ADT (2002) Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile Virus strains varies depending upon virus genotype. Virology 296: 17-23

18. Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M, Paweska JT, Swanepoel R *et al.* (2008) Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile Virus strains. Emerg Infect Dis 14 (2): 222-230

19. Sotelo E, Gutierrez-Guzmán AV, del Amo J, Llorente F, El-Harrak M *et al.* (2011) Pathogenicity of two recent western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. Vet Res 42: 11-19

20. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R *et al.* (2002) Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. Emerg Infect Dis 8 : 392-397

21. Mashimo T, Lucas M, Simon-Chazottes D, Frenkiel MP, Montagutelli X *et al.* (2002) A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1

isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (17): 11311-11316.

22. Lucas M, Frenkiel M-P, Mashimo T, Guénet J-L, Deubel V *et al.* (2004) The israeli strain IS-98-ST1 of West Nile virus as viral model for West Nile encephalitis in the Old world. *Virology* 18: 1-9

23. Mertens E, Kajaste-Rudnitski A, Torres S, Funk A, Frenkiel M-P *et al.* (2010) Viral determinants in the NS3 helicase and 2K peptide that promote West Nile virus resistance to antiviral action of 2', 5' oligoadenylate synthase 1b. *Virology* 399 (1) : 176-185

24. Kajaste-Rudnitski A, Mashimo T, Frenkiel MP, Guénet JL, Lucas M *et al.* (2006) The 2', 5'-Oligoadenylate Synthetase 1b Is a Potent Inhibitor of West Nile Virus Replication Inside Infected Cells. *J Biol Chem* 281 (6) : 4624-4637

25. Simon-Chazotte D, Frenkiel M-P, Montagutelli X, Guénet J-L, Desprès P *et al.* (2011) Transgenic expression of full length 2',5'-oligoadenylate synthase 1b confers to BALB/c mice resistance against West Nile virus-induced encephalitis. *Virology* 417: 147-153.

26. Yamschchikov VF, Wengler G, Peregylin AA, Brinton MA, Compans R (2001) An infectious clone of the west nile flavivirus . *Virology* 281, 294-304

27. Evans JD, Seeger C (2007) Differential effects of mutations in NS4B on West Nile Virus replication and inhibition of interferon signaling. *J Virol* 81 (21): 11809-11816

28. Khromykh AA, Westaway EG (1997) Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* 71(2): 1497-505.

29. Murray KO, Mertens E, Desprès P (2010) West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res* 41 (6): 67-81

30. Kinney RM, Huang CYH, Whiteman MC, Bowen RA, Langevin SA *et al.* (2006) Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J Gen Virol* 87: 3611-3622.

31. Crespo R, Shivaprasad HL, França M, Woolcock PR (2009) Isolation and Distribution of West Nile Virus in Embryonated Chicken Eggs. *Avian Diseases* 53: 608-612

32. Senne DA, Pedersen JC, Hutto DL, Taylor WD, Schmitt BJ *et al.* (2000) Pathogenicity of West Nile virus in chickens. *Avian Dis* 44 (3): 642-649.

33. Steel KE, Linn MJ, Schoepp RJ, Komar N, Geisbert TW *et al.* (2000) Pathology of Fatal West Nile Virus Infections in Native and Exotic Birds during the 1999 Outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol* 37: 208-224.

34. Hall RA, Broom AK, Smith DW, Mackenzie JS (2002) The ecology and epidemiology of Kunjin virus. *Curr.Top.Microbiol. Immunol* 267: 253-269
35. Seregin A, Nistler R, Borisevich V, Yamshchikov G, Chaporgina E *et al.* (2006) Immunogenicity of west nile virus infectious DNA and its noninfectious derivatives. *Virology* 356: 115-125
36. Borisevich V, Seregin A, Nistler R, Mutabazi D, Yamshchikov V (2006) Biological properties of chimeric West Nile viruses. *Virology* 349: 371-381
37. Ruggli N, Rice CM (1999) Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Adv Virus Res* 53: 183-207
38. Yamshchikov V, Mishin V, Cominelli F (2001). A new strategy in design of +RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology* 281(2): 272-80.
39. Elghonemy S, Davis WG, Brinton MA (2005) The majority of the nucleotides in the top loop of the genomic 3'terminal stem loop structure are cis-acting in a West Nile virus infectious clone. *Virology* 331: 238-246
40. Khromykh A. A., Westaway E. G (1994) Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* 68: 4580-4588
41. Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG *et al.* (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* 73: 9679-9682
42. Yamshchikov G, Borisevich V, Seregin A, Chaporgina E, Mishina M *et al.* (2004). An attenuated West Nile prototype virus is highly immunogenic and protects against the deadly NY99 strain: a candidate for live WN vaccine development. *Virology*. 330(1):304-12.
43. Audsley M, Edmonds J, Liu W, Mokhonov V, Mokhonova E *et al.* (2011) Virulence determinants between New York 99 and Kunjin strains of West Nile Virus. *Virology* 414 (1): 63-73
44. Firth AE, Wills NM, Gesteland RF, Atkins JF (2011). Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3'RNA structural element. *Nucleic Acids Res*, 39 (15): 6679-6691
45. Firth AE and Brierley I (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol*, in press
46. Jungreis I, Lin MF, Spokony R, Chan CS, Negre N,Victorsen A, White KP, Kellis M (2011). Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoan. *Genome Res* 21: 2096-2113

47. Abdul-Careem MF, Hunter DB, Lambourne MD, Barta J, Sharif S (2007). Ontogeny of cytokine gene expression in the chicken spleen. *Poult Sci.* 86(7):1351-5.
48. Jacobsen ID, Grosse K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M (2010). Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect. Immun.* 78(7): 2995-3006.
49. Liang QL, Luo J, Zhou K, Dong JX, He HX (2011) Immune-related gene expression in response to H5N1 avian influenza virus infection in chicken and duck embryonic fibroblasts. *Mol Immunol* 48 (6-7): 924-30
50. Schlick P, Taucher C, Schittl B, Tran JL, Kofler RM *et al.* (2009) Helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$ of West Nile Virus capsid protein are dispensable for assembly of infectious virions. *J Virol* 83 (11): 5581-5591.
51. Yu L, Putnak JR, Pletnev AG, Markoff L (2008) Attenuated West Nile viruses bearing 3'SL and envelope gene substitution mutations. *Vaccine* 26 (47): 5981-5988
52. Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA *et al.* (2006) A single amino acid substitution in the West Nile nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol* 80 (5): 2396-2404
53. Wicker JA, Whiteman MC, Beasley DWC, Todd Davis C, Zhang S *et al.* (2006) A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology* 349(2): 245-253
54. Brault AC, Huang C Y-H, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA *et al.* (2007) A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet* 39 (9): 1162-1166
55. Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Agüero M, Hoefle U *et al.* (2009) Characterization of West Nile Virus isolates from Spain : New insights into the distinct West Nile Virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology* 395: 289-297
56. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) « Molecular cloning : a laboratory manual », 2nd ed. Edited by cold spring harbor laboratory press, New York
57. Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning, 3rd ed. Edited by cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York
58. Brnic D, Stevanovic V, Cochet M, Agier C, Richardson J *et al.* (2011) Borna Disease Virus Infects Human Neural Progenitor Cells and Impairs Neurogenesis. *J Virol Epub ahead of print.*
59. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G (2007) Detection of west nile virus lineage 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Meth* 146: 355-358

Figures

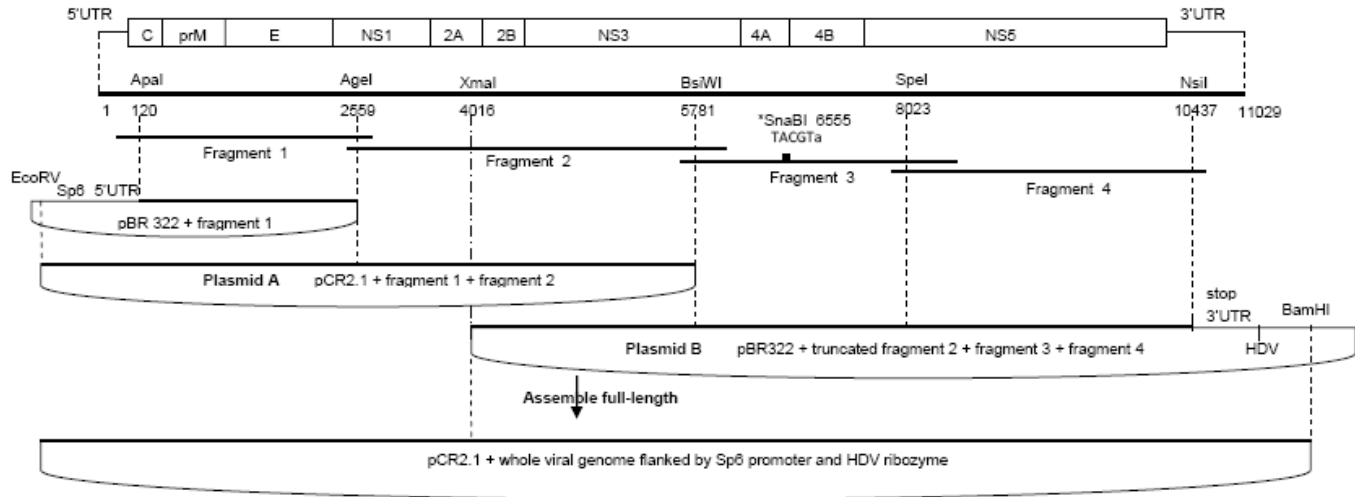


Figure 1: Schematic representation of the cloning strategy. The flavivirus genome is represented approximately to scale. Unique or rare restriction sites used for cloning and their location (numbering based on the sequence from Genbank no. AF481864) are shown at the top. Four cDNA fragments represented by thick lines were synthesized from IS-98-ST1 viral genomic RNA by RT-PCR to cover the complete coding WNV genome. The cDNA fragments were first cloned into the pCR2.1 plasmid, and then digested using unique restrictions sites and subcloned into the destination plasmid. The full length infectious clone was obtained by the extraction of fragment 2+3+4 from plasmid B after an enzymatic digestion with *XmaI* and *BamHI* followed by its insertion into plasmid A downstream of fragment 1+2. One silent mutation (shown in lower case) was engineered in the pCR2.1+ fragment 3 plasmid to create a *SnaBI* site.

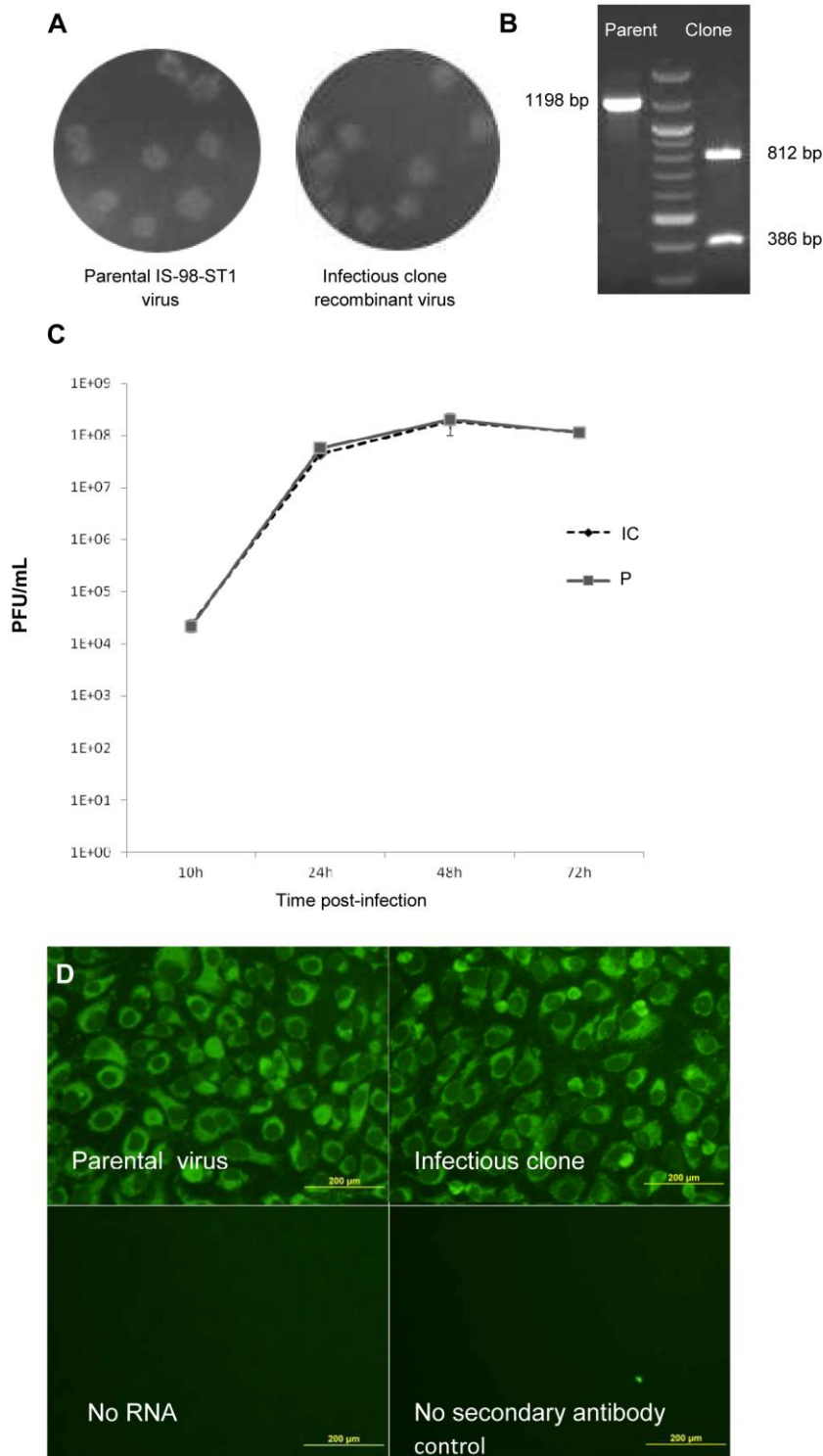


Figure 2: *in vitro* validation of the biological properties of the IC virus. (a) Plaque morphology of parental and IC-derived WNV on Vero cells. Vero cells in six-well plates were infected with 100 PFU of parental or recombinant virus. Plaques were visualized 3 days post-infection by staining with crystal violet. Data shown are representative of two independent experiments. (b) *SnaBI* digestion profile of the 1198 bp RT-PCR (5743F-6941R) fragment amplified from parental or IC-derived WNV stocks. (Quick Load 1kb DNA Ladder, New England Biolabs). (c) Growth kinetics of parental (P) and infectious clone (IC) viruses in Vero cells at an MOI of 1. At the indicated time post-infection, culture supernatants were collected and viral titers were determined by plaque assay on Vero cells. Error bars represent the standard deviation of triplicates. (d) Immunofluorescence with anti-NS1 antibodies on Vero cells infected at an MOI of 1 with either the parental or IC-derived WNV 3 days post-infection. Data shown are representative of two independent experiments.

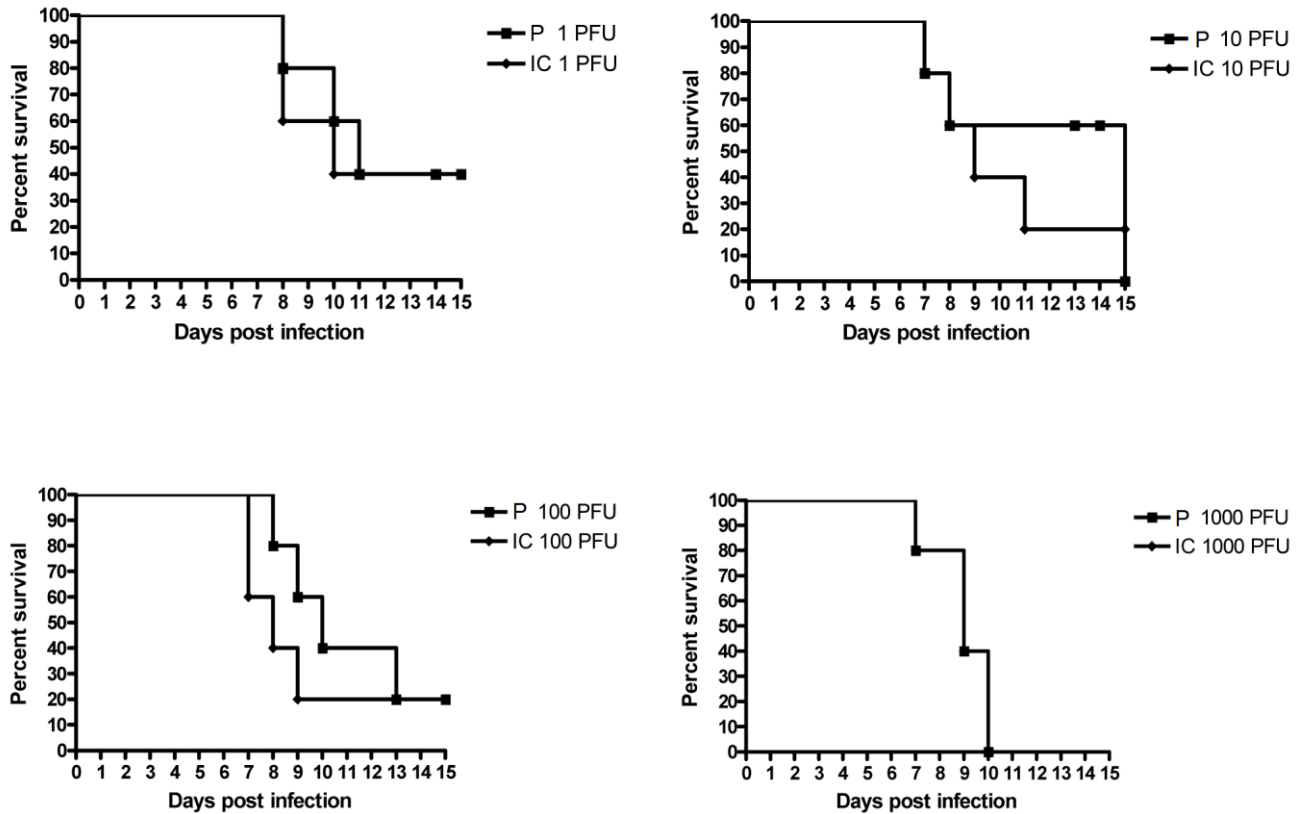


Figure 3: *in vivo* validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, survival curves. Groups of 5 adult female BALB/c outbred mice were injected i.p with 1, 10, 100, 1000 PFU of parental (P) or recombinant (IC) IS-98-ST1 virus. Mice were monitored for 15 days post-infection. Data shown are representative of two independent experiments.

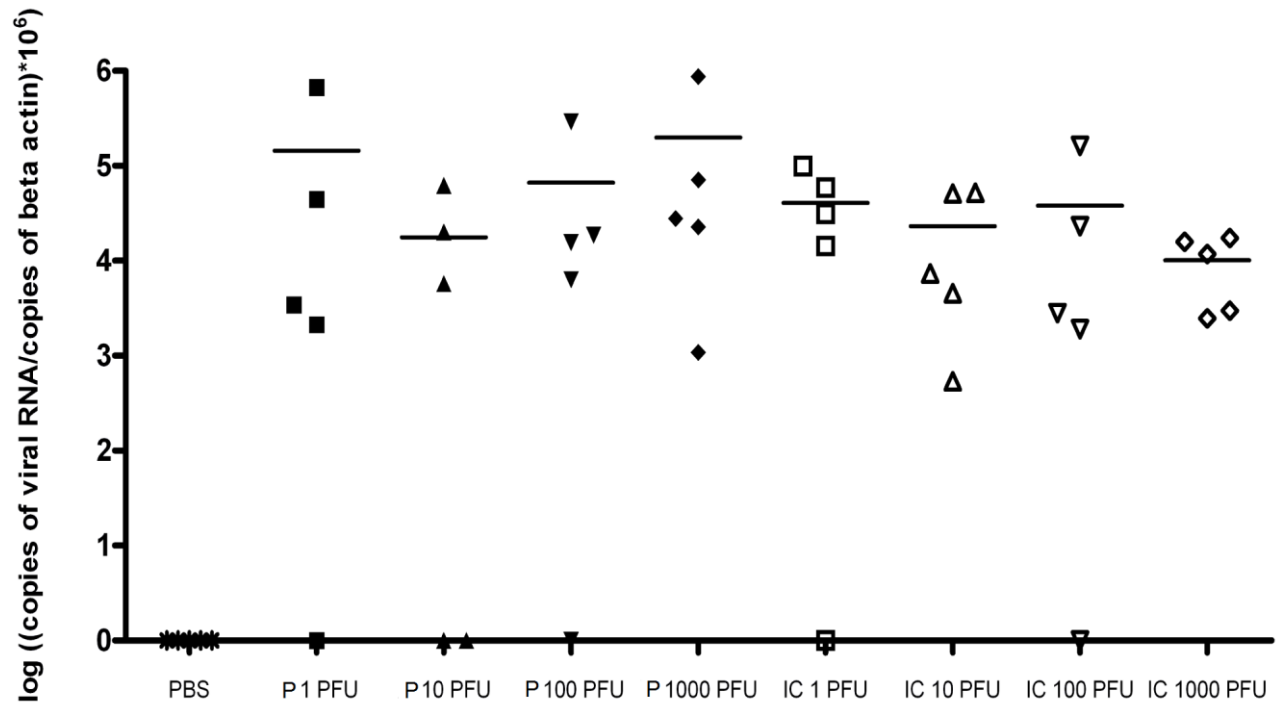


Figure 4: *in vivo* validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, viremia. Viral RNA copy number in blood of BALB/c outbred female mice (n=5) injected i.p with 1, 10, 100, 1000 PFU of parental (P) or recombinant (IC) IS-98-ST1 virus, 3 days post-infection. Quantification was performed in duplicate.

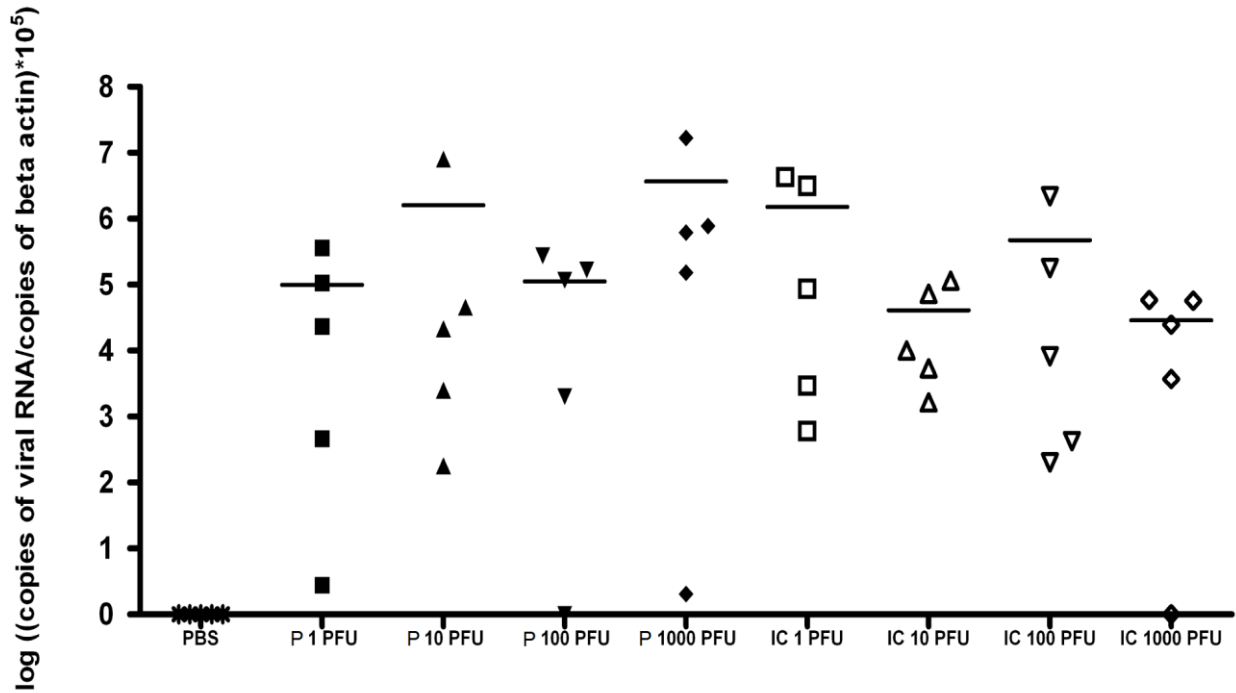


Figure 5: *in vivo* validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, viral load. Viral RNA copy number in brains of BALB/c outbred female mice (n=5) injected i.p with 1, 10, 100, 1000 PFU of parental (P) or recombinant (IC) IS-98-ST1 virus. Quantification was performed in duplicate.

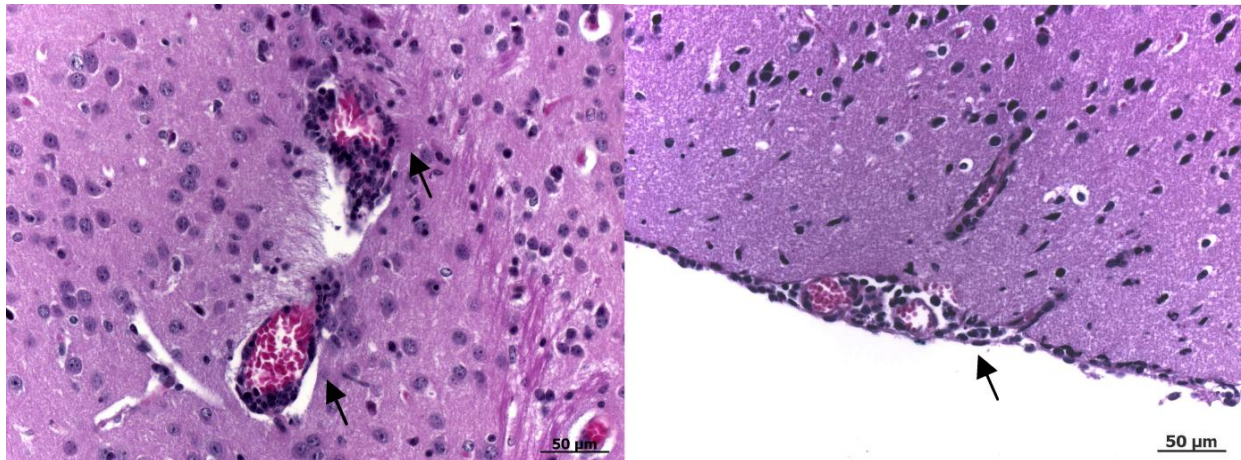
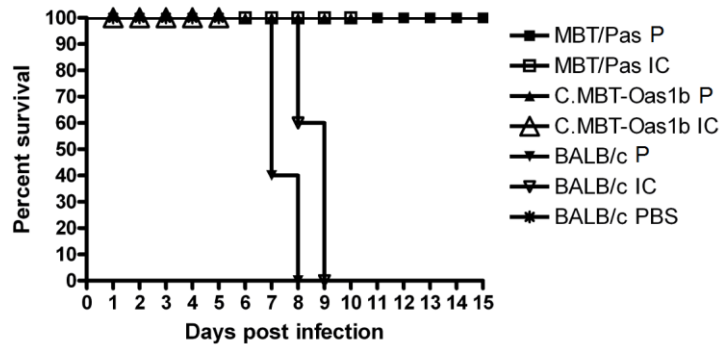


Figure 6: *in vivo* validation of the biological properties of the IC virus in susceptible mice, histology. Histology performed on mouse brain 7 days p.i revealed inflammatory lesions in the meninges characterized by diffuse lymphocytic or lymphoplasmocytic infiltrates, characteristic of lymphocytic meningitis (right panel, arrows). Lymphocytic perivascular cuffs were also visible in the brain parenchyma, indicative of encephalitis (left panel, arrows). These lesions were observed in two of four animals or in one mouse for the infectious clone and the Israeli strain, respectively. Tissue sections were stained with hematoxylin, eosin and saffron.

A



B

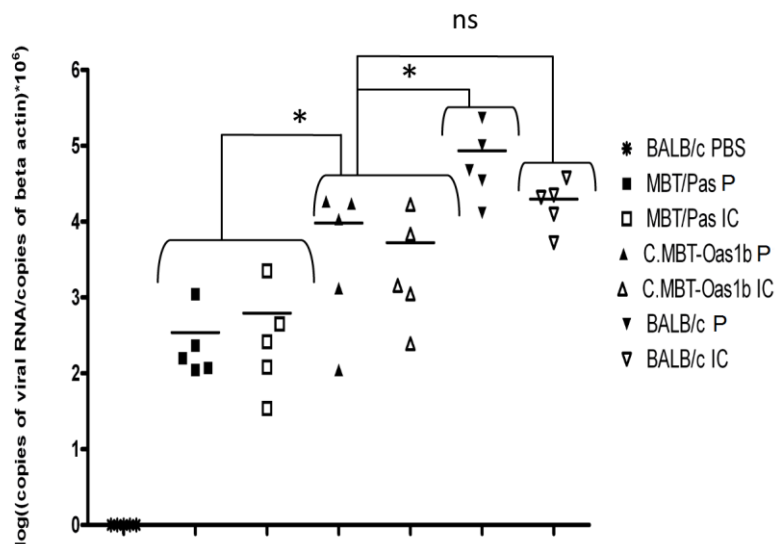


Figure 7: *in vivo* validation of the biological properties of the IC virus in resistant mice. Groups of 5 adult female or male outbred MBT/Pas, congenic C.MBT-Oas1b or BALB/c mice were injected i.p. with 1000 PFU of parental (P) or recombinant (IC) IS-98-ST1 virus. The mice were monitored for 15 days p.i. (a) Survival curves and (b) viral RNA copy number in blood of mice 3 days p.i. * shows significant differences between groups. ns: not significant.

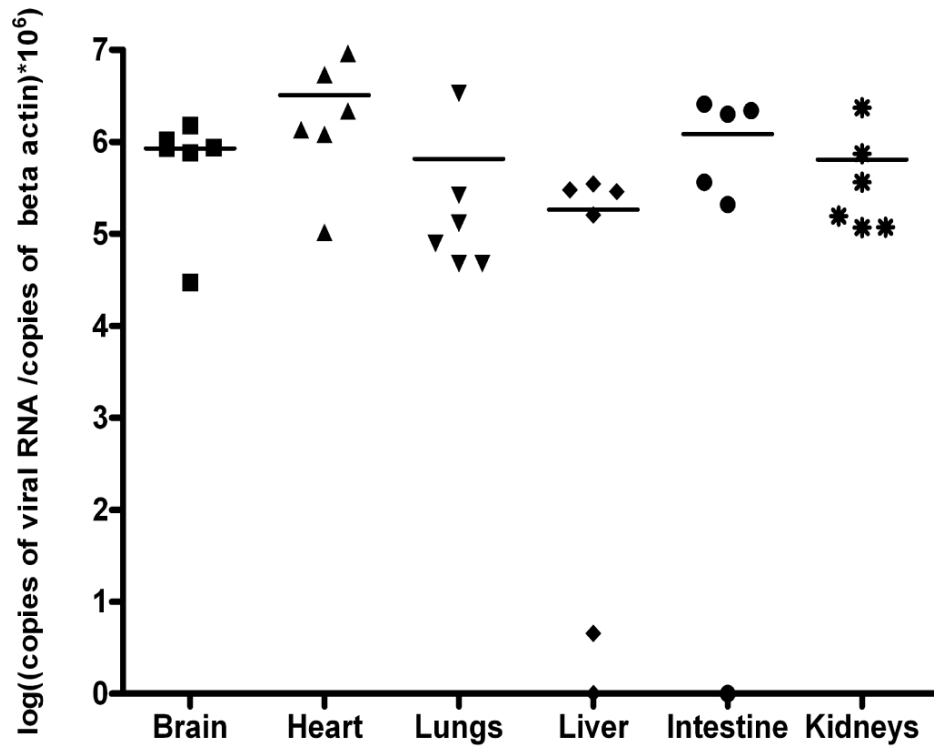
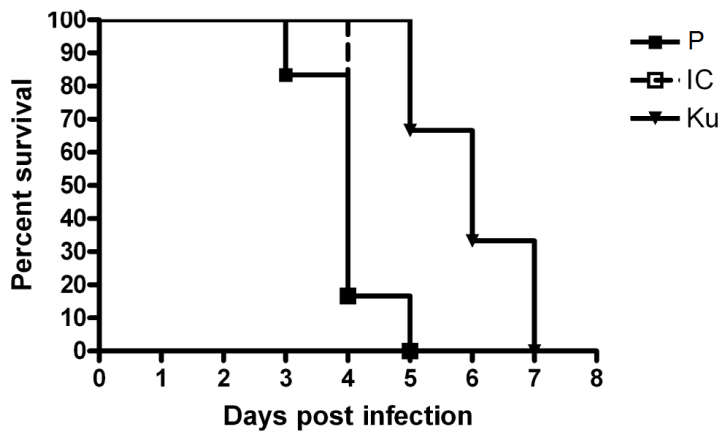


Figure 8: **Viral load in different organs of chicken embryo infected with IS-98-ST1 WNV.** Groups of 6 ten-day-old pathogen-free chicken eggs were infected with 1 PFU of IS-98-ST1 parental virus via the intra-vascular route. Viral load in different organs was quantified by quantitative RT-PCR. PBS controls were negative for all organs.

A



B

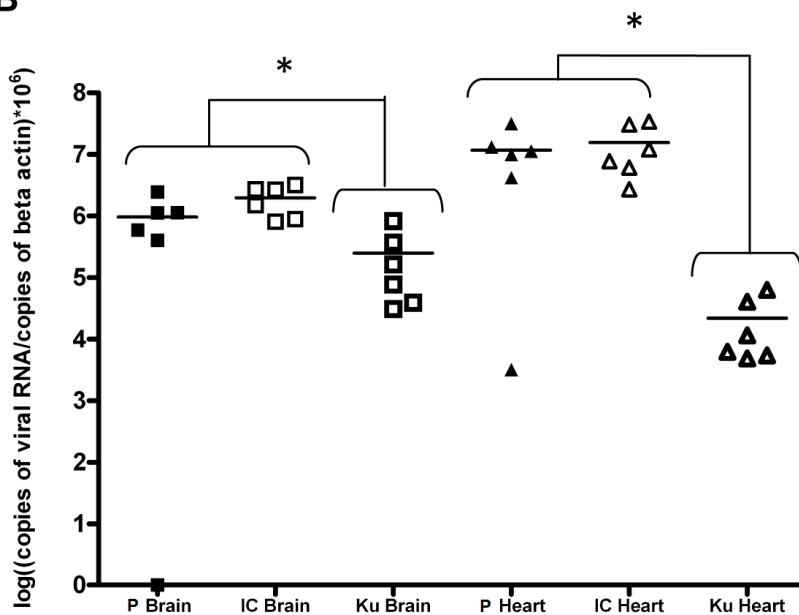
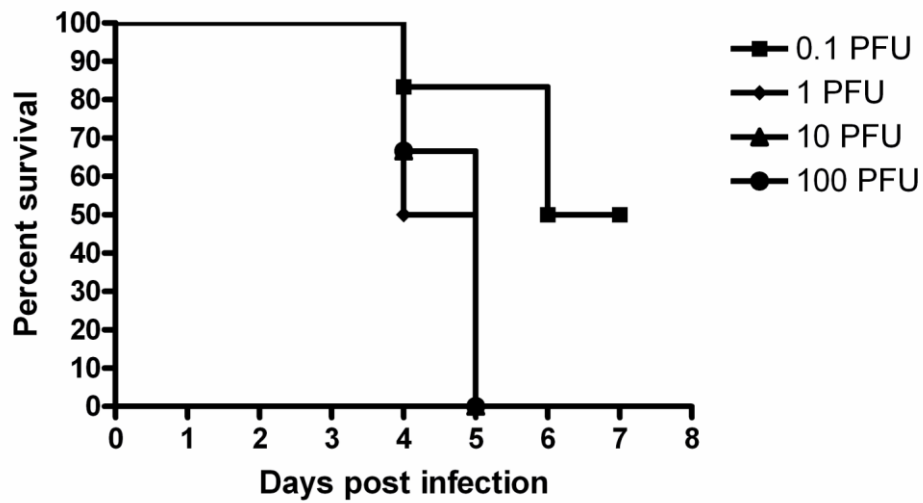


Figure 9: *in vivo* validation of the biological properties of the IC virus in chicken embryo. Groups of 6 ten-day-old pathogen-free chicken eggs were infected with 1 PFU of either parental (P) or recombinant (IC) IS-98-ST1 or Kunjin (Ku) virus by the intra-vascular route. (a) Survival curves and (b) viral RNA load in brains and hearts at day 4 p.i, quantified by quantitative RT-PCR, are shown. PBS controls were negative for all organs. Data are representative of two independent experiments, except RNA quantification at day 4 p.i for Kunjin, which was performed once. * shows significant differences between groups.



Supplementary data: Survival curves of chicken embryos infected with parental IS-98-ST1 virus. Groups of 6 ten-day-old pathogen-free chicken eggs were infected with 0.1, 1, 10 or 100 PFU of parental IS-98-ST1 virus. Eggs were monitored for 7 days post-infection.

3-Discussion et conclusion

Nous avons vu que la stabilité des clones infectieux de flavivirus pose un vrai problème (Seregin *et al.*, 2006 ; Beasley *et al.*, 2005 ; Shi *et al.*, 2002a; Yamshchikov *et al.*, 2001a). Nous avons rencontré de multiples difficultés lors de l'insertion des différents fragments génomiques liées principalement à la reconstitution du cadre de lecture de la protéine NS1, lors de l'insertion du fragment 2 en 3' du fragment 1. D'autres auteurs ont fait état de problèmes de toxicité de NS1 en système procaryote (Beasley *et al.*, 2005; Audsley *et al.*, 2011). Dans notre cas, de nombreux réarrangements génomiques dont des délétions de fragments de 4 à 100 nucléotides ont été observés dans NS1. Une construction viable et stable n'a pu être obtenue que lorsqu'*a minima* une substitution G→A sur le nucléotide 3401 est apparue, aboutissant au remplacement d'un tryptophane par un codon stop. Cette mutation est située dans la partie C-terminale de NS1, en amont de la région de décalage ribosomique observée par Melian *et al.* (2010) à l'origine de l'expression de NS1'. Malgré la présence d'un codon stop, des particules virales ont été obtenues à partir des transcrits sur lesquels le triplet stop est toujours présent. Ces particules possèdent le marqueur génétique du clone infectieux (le site de restriction *SnaBI*), indiquant qu'elles sont bien issues des transcrits obtenus *in vitro*. La séquence génomique des virions recombinants a été vérifiée ainsi que la séquence des transcrits. Les transcrits possèdent la mutation stop. Les virions ont, quant à eux, retrouvés la séquence initiale. Ce même phénomène a été observé par Kinney *et al.* (2006) lors de la construction d'un clone infectieux de la souche NY99. Une mutation C3342A aboutissant à la substitution d'une cystéine par un codon stop a été observée et de façon similaire à ce que nous avons observé ; de plus, une réversion est constatée sur le génome des virions recombinants. Kinney et son équipe a suggéré qu'une erreur de la T7 polymérase est à l'origine du remplacement du nucléotide. Cependant, ce phénomène a été observé à quatre reprises par Kinney *et al.* et à deux reprises dans notre cas, avec des polymérases différentes.

Les particules virales recombinantes peuvent être issues d'un événement de recombinaison avec des particules sauvages. Pour infirmer une telle hypothèse, nous avons transfecté des cellules Vero avec un transcrit tronqué au niveau de NS5. Aucune particule virale n'a été obtenue. Les virions recombinants sont donc bien issus des transcrits obtenus *in vitro* à partir du plasmide clone infectieux. Ensuite, nous pouvons nous demander si NS5 joue un rôle dans la correction de cette erreur génomique. Ce point sera à confirmer en apportant NS5 par co-transfection, si des particules virales sont obtenues.

La question qui se pose alors est de savoir comment NS5 est traduite alors qu'un codon stop est situé en amont. Une explication au phénomène de lecture du transcrit pourrait se trouver dans la possibilité de lecture des codons stop (stop codon readthrough). Ce phénomène a été décrit pour des génomes viraux, et en particulier pour les virus à ARN infectant les eucaryotes (Jungreis *et al.*, 2011; Firth *et al.*, 2011; Firth and Brierley, 2012). D'après Firth *et al.* (2011), la présence de structures secondaires en 3' du codon stop augmente la possibilité de "readthrough" d'un facteur 10. Or, Melian *et al.* (2010) décrivent des structures secondaires à 150 nucléotides en 3' du codon stop que nous avons observé sur nos transcrits. En plus de ces structures secondaires, Firth et Brierley (2012) décrivent d'autres motifs, tels qu'un octanucléotide riche en purine, ce qui est le cas ici avec 75% de purines dans la séquence de 8 nucléotides en 3' du codon stop (TGG TGC AG), codon stop qui est préférentiellement un UAG, comme c'est le cas ici. De plus, une complémentation entre des éléments distants et proximaux en 3' est requise pour un « readthrough » efficace chez les luteovirus et les polerovirus (Firth et Brieley, 2012). Ce mécanisme pourrait expliquer la réversion rapide observée sur les virions.

Les propriétés biologiques des virions recombinants ont été vérifiées à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les capacités répliquatives des particules recombinantes sont comparables à celles des particules sauvages, ainsi que l'aspect des plages de lyses en cellule Vero. De même, sur souris sensibles et résistantes à l'infection, les mêmes résultats sont obtenus que ce soit en termes de mortalité que de virémie et de charge virale dans le cerveau.

Les oiseaux représentent le réservoir principal du virus West Nile. Des études ont montré que les corbeaux américains et les embryons de poulet sont sensibles à l'infection (Kinney *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2009). Nous avons souhaité évaluer le modèle œuf embryonné dans sa capacité à discriminer des souches virulentes de souches atténuées afin d'avoir à disposition au laboratoire, un modèle d'études aviaire. La souche Kunjin a servi de témoin peu pathogène (Hall *et al.*, 2001). Les tableaux de mortalité se sont révélés différents entre la souche IS-98-ST1 et Kunjin, avec un pic à jour 4 post infection pour IS-98-ST1 et un étalement des mortalités entre J4 et J7 pour Kunjin. En termes de charge virale, des différences significatives ont été mesurées sur les encéphales et les cœurs prélevés à J4 p.i.

Le modèle œuf embryonné représente un environnement aviaire dont le système immunitaire est immature, mais qui présente un système de défense cellulaire, permettant ainsi d'évaluer l'impact du virus hors de l'action du système immunitaire adaptatif de l'hôte. Dans ce modèle, le virus recombinant se comporte de la même façon que le virus sauvage. Une présentation plus détaillée des résultats obtenus sur ce modèle est développée dans le chapitre 4.

Nous avons construit un clone infectieux dérivé de la souche hautement pathogène, IS-98-ST1, et nous avons obtenus des particules virales recombinantes ayant les mêmes propriétés que le virus sauvage. Ainsi, cette construction pourra être utilisée pour étudier les déterminants moléculaires de la virulence, en particulier dans un contexte européen.

Or, des résultats contradictoires ont été observés dans le contexte nord-américain et européen. En effet, Brault *et al.* (2007) ont identifié une mutation dans NS3, T249P, qui joue un rôle important dans la virulence de la souche NY99 chez le corbeau américain. Or, une équipe espagnole, Sotelo *et al.* (2009), a montré que cette même mutation était présente sur une souche espagnole bien moins virulente que la souche NY99 chez la souris.

Il est important d'avoir à disposition un clone infectieux IS-98-ST1 afin d'étudier les mutations ou fragments génomiques d'importance, dans un contexte européen soumis à une augmentation ces dernières années du nombre d'épidémies comportant de nombreux cas équins, ou humains, ou encore aviaires, comme en Italie (Calistri *et al.*, 2010), en Grèce (Papa *et al.*, 2010) et en Hongrie (Bakonyi *et al.*, 2006) respectivement.

Chapitre 4 : Evaluation de nouveaux modèles d'étude de la virulence du VWN

L'intérêt du clone infectieux, souche IS-98-ST1, ayant été démontré, nous avons pu nous consacrer à l'évaluation de modèles d'étude *in vivo* et *in vitro* de la virulence du VWN. Ces modèles nous permettront d'évaluer l'impact des modifications génomiques apportées au clone infectieux. Deux modèles sont proposés ici : les œufs embryonnés de poulet et les neuroblastomes humains, les SK-N-SH. L'objectif est de pouvoir caractériser la virulence du VWN en l'absence de la réaction du système immunitaire (réponse cellulaire) de l'hôte, dans un environnement aviaire ou humain.

1 Le modèle œuf embryonné de poulet

1-1 Matériel et méthodes

1-1-1 Cellules et virus

Les cellules Vero étaient entretenues en Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco) avec 5 % de sérum de veau (Lonza), 1 mM de sodium pyruvate et 1U/ml de pénicilline et 1µg/ml de streptomycine (Invitrogen). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

L'obtention de la souche IS-98-ST1 a été décrite par Malkinson *et al.* (2002). Brièvement, la souche IS-98-ST1 a été isolée du cerveau d'une cigogne en Israël en 1998, et passée sur cellules Vero. Les particules virales issues de cette culture ont ensuite été utilisées pour infecter des cellules d'insecte, AP61. Un stock viral amplifié sur cellules Vero, à partir du troisième passage sur AP61, a été utilisé dans la suite du travail.

Les souches Kunjin (KUN) et Camargue 2000 proviennent du Centre National de référence pour les Arbovirus de l'Institut Pasteur de Paris. La souche Maroc 2003 provient de Biopharma, Rabat, Maroc (M. El Harrak).

1-1-2 Les œufs

Des œufs de poulet indemnes de pathogènes (INRA, Jouy-en-Josas, France) ont été inoculés par la voie intraveineuse à 10 jours. Les œufs ont été inoculés soit avec du diluant seul (PBS, sans endotoxines, pH 7.4, supplémenté avec 1U/ml de pénicilline et 1µg/ml de streptomycine) soit avec du virus. Les œufs sont ensuite incubés à 37°C et observés quotidiennement jusqu'à 8 jours p.i. Les ARN viraux ont été recherchés dans le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, les intestins et les reins, par RT-PCR quantitative comme décrit ci-dessous, suite à une extraction avec le kit RNeasy (Qiagen).

1-1-3 La RT-PCR quantitative

Les ARN ont été rétro-transcrits et amplifiés en utilisant les conditions décrites par Linke *et al.* (2007), et en utilisant le kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Applied Biosystems). Les amorces utilisées sont WNproC-10F 5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3'/WNproC-153R 5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3' situées dans la région 5' non codante de l'ADNc viral et les amorces ACTB-966F 5'CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC-3'/ACTB-1096R 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3' pour l'amplification des ARN cellulaires (Toussaint *et al.*, 2007). Les sondes correspondantes sont respectivement WNproC 5'-FAM-CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT-TAMRA-3' et ACTB1042-67 5'-VIC-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMRA-3'. Les concentrations des amorces et des sondes étaient respectivement de 0.4 et 0.2µM. Les mélanges réactionnels étaient de 20 µl auxquels 5 µl d'ARN étaient ajoutés. Tous les échantillons ont été analysés en double. L'appareil utilisé pour les amplifications était le AB 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) avec le programme suivant : 45°C, 10 min (Retro-Transcription), 95°C, 10 min (activation de la Taq polymérase), et 40 cycles de 15s à 95°C et 1 min à 60°C (amplification).

Les quantifications ont été faites en se basant sur des standards d'ARN viraux et de β -actine. Les ARN viraux proviennent de cultures virales sur cellules Vero ou de transcrits *in vitro*, et les ARN de β -actine nous ont été fournis par le laboratoire de référence français pour la Fièvre Aphteuse (ANSES, Maisons-Alfort).

1-1-4 Analyse statistique

Le test Mann-Whitney a été utilisé pour évaluer les différences entre courbes de survie. Les tests t par paire et One-way ANOVA ont servi à mesurer les différences significatives de charges virales (utilisation du logiciel GraphPad Prism, version 4).

1-2 Résultats

1-2-1 Détermination de la dose létale 50

Afin de tester la sensibilité des embryons de poulet à l'infection à VWN, des groupes de 6 œufs ont été inoculés en intraveineuse avec des doses de 0.1, 1, 10 ou 100 PFU de la souche parentale IS-98-ST1. La mortalité des œufs a été suivie pendant 7 jours (voir tableau 2).

Dose (PFU)	Nombre d'œufs inoculés	Suivi quotidien							Nombre de survivants à J+7
		J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	
0,1	6	1	-	1	1	-	1	-	2
1	6	-	-	-	3	3	-	-	0
10	6	-	-	-	2	4	-	-	0
100	6	-	-	-	2	4	-	-	0
PBS	6	-	-	-	-	-	-	-	6

Tableau 2: Suivi sur 7 jours de la mortalité d'œufs embryonnés de 10 jours, infectés avec des doses croissantes de VWN, souche IS-98-ST1.

Ces résultats préliminaires montrent qu'à partir de 1 PFU la mortalité est de 100% entre J4 et J5 p.i. A 0.1 PFU, les œufs morts à J1 et J3 p.i avaient été contaminés par une bactérie (œufs malodorants) lors de l'injection, et à J7 il restait deux œufs vivants : la DL50 est donc établie à 0,1 PFU. Il a été décidé de poursuivre les infections à des doses de 1 PFU, soit 10DL₅₀.

1-2-2 Evaluation de la mortalité suite à l'infection avec différentes souches

Ce qui nous intéressait dans un premier temps, était de savoir si des souches réputées de virulence différente sur le terrain induisaient des profils de mortalité différents. Nous avons infectés des groupes de 6 œufs avec 1 PFU de virus, dont les souches de lignage 1 suivantes :

- IS-98-ST1 (1a): origine Moyen-Orient, infections neurologiques sévères (Lucas *et al.*, 2004).
- Kunjin, isolat 35911 (1b): origine Australie, peu virulent (Hall *et al.*, 2001)
- Maroc 2003 (1a): origine Afrique, infections neurologiques modérées (Figuerola *et al.*, 2009 ; Schuffenecker *et al.*, 2005)
- Camargue 2000 (1a): origine Europe, infections neurologiques modérées (Murgue *et al.*, 2001)

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant (tableau 3):

Souche	Suivi quotidien							Nombre de survivants à J+7
	J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	
IS-98-ST1	-	-	-	5	1	-	-	0
Kunjin	-	-	-	1	3	1	1	0
Maroc 2003	-	-	1	5	-	-	-	0
Camargue 2000	-	-	2	2	2	-	-	0
PBS	-	-	-	-	-	-	-	6

Tableau 3: Suivi de la mortalité de groupes de 6 œufs de 10 jours inoculés avec 1 PFU de virus.

Les souches réputées hautement ou modérément pathogènes présentent des profils de mortalités similaires avec des morts massives à J4 et J5. Kunjin présente un profil particulier avec un étalement des mortalités entre J4 et J7.

1-2-3 Quantification des charges virales dans les organes

Le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, les intestins et les reins sont des organes cibles du VWN chez l'oiseau (Senne *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 2000, Sotelo *et al.*, 2011). Nous avons donc recherché la présence du virus dans ces organes chez l'embryon de poulet infecté avec la souche IS-98-ST1 (figure 26).

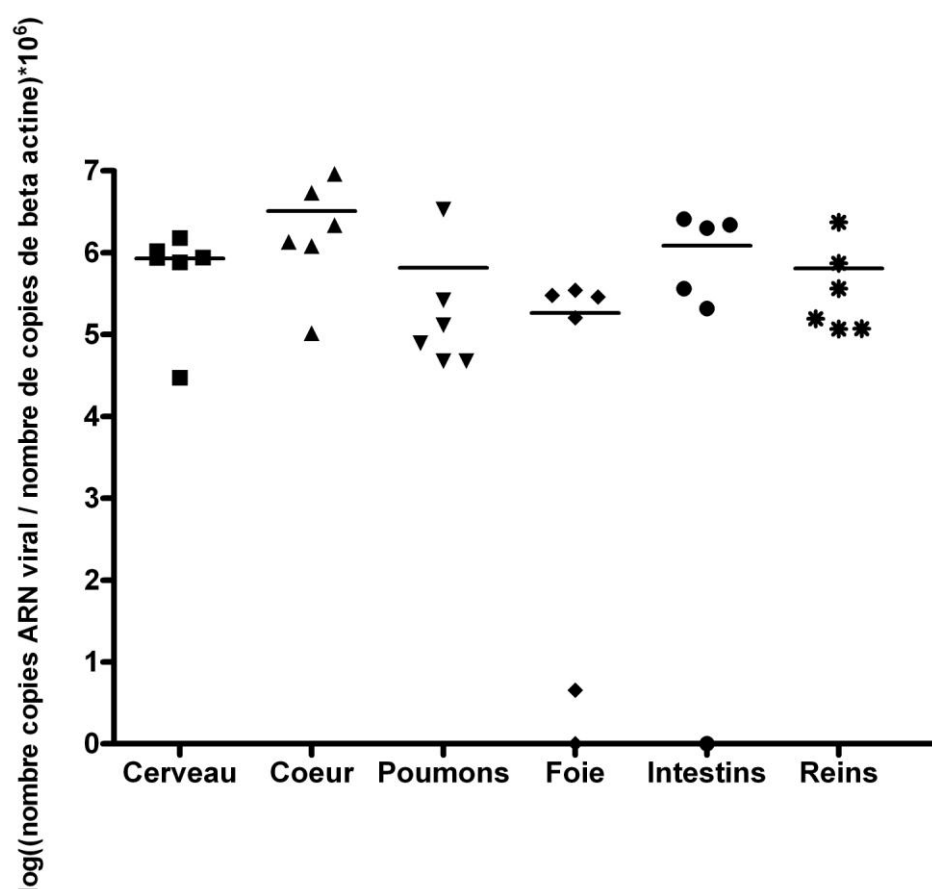


Figure 26: **Charge virale dans les organes d'œufs embryonnés de poulet infectés par le VWN à J4 p.i.** Des groupes de 6 œufs embryonnés de poulet âgés de 10 jours au moment de l'infection, ont été injectés avec 1 PFU de la souche IS-98-ST1 via la voie intra-vasculaire. Les charges virales dans les différents organes ont été quantifiées par RT-PCR quantitative. Les contrôles injectés avec du PBS avaient des charges virales nulles pour tous les organes. Cette expérience a été répétée deux fois. Le test One-way ANOVA a été utilisé pour mesurer les différences entre les différents groupes. Il n'y a pas de différences significatives entre les charges virales dans les différents organes testés.

L'analyse statistique a permis de conclure qu'il n'y avait pas de différence significative entre les charges d'ARN des différents organes. Par la suite nous avons focalisé notre attention sur le cerveau et le cœur ; le cerveau, car nous nous intéressons à la neurovirulence du VWN et le cœur, car c'est un organe facile à prélever et contenant beaucoup de copies d'ARN viral.

1-2-4 Charges virales dans les cerveaux et cœurs des œufs infectés par les différentes souches testées

Les organes ont été prélevés à J4 p.i pour tous les virus testés afin de s'assurer de la présence d'ARN viraux et avoir des données comparables entre chaque souche (figure 27).

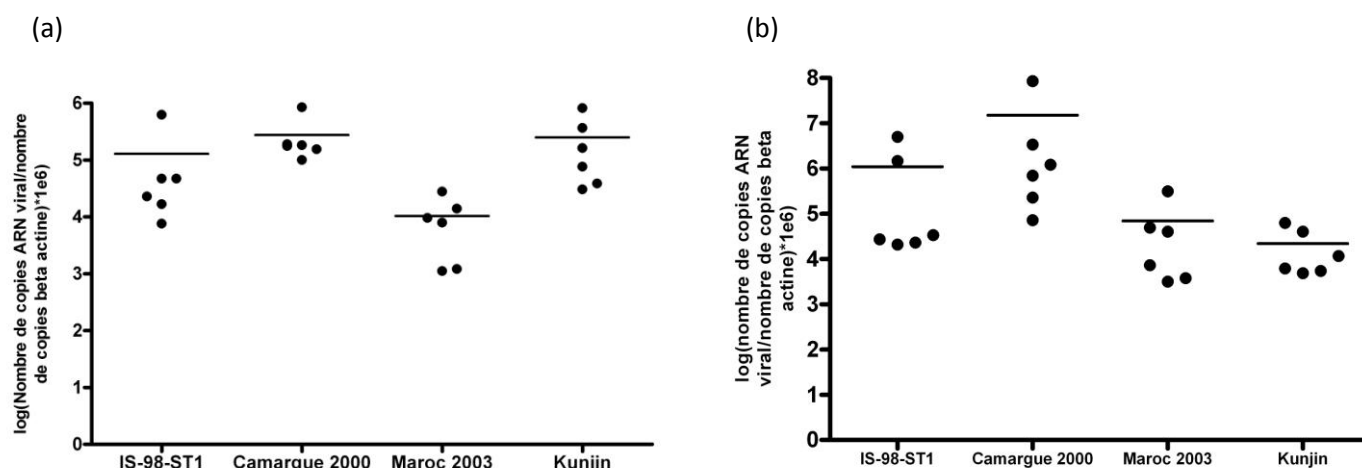


Figure 27: **Charges virales dans le cerveau ou le cœur d'œufs embryonnés infectés par différentes souches de VWN à J4 p.i.** Des groupes de 6 œufs embryonnés de poulet âgés de 10 jours au moment de l'infection, ont été injectés avec 1 PFU de VWN via la voie intravasculaire. Les charges virales ont été mesurées sur des organes : (a) cerveau (b) cœur prélevés à J4 p.i. Les ARN ont été quantifiés par RT-PCR quantitative. Les contrôles injectés avec du PBS avaient des charges virales nulles pour tous les organes. Le test One-way ANOVA a été utilisé pour mesurer les différences entre les différents groupes. Il n'y a pas de différences significatives entre les charges virales entre les différentes souches testées.

Sur les prélèvements de cerveaux, il existe une différence significative entre les charges virales des embryons infectés entre Camargue 2000 et IS-98-ST1, Camargue 2000 et Maroc 2003, avec des charges virales significativement plus faibles pour Maroc 2003 et IS-98-ST1; sur les cœurs entre Camargue 2000 et Maroc 2003, et entre Camargue 2000 et Kunjin, avec des charges virales significativement plus faibles pour Maroc 2003 et Kunjin. Ces données suggèrent une multiplication plus faible des souches Maroc 2003 et Kunjin.

Cependant, ces données sont issues d'une seule expérimentation et d'autres valeurs seront nécessaires pour tirer des conclusions définitives.

1-2-5 Observation anatomo-pathologiques

Quelque soit la souche de VWN, les lésions macroscopiques observées étaient les mêmes au moment de la mort (figure 28) :

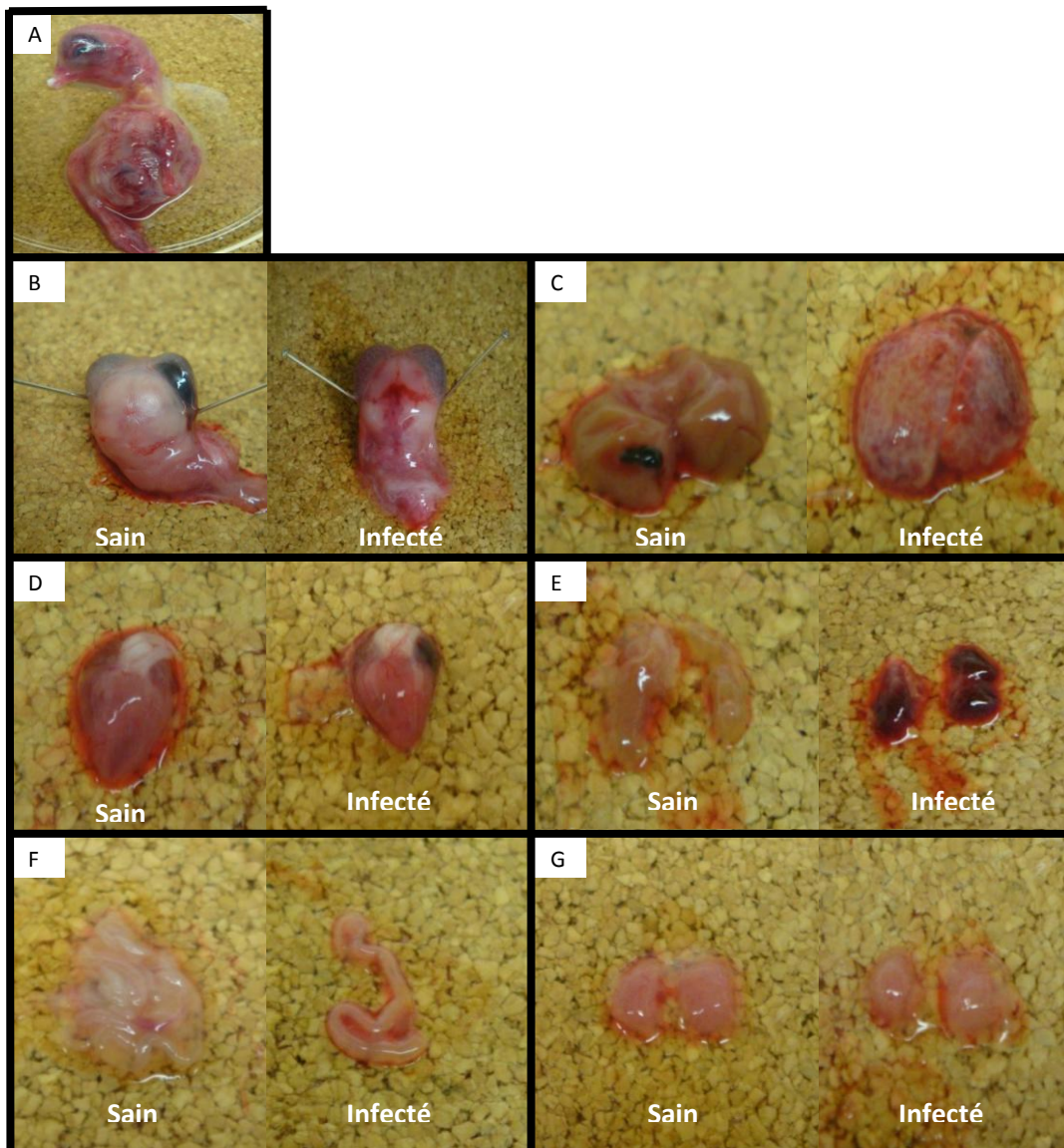


Figure 28: **Lésions macroscopiques observées sur des embryons de poulet à J4 post infection.** Infection avec 1 PFU de la souche IS-98-ST1 sur des œufs âgés de 10 jours. Pour toutes les photos, à gauche, individu sain, à droite, individu infecté. (a) individu présentant des pétéchies sur l'épiderme (b) cerveau (c) foie (d) cœur (e) reins (f) intestins (g) poumons.

Le cerveau, le cœur et les reins apparaissent hémorragiques, le foie a la particularité de présenter un aspect tacheté. En revanche les intestins et les poumons ne présentent pas de lésions visibles à l'œil nu. Ces observations ne sont pas en corrélation directe avec la charge virale, vu que les poumons et les reins ne sont pas les organes ayant la charge virale la plus faible (voir section 2-3 de ce chapitre).

1-3 Conclusion et discussion

Le système œuf embryonné de poulet s'est révélé être un bon amplificateur du VWN quelque soit la souche, parmi celles qui ont été évaluées. En revanche, au vu de ces résultats préliminaires, il n'est pas possible de déterminer avec certitude si ce système permet d'évaluer le niveau de virulence d'une souche. Lors de la validation du clone infectieux, des différences significatives de charges virales dans les cerveaux et les cœurs ont été mesurées entre le virus recombinant IS-98-ST1 et la souche Kunjin (voir chapitre 3), ce qui n'est pas le cas pour les charges virales dans le cerveau dans les résultats de comparaison de virulence présentés dans ce chapitre, à conditions expérimentales équivalentes.

Sur le terrain, les souches Camargue 2000 et Maroc 2003 sont réputées moins virulentes que la souche IS-98-ST1. La virulence est communément définie en fonction du nombre de cas et de la nature des espèces touchées par l'épidémie. IS-98-ST1 est à l'origine des premiers cas de mortalité aviaire. La souche a été isolée du cerveau d'une cigogne (Lucas *et al.*, 2004), et a été identifiée sur des cigognes et des oies domestiques moribondes (Zeller et Schuffenecker, 2004). Elle a été responsable de cas humains : entre août et octobre 2000, 417 cas humains ont été diagnostiqués dont 326 hospitalisations (Chowers *et al.*, 2001). Les principaux signes cliniques rencontrés étaient des encéphalites (57,9%), des syndromes pseudo-grippaux (24,4%) et des méningites (15,9%). Sur les 326 patients hospitalisés, 33 sont morts. 18 cas équins ont aussi été rapportés sur des chevaux présentant des troubles neurologiques (Steinman *et al.*, 2002).

Les souches IS-98-ST1, Israël 2000 et NY99 sont presque identiques sur le plan génétique (Lanciotti *et al.*, 1999 ; Charrel *et al.*, 2003). La souche Camargue 2000 a été à l'origine de 76 cas de chevaux atteints de troubles neurologiques (Murgue *et al.*, 2001). Aucun cas humain ni aviaire n'a été rapporté. La souche Maroc 2003 a été à l'origine de 5 cas équins fatals parmi 9 chevaux symptomatiques (Figuerola *et al.*, 2009 ; Schuffenecker *et al.*, 2005). La souche Kunjin, quant à elle, est réputée avirulente du fait que seulement 18 cas humains non fatals ont été notifiés en 50 ans avec cette souche (Hall *et al.*, 2001; Daffis *et al.*, 2011).

Les résultats expérimentaux d'infection avec les œufs embryonnés, en l'état actuel, ne reflètent pas une gradation de la virulence comparable à celle observée sur le terrain. Cependant, les résultats observés sur les charges virales dans les cœurs, montrent une différence entre une souche relativement pathogène, Camargue 2000 et les deux souches moins pathogènes, Maroc 2003 et Kunjin. Reste à savoir si en multipliant les résultats, une différence significative entre IS-98-ST1 et Maroc 2003/Kunjin pourrait être observée.

Un des axes d'amélioration pourrait être de mesurer les charges virales à J3 p.i avant le début de la mort des œufs. Au moment de la mort, il semble que les charges virales soient maximales. En effet, le nombre de copies d'ARN viral a été mesuré sur des œufs infectés avec Kunjin au fur et à mesure de la mort des œufs, et une quantité d'ARN plus importante a pu être mesurée sur les œufs morts comparativement à celle quantifiée à J4 p.i sur les œufs vivants sacrifiés.

Il serait aussi intéressant de voir si des différences sont observées en faisant varier l'âge de l'embryon au moment de l'infection, et aussi mesurer l'évolution des niveaux d'expression des IFN et des cytokines dans le cerveau et le cœur vu que le système immunitaire de l'embryon évolue durant le développement (Jacobsen *et al.*, 2010). Aussi, il faudrait confirmer les profils de mortalité, et voir si le cas présenté se confirme, c'est-à-dire une discrimination souche pathogène/souche avirulente en fonction de la mortalité à J4/J5 p.i contre un profil J5/J7 (Kunjin).

2- Le modèle neuroblastome humain

2-1 Matériel et méthodes

2-1-1 Cellules et virus

Les cellules SK-N-SH proviennent de l'équipe du Dr Préhaud, à l'Institut Pasteur de Paris. Brièvement, ce sont des neuroblastomes humains issus de l'American Tissue Culture Collection (ATCC) N° HTB-11. Les cellules SK-N-SH étaient entretenues en Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco) avec 10 % de sérum de veau (Lonza), 1 mM de sodium pyruvate et 1U/ml de pénicilline et 1µg/ml de streptomycine (Invitrogen). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les souches virales utilisées sont IS-98-ST1 et Kunjin, décrites au paragraphe 1 de la partie1.

2-1-2 Les infections

Les cellules à 90% de confluence en plaques 12 puits ont été infectées avec le virus souche IS-98-ST1 ou Kunjin dilué en D-MEM à des MOI de 0.01, 0.1, 1, ou 10, à raison de 5 réplicats. Brièvement, le virus a été laissé en contact avec les cellules pendant 1h30 min, suivi de deux lavages en D-MEM pour enlever les particules non adsorbées. Les cellules ont ensuite été recouvertes de 1 ml de milieu complet. Les plaques ont été incubées 3 jours à 37°C et 5% de CO₂. A 0, 24h, 48h et 72h, une fraction du surnageant a été prélevée et conservée à -80°C en attendant l'extraction des ARN. Les ARN ont été extraits avec le kit QIAamp Viral (Qiagen), en suivant les recommandations du fabricant.

2-1-3 La RT-PCR quantitative

Le même protocole a été utilisé que pour la partie 1 en ciblant la région 3'NC (PCR ProC) seule.

2-2 Résultats

Des cinétiques de multiplication virale ont été menées avec la souche hautement pathogène, IS-98-ST1, et avec la souche réputée avirulente, Kunjin, afin de déterminer si une discrimination entre les deux souches était mesurable sur cellules SK-N-SH. La réplication virale a été mesurée en quantifiant les ARN viraux dans les surnageants des cultures infectées à 0, 24h, 48h et 72h post-infection, par RT-PCR. Les profils des cinétiques obtenus avec des infections à des MOI de 0.01, 0.1, 1 et 10 (figure 29), montrent une augmentation du nombre de copies d'ARN viral dans les surnageants, dépendante de la MOI, et avec un pic à 48h. Pour une MOI de 10, le nombre de copies d'ARN de la souche Kunjin stagne de 24h à 48h, alors que le nombre de copies d'ARN de la souche IS-98-ST1 continue de progresser sur cette période. La quantité d'ARN Kunjin atteint un maximum de 7×10^8 copies/ml à la MOI de 10, quantité que cette souche ne semble pas pouvoir dépasser. L'écart le plus important entre les deux souches est mesurable à 48h pour une MOI de 1. Cet écart représente $0.5 \log_{10}$.

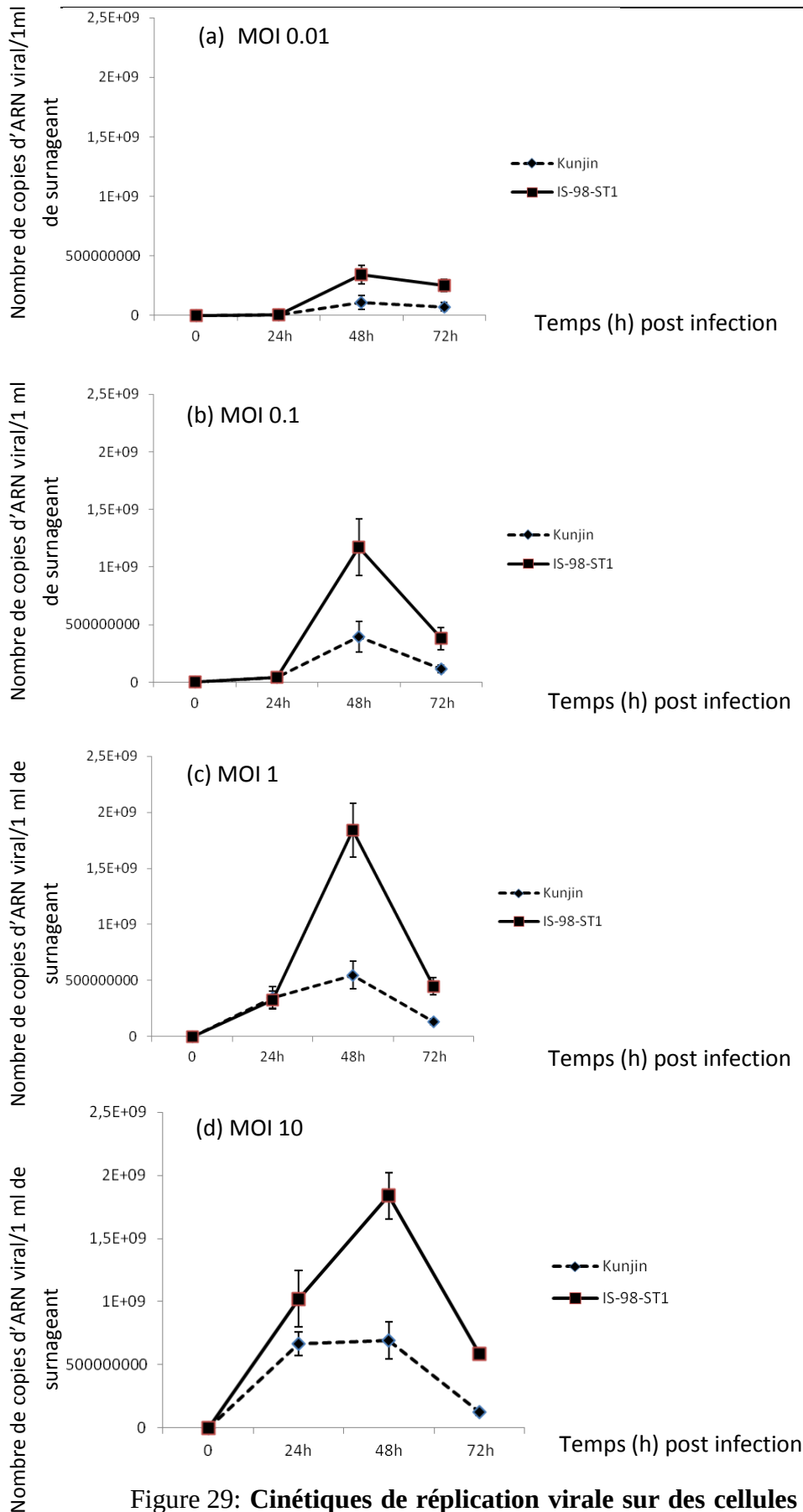


Figure 29: **Cinétiques de réplication virale sur des cellules SK-N-SH** infectées avec des MOI de (a) 0.01 (b) 0.1 (c) 1 (d) 10. Chaque mesure est la moyenne de 5 réplicats sur une expérience unique. Le test-T a été utilisé pour mesurer les écarts entre les groupes de données à un temps t et une MOI donnée. Les écarts à 48h pour les MOIs de 1 et de 10 sont significatifs.

2-3 Conclusion et discussion

Le modèle SK-N-SH présente un potentiel intéressant à confirmer par des études de reproductibilité. Il faudra aussi mesurer les cinétiques d'infection avec les souches Camargue 2000 et Maroc 2003 et voir comment elles se placent par rapport aux souches IS-98-ST1 et Kunjin. Les écarts qui ont été constatés sont relativement faibles et sont mesurables par quantification du nombre de copies d'ARN viral, probablement pas par titrage du fait qu'un maximum de 0.5 log₁₀ a été mesuré en copies d'ARN. Les écarts à 48h pour les MOIs de 1 et de 10 sont significatifs, ce qui permet de penser que ce modèle pourra nous servir à évaluer la virulence d'une souche à ces conditions.

Comme sur le modèle œuf embryonné, un léger retard de réplication de la souche Kunjin est observé sur cellules SK-N-SH. Ce retard de réplication a aussi été observé entre Kunjin et NY99 par Daffis *et al.* (2011) sur cellules d'insectes C6/36 et sur Vero.

Les mécanismes par lesquels l'infection à VWN induit des séquelles neurologiques ne sont pas bien connus, mais la mort par apoptose des neurones peut être la conséquence à la fois de l'infection par les virions, mais aussi des effets cytotoxiques des chémokines relarguées par les cellules gliales (Kumar *et al.*, 2010). Le laboratoire dispose de précurseurs de neurones d'embryons humains, mais leur culture est difficile à maintenir ainsi que la pureté de la culture du fait de leur différenciation en astrocytes or le modèle SK-N-SH permet d'évaluer l'impact direct du virus sur les cellules neuronales. Kumar *et al.*, ont démontré que les SK-N-SH infectées par le VWN sont une source de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, et TNF- α), que ces cytokines induisent la mort par apoptose des SK-N-SH et l'activation des cellules gliales, et enfin que la mort des SK-N-SH peut être empêchée par la présence d'anticorps neutralisants anti-IL-1 β et anti-TNF- α . La souche NY99 a été utilisée pour cette étude, il serait intéressant de voir s'il existe des différences significatives lors d'une infection avec les souches IS-98-ST1 et Kunjin qui nous permettraient de discriminer la virulence des souches, que ce soit en termes de niveaux et/ou de nature des cytokines sécrétées et/ou de marqueur d'apoptose ou de nécrose des cellules infectées, mais aussi en terme de sensibilité aux interférons de type I.

En effet, Daffis *et al.* (2011), ont montré sur cellules humaines A549 que l'atténuation de la virulence de Kunjin est en partie due à la plus grande sensibilité de cette souche à l'interféron de type I, comparativement à NY99.

Chapitre 5- Discussion et perspectives

1-Discussion

1-1 Obtention d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 du virus West Nile

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre 3, les clones infectieux sont un outil de génétique inverse indispensable pour l'étude des déterminants moléculaires d'un pathogène. L'objectif du laboratoire est de mettre en évidence les déterminants moléculaires de la virulence de souches européennes du VWN. Ainsi, la construction d'un clone infectieux constitue la base de cet objectif. Le choix de la souche clonée s'est fait en tenant compte du contexte épidémiologique qui nous intéresse spécifiquement, c'est-à-dire le contexte européen. IS-98-ST1 est la première souche de VWN à l'origine de cas de mortalité aviaire. La souche a été isolée du cerveau d'une cigogne (Lucas *et al.*, 2004), et a été identifiée sur des cigognes et des oies domestiques moribondes (Zeller et Schuffenecker, 2004). La souche IS-98-ST1 est très proche de la souche NY99 (Lanciotti *et al.*, 1999 ; Charrel *et al.*, 2003) avec 9 acides aminés et 32 nucléotides différents (AF481864 et DQ211652) . En fait, les deux souches auraient émergé d'une souche commune d'origine inconnue (May *et al.*, 2011). La souche NY99 a été isolée à partir du foie d'une Chouette Harfang du zoo du Bronx, et a été à l'origine de près de 6000 cas d'encéphalites humaines entre 2002 et 2003 aux Etats-Unis (Medigeshi *et al.*, 2007). De nombreux clones infectieux de la souche NY99 existent mais pas de clones d'IS-98-ST1. NY99 représente la souche de référence en matière de virulence pour le continent américain au vu du contexte épidémiologique et IS-98-ST1 la souche de référence de la région Europe/méditerranée. L'existence d'un clone infectieux IS-98-ST1 permet de travailler avec une souche de virulence proche de la souche NY99, mais appartenant au contexte européen.

Après avoir rencontré les difficultés habituellement rapportées pour les clones infectieux de Flavivirus, nous avons finalement obtenu un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 du virus West Nile.

La construction nous a permis d'obtenir des particules virales infectieuses ayant les mêmes propriétés biologiques que les particules sauvages *in vitro* et *in vivo* sur souris sensibles et résistantes. Ainsi, nous pouvons utiliser ce clone pour y apporter des modifications et observer leurs conséquences sur la virulence de la souche IS-98-ST1. Deux types de modification peuvent être faites sur un clone infectieux : la mutation ponctuelle ou la construction d'une chimère.

1-1-1 Mutation ponctuelle

Notre attention se portera d'abord sur la mutation T249P observée dans NS3 par Brault *et al.* (2007). Cette mutation a été identifiée comme jouant un rôle important dans la virulence de la souche NY99 chez le corbeau américain. Une mutagénèse dirigée effectuée sur une souche Kenyane (KEN98) peu virulente introduisant le changement NS3-T249P, la rend aussi virulente que NY99. Or, Sotelo *et al.* (2009) a montré que cette même mutation était présente sur une souche espagnole bien moins virulente que la souche NY99 chez la souris. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous (tableau 4):

Souche	NS3 ₂₄₉	DL ₅₀ (PFU)	Temps survie (Jours) ± écart-type
SP07	Pro	17.78	9.38 ± 1.51
MO03	Thr	1.78	9.93 ± 1.86
NY99	Pro	2.31	8.83 ± 1.17
B956	His	39.32	10.55 ± 1.5

Tableau 4: **Comparaison des séquences de différentes souches en position 249 dans NS3 et évaluation de la DL₅₀.** Issu des données de Sotelo *et al.* (2009). SP07= souche Espagne 2007 (GenBank FJ766331), MO03= souche Maroc 2003 (GenBank AY707413), NY99= souche New York 1999 (GenBank EF657887), B956= souche africaine (GenBank AY532665.1). Des groupes de 6 souris Swiss HSD ICR (CD1) de 3 à 4 semaines ont été inoculées par voie intra péritonéale avec des doses de 1 à 10 000 PFU de virus.

La Dose Létale 50 (DL₅₀) est près de huit fois plus élevée pour SP07 que pour NY99 alors que la Proline est présente dans les deux cas en position 249 dans NS3. Inversement, alors que la Thréonine est présente dans MO03, la DL₅₀ est proche de celle de NY99. Ces résultats suggèrent qu'il n'existe pas de relation directe entre la présence d'une Proline ou d'une Thréonine à cette position et la virulence d'une souche, en tout cas sur le modèle souris. Brault *et al.* (2007) avaient comparé la virulence de leurs virus sur le corbeau américain. Les auteurs de l'étude sur modèle murin ont travaillé par la suite sur un autre modèle aviaire, en infectant des perdrix rouges, une espèce autochtone de la région méditerranéenne sensible à l'infection par le VWN (figure 30).

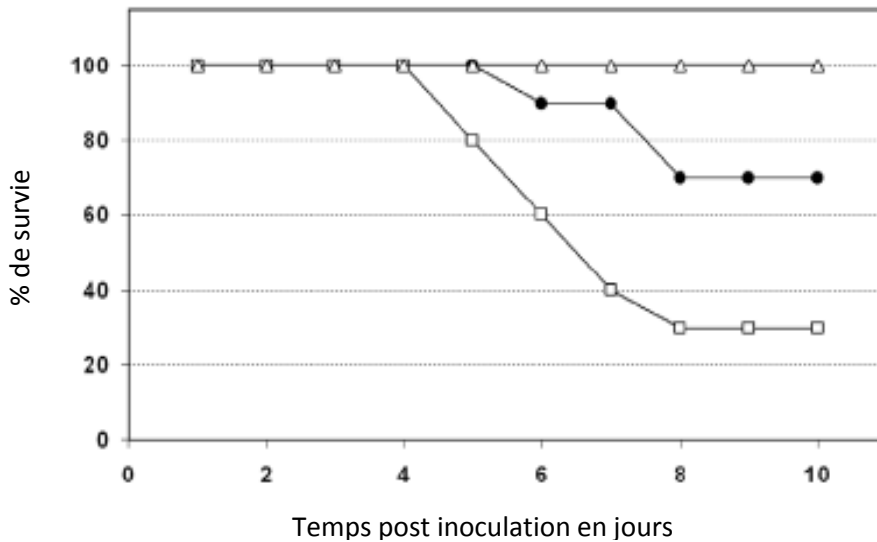


Figure 30: **Courbe de mortalité de perdrix rouges infectées par le VWN** (d'après Sotelo *et al.*, 2011). Des groupes de 10 perdrix rouges de 7 semaines ont été inoculés avec 10 000 PFU de virus, souche MO03 (points creux) ou SP07 (points pleins). Un groupe (triangles creux) a été inoculé avec le diluant seul (D-MEM).

Là encore, la souche présentant une Proline en position 249 dans NS3 (SP07) est moins virulente que la souche présentant une Thréonine (MO03), avec un taux de survie de 70% pour SP07 contre 30% pour MO03. Ceci suggère que cette mutation seule ne suffit pas à augmenter la virulence d'une souche. Il est possible que d'autres mutations jouent un rôle dans la pathogénicité.

L'ensemble des résultats obtenus par Sotelo *et al* (2009 ; 2011), sont issus d'infections expérimentales avec des souches sauvages. IS-98-ST1 possède comme NY99 une Proline en position 249 dans NS3. Ce que nous voulons faire avec le clone infectieux IS-98-ST1 est d'observer l'éventuel impact négatif sur la virulence de la mutation NS3_{P249T} dans un contexte clone infectieux. Nous pourrions alors confirmer les résultats de Sotelo *et al.* (2009 ; 2011) ou Brault *et al.* (2007) et apporter d'autres modifications qui nous permettraient de mettre en évidence les interactions qui expliqueraient la virulence ou la non virulence des souches ayant une Proline ou une Thréonine en NS3₂₄₉.

1-1-2 Chimère

Une épidémie a touché 8 provinces du nord de l'Italie (Emile-Romagne, Vénétie, Lombardie) en Août 2008 (Filipponi *et al.*, 2005). 794 cas équins d'infection à VWN ont été rapportés sur la base de cas cliniques et d'enquêtes sérologiques, 5 chevaux sont morts suite à l'infection (Calistri *et al.*, 2010). Des pies bavardes (*Pica pica*) (9.1%), des corneilles noires (*Corvus corone*) (7.4%) et des pigeons bisets (*Columba livia*) (12.9%) ont été trouvés infectés (signaux positifs en RT-PCR) (Calistri *et al.*, 2010). 9 cas humains ont aussi été diagnostiqués, dont 4 présentant des symptômes de méningo-encéphalites (Rossini *et al.*, 2008 ; Gobbi *et al.*, 2009). Les analyses phylogénétiques indiquent une similarité de 98.8% sur la séquence nucléotidique avec la souche isolée en Toscane en 1998, lignage 1a (Monaco *et al.*, 2010 ; Savini *et al.*, 2008).

Dans le cadre du projet européen « EuroWestNile », l'équipe de Miguel-Angel Jimenez-Clavejo (CISA-INIA) a comparé la virulence des souches Italie 2008 (It08) et IS-98-ST1 (IS98) (figure 31).

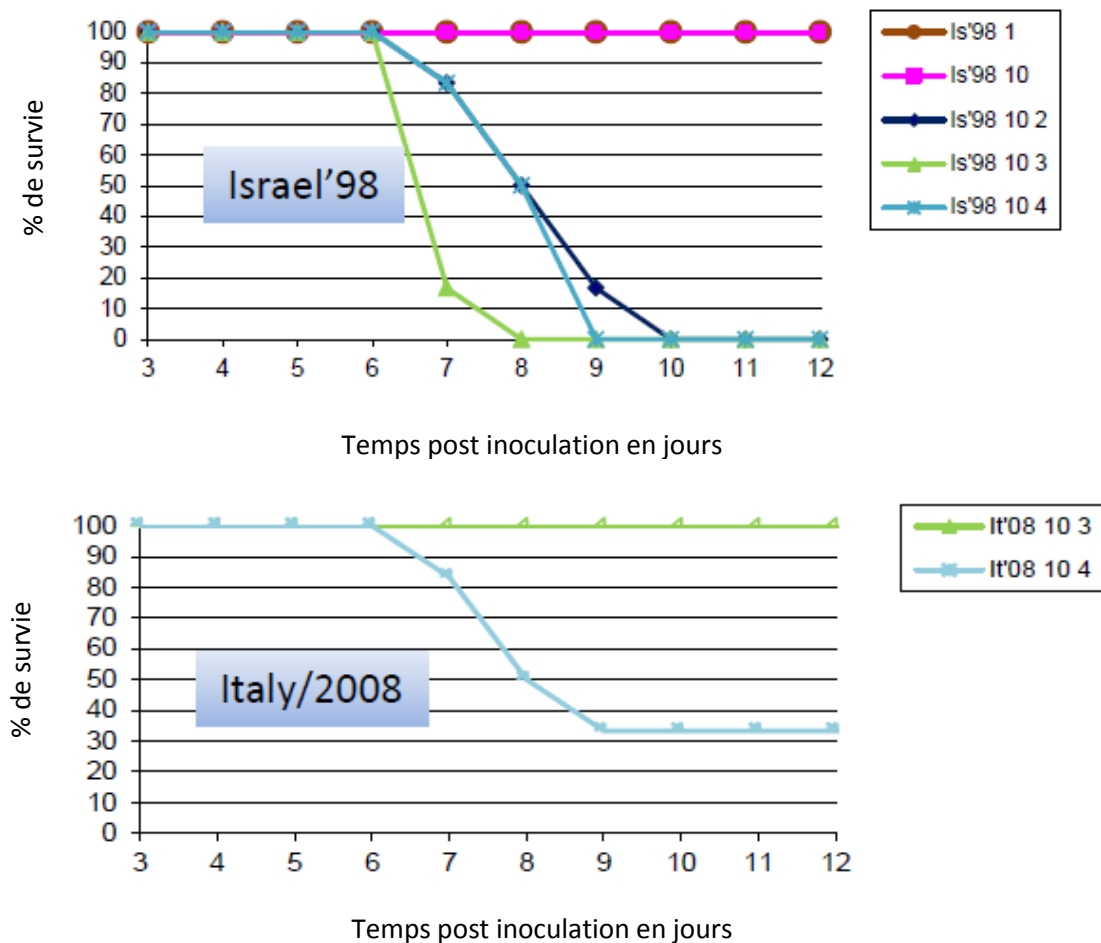


Figure 31: **Comparaison des courbes de mortalité de souris infectées avec la souche IS-98-ST1 ou Italie 08.** Des groupes de 6 souris Swiss HSD ICR (CD1) de 3 à 4 semaines ont été inoculées par voie intra péritonéale avec des doses de 1 à 10 000 PFU de virus. Source : M-A Jimenez-Clavejo, données personnelles.

La souche It08 apparaît nettement moins virulente que la souche IS98 sur ce modèle. Il faut 10 000 PFU d'It08 pour obtenir une mortalité chez la souris alors qu'une dose de 100 PFU est suffisante pour IS98.

Il est donc intéressant d'utiliser la souche It08 pour l'apport de fragments génomiques dans le clone infectieux IS98. De plus cette souche nous intéresse tout particulièrement du fait qu'il s'agisse d'une souche européenne. La comparaison des séquences protéiques des deux souches permet de sélectionner les régions d'intérêt (tableau 5).

Discussion et perspectives

Il y a 15 changements en acides aminés, avec 426 nucléotides différents dont 27 dans la région 3' non codante et aucun changement nucléotidique dans la région 5' non codante.

Protéine	Position Acide Aminé	IS98 AF481864	SP07 FJ766331	MO03 AY701413	It08 FJ483549
C	34	M	V	-	-
E	341	A	T	-	-
	378	P	S	-	-
	416	I	T	T	T
	449	V	I	I	I
	826	Y	H	-	-
	861	A	S	S	S
	979	V	-	I	-
	999	D	H	-	-
NS1	1080	E	G	-	-
NS2A	1228	I	-	-	V
	1248	I	-	-	T
	1262	H	-	Y	-
	1477	V	A	A	A
NS3	1551	F	-	L	-
	1754	P	-	T	-
	1861	T	I	I	I
NS4A	2209	A	V	V	I
	2224	P	-	-	S

NS4B	2388	A	T	-	-
	2522	E	D	D	D
NS5	2581	H	-	-	Y
	2582	S	P	P	P
	2786	V	-	-	A
	2900	A	V	V	V
	2950	R	-	-	K
	2954	E	A	-	-
	2964	M	I	-	-

Tableau 5: **Comparaisons des séquences en acides aminés** des souches NY99 (GenBank AF196835), Ken98 (GenBank AY262283), SP07 (GenBank FJ766331), MO03 (GenBank AY701413), It08 (GenBank FJ483549) avec IS-98-ST1 (GenBank AF481864). Seules les positions des acides aminés différents sont indiquées. Les acides aminés surlignés en jaune sont ceux qui seront ciblés pour la construction des chimères It08 dans le clone infectieux IS98. Les acides aminés surlignés en vert ne constituent pas une cible d'intérêt. Source : M-A Jimenez-Clavejo, données personnelles.

La séquence It08 a été comparée en même temps à IS-98-ST1, à SP07 et MO03 (tableau), ces deux souches ayant été démontrées par Sotelo *et al.* (2009 ; 2011) comme ayant une virulence plus forte que It08 sur souris.

Parmi les différences observées entre ces deux souches, toutes ne sont pas d'intérêt pour la construction de chimères. Les mutations qui n'ont pas été retenues sont communes à It08, SP07 et MO03, sauf pour celles dans E, qui peuvent être intéressantes dans la mesure où l'enveloppe reconnaissant le récepteur, elles peuvent être associées à des différences de tropisme. Les mutations dans NS2A, NS4A et NS5 ont été retenues en tant que régions présentant des différences importantes avec les souches utilisées pour l'alignement de séquence.

1-2 Réalisation de deux nouveaux modèles d'évaluation de la virulence des souches

Nous cherchons à évaluer l'impact sur la virulence de mutations ponctuelles ou d'inversion de fragments génomiques entre souches, dans un environnement maîtrisé. Il était donc indispensable d'avoir à disposition des modèles pertinents permettant de comparer la virulence des virions pour mesurer l'impact des changements apportés. Le modèle actuel d'étude de la virulence et/ou de la neuro-invasion ou de la neuro-virulence est le modèle murin. Ce modèle a ses limites dans la mesure où la souris n'est pas un hôte d'intérêt épidémiologique. Le modèle œuf embryonné de poulet permet d'évoluer dans un environnement aviaire, et le modèle SK-N-SH permet de travailler sur l'impact direct du virus sur les cellules neuronales humaines. La pertinence de chacun de ces deux modèles est à affiner, mais des perspectives intéressantes ont été mises à jour. Ces modèles permettent, à ce jour, une discrimination virulence/atténuation principalement basée sur un différentiel de vitesse de réplication. Ce sont aussi des systèmes facilement accessibles, peu coûteux et ne nécessitant pas ou peu d'équipement, et de locaux spécifiques, ni de personnel spécialisé.

Concernant le modèle œuf, il sera intéressant de regarder ce qui se passe au niveau de la réaction immunitaire de l'embryon de poulet. Le système immunitaire phagocytaire se développe rapidement durant l'ontogenèse, avec à la fois des macrophages et des granulocytes hétérophiles fonctionnels dès 10 jours de développement embryonnaire (Jacobsen *et al.*, 2010). L'expression de récepteurs TLRs, de cytokines et de molécules effectrices telles que les défensines augmente au fur et à mesure du développement (Abdul-Careem *et al.*, 2007 ; Meade *et al.*, 2009). L'expression de l'interleukine-4, de l'interleukine-10, de l'interleukine-18, et de l'interféron- γ est détectable à partir de 12 jours de développement embryonnaire (Abdul-Careem *et al.*, 2007). Les défensines- β aviaires (AvBDs) et les cathélicidines (CTHLs) sont deux classes de peptides anti-microbiens jouant un rôle important dans la réponse innée et la réponse adaptative. Le tableau 6 résume les niveaux d'expression mesurés par rapport au jour 3 de développement pour 26 gènes (Meade *et al.*, 2009).

Discussion et perspectives

Gene symbol	Day 6		Day 9		Day 12 (head)		Day 12 (abdomen)	
	Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value
TLR2	0.03	0.9999	1.97	0.0039	3.98	0.0039	4.53	0.0039
TLR4	–	–	–	–	–	–	–	–
TLR15	–4.94	0.0039	–2.57	0.0039	–2.27	0.0039	–2.20	0.0547
TLR21	2.65	0.0065	4.56	0.0039	10.81	0.0039	4.01	0.0547
ABD1	2.34	0.0039	–2.27	0.0547	–20.28	0.0039	–5.99	0.0039
ABD2	3.59	0.0039	–3.18	0.0039	1.51	0.0547	3.77	0.0051
ABD3	5.34	0.0039	3.91	0.0039	2.44	0.0039	–1.18	0.3367
ABD4	5.12	0.0039	1.21	0.0039	4.64	0.0039	4.25	0.0039
ABD5	15.21	0.0039	25.32	0.0039	49.27	0.0039	18.16	0.0039
ABD6	2.74	0.0039	–2.92	0.0039	2.40	0.0547	3.42	0.0547
ABD7	3.62	0.0039	–5.06	0.0039	1.22	0.0656	2.83	0.0039
ABD8	–2.57	0.0547	1.47	0.0039	–	–	0.05	0.9999
ABD9	20.46	0.0039	164.35	0.0039	–	–	50.61	0.0039
ABD10	36.90	0.0039	86.89	0.0039	–	–	137.62	0.0039
ABD11 ^a	–	–	12.51	0.0039	–0.67	0.9999	20.05	0.0039
ABD12	1.68	0.0039	2.29	0.0039	–3.70	0.0039	7.39	0.0039
ABD13	–2.95	0.0039	1.64	0.0039	–28.35	0.0039	3.53	0.0039
ABD14	2.52	0.0039	6.58	0.0039	18.54	0.0039	6.10	0.0039
CTHL1	7.27	0.0039	1.49	0.0547	12.76	0.0039	21.33	0.0039
CTHLB1 ^b	–	–	–	–	2.96	0.0039	3.17	0.0039
CTHL2	6.19	0.0039	–2.16	0.0547	6.67	0.0039	8.25	0.0039
CTHL3	9.28	0.0039	–0.11	0.7488	6.53	0.0039	5.23	0.0039
IL1B	–2.70	0.0039	–1.89	0.0039	1.14	0.5218	1.93	0.0547
IL8	–3.22	0.0039	–3.59	0.0039	–15.57	0.0039	–5.35	0.0039
IL10	–4.84	0.0039	21.20	0.0547	126.82	0.0039	31.00	0.0039
IFNG ^a	–	–	2.14	0.7488	1.65	0.7488	0.16	0.3367

a IFN- γ et AvBD11 ne sont pas exprimés au jour 3, les valeurs sont exprimées en rapport aux niveaux mesurés au jour 6.

b CTHLB1 n'est pas exprimé ni au jour 3 ni au jour 6, les valeurs sont exprimées en rapport aux niveaux mesurés au jour 9.

Tableau 6: **Moyenne des niveaux d'expression de gènes durant le développement embryonnaire du poulet** (d'après Meade *et al.*, 2009). Moyenne des niveaux d'expression de gènes durant le développement embryonnaire (n=6 par date de prélèvement) par rapport au niveau d'expression au jour 3 (les valeurs en gras sont significatives à P<0.05).

Ces niveaux d'expression ont été mesurés hors contexte infectieux. Un point particulièrement intéressant, est l'expression préférentielle de certains gènes dans la tête ou l'abdomen, indiquant une spécificité cellulaire dans l'expression de ces gènes (Meade *et al.*, 2009).

Une piste de développement pour nous serait donc de mesurer les niveaux d'expression de ces gènes mais aussi des interférons de type I impliqués dans la réponse anti-VWN, dans le contexte d'une infection à VWN, avec des essais d'inoculation à différents jours de développement.

2- Perspectives

2-1 L'identification des déterminants moléculaires de la virulence du virus permettra d'établir des cibles de choix pour la mise au point d'inhibiteurs.

Le clone infectieux est un outil précieux pour le criblage de molécules. En effet, Puig-Basagoiti *et al.* (2005) ont mis au point une technique de criblage haut-débit sur cultures cellulaires, basé sur l'utilisation d'un clone infectieux possédant un gène rapporteur. Ce système permet de discriminer le mode d'action des inhibiteurs testés sur l'entrée virale, la réplication et l'assemblage. Un certain nombre de travaux (voir tableau chapitre 2) ont mis en lumière le rôle de certains gènes ou de certains acides aminés clés dans la virulence et/ou la neuro-invasion. L'identification d'acides aminés ou de régions génomiques clés permettra de mieux identifier les cibles des inhibiteurs viraux et ainsi mieux sélectionner les candidats de choix. A ce jour, les études de criblage d'anti-viraux se sont basées sur l'évaluation d'inhibiteurs sur des clones infectieux ou des réplicons de souches sauvages (Deas *et al.*, 2005 ; Malet *et al.*, 2008 ; Ma *et al.*, 2009).

2-2 Le clone infectieux permettra de participer au développement de vaccins atténués

Il existe quatre types de vaccins équins : (i) un vaccin basé sur une souche inactivée (DUVAXIN ND WNV, Fort Dodge), mais dont l'efficacité est modérée (Kahler, 2003 ; Ng *et al.*, 2003 ; Nusbaum *et al.*, 2003) (ii) un vaccin basé sur une chimère avec un squelette Fièvre Jaune souche 17D (PreveNile ND, Intervet) (Lai et Monath, 2003). Ces chimères possèdent les gènes structuraux du VWN, induisent de forts titres en anticorps neutralisants, et protègent les mammifères lors de challenges (Pletnev *et al.*, 2002 ; Tesh *et al.*, 2002b). Une des limitations du vaccin basé sur le vecteur Fièvre Jaune est qu'il ne marche pas sur les oiseaux du fait de la restriction d'hôte posé par le vecteur (Langevin *et al.*, 2003). De plus, ce vaccin a été retiré du marché en 2010 du fait d'effets secondaires importants chez des poulains vaccinés. La réponse immunitaire cellulaire joue un rôle important dans l'élimination du virus et dans la protection contre la maladie (Diamond *et al.*, 2003a et c ; Shrestha et Diamond, 2004). Les protéines non structurales des flavivirus représentent la source principale de peptides reconnus par les lymphocytes T (Co *et al.*, 2002). Les chimères de flavivirus induisent donc une réponse cellulaire dirigée principalement contre les protéines du vecteur. Cependant, le développement d'un vaccin atténué contre IS-98-ST1 ou NY99 est limité par le fait que ces souches sont particulièrement virulentes, et ce même si des vaccins atténués possèderaient de meilleures capacités à induire une réponse humorale et une réponse cellulaire adaptées. (iii) un vaccin chimère canarypox (Recombitek ND equine WNV vaccine, Merial) (<http://www.aaep.org/wnv.htm>), ayant les mêmes limites que les chimères Flavivirus. (iv) un vaccin ADN adjuvé (West Nile Innovator DNA ND, Fort Dodge).

La virulence des souches telles que NY99 et IS-98-ST1 ne permet pas d'envisager le développement d'un vaccin vivant. Une étude menée par Seregin *et al.* (2006) sur un clone infectieux NY99 a permis de montrer que des vaccins ADN codant pour des séquences génomiques virales non infectieuses (délétées pour le gène C), initient un cycle viral sans produire de virémie, et sont à l'origine d'un effet protecteur similaire à celui d'un vaccin atténué ou d'ADN infectieux.

Yamshchikov *et al.* (2004) ont utilisé un clone infectieux de la souche B956, peu virulente, en tant que souche vaccinale anti-NY99. Même si la virulence de la souche IS-98-ST1 nous incite à émettre des réserves quant à l'opportunité d'un vaccin vivant, la mise en évidence de facteurs de virulence pourrait permettre de générer un virus suffisamment atténué, et de manière contrôlée, pour le proposer en tant que vaccin vivant.

C'est ce qu'ont fait Whiteman *et al.* (2010), en proposant un virus dont les sites de glycosylation E₁₅₄/NS1_{130/175/207} ont été enlevés. Le virus résultant est complètement atténué pour la neuro-invasion et induit une protection immunitaire dans le modèle murin, à de faibles doses.

Une autre possibilité pour tirer profit de l'efficacité d'un vaccin vivant en toute sécurité est la génération de chimères basées sur un vecteur West Nile. Borisevich *et al.* (2006) ont construit une chimère contenant les gènes codant pour les protéines structurales de NY99 sur un squelette W956. Les virus chimères résultants sont atténués pour la neuro-invasion et possèdent des propriétés immunogènes supérieures à W956.

La mise en évidence de facteurs de virulence basés sur l'utilisation du clone infectieux IS-98-ST1 pourra donc à terme servir de base pour compléter les perspectives d'élaboration de vaccins atténués tels que ceux envisagés pour lutter contre NY99.

2-3 Amélioration de la vigilance envers l'émergence de nouvelles souches

La détermination des facteurs de virulence permet de connaître les marqueurs à détecter sur une souche émergente, et ainsi d'évaluer son potentiel de dangerosité. Une PCR couplée à un séquençage ou à une biopuce permettra d'identifier le marqueur d'intérêt sur un ARN isolé d'un prélèvement du terrain. Les pouvoirs publics auront ainsi à disposition un outil d'aide à la décision sur les mesures préventives à appliquer en cas d'émergence d'une souche virulente sur le territoire et ce de façon très précoce.

CONCLUSION

CONCLUSION

Nous avons construit un clone infectieux dérivé de la souche IS-98-ST1. Le clone infectieux nous servira à évaluer l'impact sur la virulence du VWN de mutations ponctuelles ou d'échange de fragments génomiques provenant de souches moins virulentes. Une mutation silencieuse générant un nouveau site de restriction pour *SnaBI* a été apportée dans le gène NS4A pour servir de marqueur génétique. Ce marqueur nous permet de distinguer les virus sauvages des virus recombinants. Des néovirions dont le génome viral possède le marqueur génétique et une séquence nucléotidique correcte ont été obtenus.

Les propriétés biologiques du virus recombinant ont été validées à la fois *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, les capacités de réplication des particules virales dérivées du clone infectieux sont les mêmes que celles du virus sauvage. Les infections sur souris BALB/c sensibles montrent un même taux de mortalité ainsi que des niveaux de charges virales similaires. Les souris MBT, résistantes à l'infection par le VWN, car possédant le gène *Oas1b* non tronqué contrairement aux souris Balb/c, infectées avec 1000 PFU, ont un taux de survie de 100 % que ce soit avec le virus recombinant ou le virus sauvage.

Les modifications apportées sur le clone infectieux sont à évaluer sur un système biologique *in vitro* et/ou *in vivo*. Le modèle couramment utilisé pour évaluer la virulence d'une souche de VWN est le modèle murin, or ce modèle n'est pas un hôte d'intérêt épidémiologique. Nous avons souhaité développer deux modèles plus proches de la réalité du terrain. Le modèle œuf embryonné de poulet permet d'évoluer dans un environnement aviaire, et le modèle SK-N-SH permet de travailler sur l'impact direct du virus sur les cellules neuronales humaines. En l'état actuel des résultats, nous avons constaté qu'une différence de vitesse de réplication entre IS-98-ST1 et Kunjin est mesurée sur les SK-N-SH et un retard de mortalité est visible sur les œufs embryonnés de poulet. Des études complémentaires portant sur la réponse immunitaire de l'embryon de poulet et l'impact d'autres souches seront nécessaires afin de complètement valider ces modèles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aaronson D. S., Horvath C. M. (2002). A road map for those who don't know JAKSTAT. *Science* 296(5573):1653-5.

Abdul-Careem M.F., Hunter D.B., Lambourne M.D., Barta J., Sharif S. (2007). Ontogeny of cytokine gene expression in the chicken spleen. *Poult Sci.* 86(7):1351-5.

Agapov E. V., Frolov I., Lindenbach B. D., Pragai B. M., Schlesinger S., Rice C. M. (1998). Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12989–12994.

Agüero M., Fernández-Pinero J., Buitrago D., Sánchez A., Elizalde M., San Miguel E., Villalba R., Llorente F., Jiménez-Clavero M.A. (2011). Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 17(8):1498-501.

Ahmed S., Libman R., Wesson K., Ahmed F., Einberg K. (2000). Guillain-Barre syndrome: An unusual presentation of West Nile virus infection. *Neurology*, 55: 144-146

Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732–738.

Alvarez D.E., De Lella Ezcurra A.L., Fucito S., Gamarnik A.V. (2005). Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 339:200–212.

Amberg S.M., Nestorowicz A., McCourt D.W., Rice C.M. (1994). NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies. *J Virol* 68:3794–3802.

Ank N., West H., Bartholdy C., Eriksson K., Thomsen A. R., Paludan S. R. (2006). Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *Journal of Virology* 80(9): 4501-9.

Appler K.K., Brown A.N., Stewart B.S., Behr M.J., Demarest V.L., Wong S.J., Bernard K.A. (2010). Persistence of West Nile virus in the central nervous system and periphery of mice. *PLoS One.* 5 (5):e10649.

Arjona A., Foellmer H.G., Town T., Leng L., McDonald C., Wang T., Wong S.J., Montgomery R.R., Fikrig E., Bucala R. (2007). Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion. *J Clin Invest* 117: 3059–3066.

Arjona A., Wang P., Montgomery R.R., Fikrig E. (2011) Innate immune control of West Nile virus infection. *Cell Microbiol.* 13(11):1648-58.

Audsley M., Edmonds J., Liu W., Mokhonov V., Mokhonova E., Melian Balmori E., Prow N., Hall R.A., Khromykh A.A. (2011). Virulence determinants between New York 99 and Kunjin strains of West Nile Virus. *Virology* 414 (1):63-73.

Autorino G.L., Battisti A., Deubel V., Ferrari G., Forletta R., Giovannini A., Lelli R., Murri S., Scicluna M.T. (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis* 8(12):1372–8.

Bach E. A., Aguet M., Schreiber R. D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15: 563-91.

Bai F., Kong K.F., Dai J., Qian F., Zhang L., Brown C.R., Fikrig E., Montgomery R.R. (2010). A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J Infect Dis* 202: 1804–1812.

Bakonyi T., Hubalek Z., Rudolf I., Nowotny N. (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 11: 225-31.

Bakonyi T., Ivanics E., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Weissenböck H., Nowotny N. (2006) Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 12(4):618-23.

Bakonyi T., Erdelyi K., Ursu K., Ferenczi E., Csorgo T., Lussy H., Chvala S., Bukovsky C., Meister T., Weissenbock H., Nowotny N. (2007). Emergence of Usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol*, 45: 3870-3874

Bakonyi T., Hubalek Z., Ivanics E., Erdelyi K., Ferenczi E., Weissenbock H., Nowotny N. (2008). Emergence of mosquito-borne flaviviruses in central Europe. *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests William H Robinson and Dániel Bajomi (editors), 2008 Printed by OOK-Press Kft., H-8200 Veszprém, Pápai út 37/a, Hungary*

Références bibliographiques

- Basu M., Brinton M.A.** (2011). West Nile virus (WNV) genome RNAs with up to three adjacent mutations that disrupt long distance 5' -3' cyclization sequence basepairs are viable. *Virology* 412 : 220-232
- Beasley D. W., Barrett A. D.** (2002). Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J. Virol.* 76:13097–13100.
- Beasley D.W., Davis C.T., Estrada-Franco J., Navarro-Lopez R., Campomanes-Cortes A., Tesh R.B., Weaver S.C., Barrett A.D.** (2004). Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis*, 10: 2221-2224.
- Beasley D.W.C, Whiteman M.C., Zhang S., Huang C.Y.H., Schneider B.S., Smith D.R., Gromowski G.D., Higgs S., Kinney R.M., Barrett A.D.T** (2005). Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 west nile virus strains. *J virol* 79 (13):8339-8347
- Becker N., Jöst H., Ziegler U., Eiden M., Höper D., Emmerich P., Fichet-Calvet E., Ehichioya D.U., Czajka C., Gabriel M., Hoffmann B., Beer M., Tenner-Racz K., Racz P., Günther S., Wink M., Bosch S., Konrad A., Pfeffer M., Groschup M.H., Schmidt-Chanasit J.** (2012). Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One*. 7(2):e32604.
- Berger J. R., Avison M.** (2004). The blood brain barrier in HIV infection. *Front. Biosci.* 9:2680–2685.
- Berglund P., Smerdou C., Fleeton M. N., Tubulekas I., Liljestrom P.** (1998). Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat. Biotechnol.* 16:562–565.
- Bernard K.A., Maffei J.G., Jones S.A., Kauffman E.B., Ebel G., Dupuis A.P. 2nd, Ngo K.A., Nicholas D.C., Young D.M., Shi P.Y., Kulasekera V.L., Eidson M., White D.J., Stone W.B., Kramer L.D., NY State West Nile Virus Surveillance Team.** (2001). West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000, *Emerg. Infect. Dis.* 7:679–685.
- Berthet F.X., Zeller H.G., Drouet M.T., Rauzier J., Digoutte J.P., Deubel V.** (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol* 78: 2293-7.
- Best S. M., Morris K. L., Shannon J. G., Robertson S. J., Mitzel D. N., Park G. S., Boer E., Wolfenbarger J. B., Bloom M. E.** (2005). Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J. Virol.* 79(20): 12828-39.

Références bibliographiques

- Bin H., Grossman Z., Pokamunski S., Malkinson M., Weiss L., Duvdevani P., Banet C., Weisman Y., Annis E., Gandaku D., Yahalom V., Hindyieh M., Shulman L., Mendelson E.** (2001). West Nile fever in Israel 1999–2000: from geese to humans, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 951:127–142.
- Blackwell J. L., Brinton M. A.** (1997). Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *Journal of Virology* 71(9): 6433–44.
- Blivich B.J.** (2008). Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev*, 9: 71–86.
- Bogachek M.V., Protopopova E.V., Loktev V.B., Zaitsev B.N., Favre M., Sekatskii S.K., Dietler G.** (2008). Immunochemical and single molecule force spectroscopy studies of specific interaction between the laminin binding protein and the West Nile virus surface glycoprotein E domain II. *J Mol Recognit* 21:55–62.
- Bondre V.P., Jadi R. S., Mishra A. C., Yergolkar P. N., Arankalle V. A.** (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage *J. Gen.Virol.* 88: 875–884
- Borden E. C., Sen G. C., Uze G., Silverman R. H., Ransohoff R. M., Foster G. R., Stark G. R.** (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews Drug discovery* 6(12): 975–90.
- Borisevich V., Seregin A., Nistler R., Mutabazi D., Yamshchikov V.** (2006). Biological properties of chimeric West Nile viruses. *Virology*. 349(2):371–81.
- Botha E.M., Markotter W., Wolfaardt M., Paweska J.T., Swanepoel R., Palacios G., Nel L.H., Venter M.** (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile Virus strains. *Emerg Infect Dis* 14 (2): 222–230
- Brault A.C., Langevin S.A., Bowen R.A., Panella N.A., Biggerstaff B.J., Miller B.R., Komar N.** (2004). Differential virulence of West Nile strains for American crows, *Emerg. Infect. Dis.* 10:2161–2168.
- Brault A.C., Huang C.Y., Langevin S.A., Kinney R.M., Bowen R.A., Ramey W.N., Panella N.A., Holmes E.C., Powers A.M., Miller B.R.** (2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet.* 39(9):1162–6
- Brault A.C.** (2009). Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility *Vet. Res.* 40:43

Références bibliographiques

- Bredenbeek P., Frolov I., Rice C. M., Schlesinger S.** (1993). Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J. Virol.* 67:6439–6446.
- Bunning M.L., Bowen R.A., Cropp C.B., Sullivan K.G., Davis B.S., Komar N., Godsey M.S., Baker D., Hettler D.L., Holmes D.A., Biggerstaff B.J., Mitchell C.J.** (2002). Experimental infection of horses with west nile virus. *Emerg Infect Dis*, 8:380-386
- Busquets N., Alba A., Allepuz A., Aranda C., Ignacio Nunez J.** (2008). Usutu virus sequences in *Culex pipens* (Diptera : Culicidae), Spain. *Emerg Infect Dis*, 14, 861-863.
- Byrne S.N., Halliday G.M., Johnston L.J., King N.J.** (2001). Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol* 117:702–709.
- Caffrey C., Smith S. C. R., Weston T. J.** (2005). West Nile virus devastates an American crow population. *Condor* 107:128–132.
- Caley I. J., Betts M. R., Irlbeck D. M., Davis N. L., Swanstrom R., Frelinger J. A., Johnston R. E.** (1997). Humoral, mucosal, and cellular immunity in response to a human immunodeficiency virus type 1 immunogen expressed by a Venezuelan equine encephalitis virus vaccine vector. *J. Virol.* 71:3031–3038.
- Calistri P., Giovannini A., Hubalek Z., Ionescu A., Monaco F., Savini G., Lelli R.** (2010). Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. *Open Virol J.* 4:29-37.
- Campbell G.L., Marfin A.A., Lanciotti R.S., Gubler D.J.** (2002). West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2(9):519–29
- Cantile C., Di Guardo G., Eleni C., Arispici M.** (2000). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J* 32(1):31–5.
- Cantile C., Del Piero F., Di Guardo G., Arispici M.** (2001). Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses. *Vet. Pathol.* 38:414–421.
- Chambers T. J., Hahn C. S., Galler R., Rice C. M.** (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:649–688.
- Charrel R.N., Brault A.C., Gallian P., Lemasson J.J., Murgue B., Murri S., Pastorino B., Zeller H., de Chesse R., de Micco P., de Lamballerie X.** (2003). Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* 315: 381-8.

Références bibliographiques

Charrel, R.N., Attoui, H., Butenko, A.M., Clegg, J.C., Deubel, V., Frolova, T.V., Gould, E.A., Gritsun, T.S., Heinz, F.X., Labuda, M., Lashkevich, V.A., Loktev, V., Lundkvist, A., Lvov, D.V., Mandl, C.W., Niedrig, M., Papa, A., Petrov, V.S., Plyusnin, A., Randolph, S., Suss, J., Zlobin, V.I., and deLamballerie, X. (2004). Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 10: 1040-1055.

Chen C.J., Kuo M.D., Chien L.J., Hsu S.L., Wang Y.M., Lin J.H. (1997). RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol* 71(5):3466–3473.

Cheng G., Cox J., Wang P., Krishnan M.N., Dai J., Qian F., Anderson J.F., Fikrig E. (2010). A C-type lectin collaborates with a CD45 phosphatase homolog to facilitate West Nile virus infection of mosquitoes. *Cell* 142: 714–725.

Chowers M.Y., Lang R., Nassar F., Ben-David D., Giladi M., Rubinshtein E., Itzhaki A., Mishal J., Siegman-Igra Y., Kitzes R., Pick N., Landau Z., Wolf D., Bin H., Mendelson E., Pitlik S.D., Weinberger M. (2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis.* 7(4):675-8.

Chiu W.-W., Kinney R. M., Dreher T. W. (2005). Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *Journal of Virology* 79 (13): 8303-15.

Chu J. J., Ng M. L. (2003). The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. *J. Gen. Virol.* 84:3305–3314.

Chu J.J., Ng M.L. (2004). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 78(19):10543–10555.

Chung K. M., Nybakken G. E., Thompson B. S., Engle M. J., Marri A., Fremont D. H., Diamond M. S. (2006). Antibodies against West Nile virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc γ receptor-dependent and -independent mechanisms. *J. Virol.* 80:1340–1351.

Chvala S., Kolodziejek J., Nowotny N., Weissenböck H. (2004). Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *J Comp Pathol*, 131: 176-185

Clum S., Ebner K.E., Padmanabhan R. (1997). Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *J Biol Chem* 272(49):30715–30723.

Clyde K., Harris E. (2006). RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *Journal of Virology* 80(5), 2170-82.

- Co M.D., Terajima M., Cruz J., Ennis F.A., Rothman A.L.** (2002). Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology* 293 (1): 151–163.
- Colombage G., Hall R., Pavy M., Lobigs M.** (1998). DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits longlived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. *Virology* 250:151–163.
- Corver J., Lenches E., Smith K., Robison R.A., Sando T., Strauss E.G., Strauss J.H.** (2003). Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J. Virol.* 77: 2265–2270.
- Cosset** (2010). Entrée cellulaire du virus de l'hépatite C. *Virologie*. Volume 10, Numéro 3, 179-91, Mai-Juin 2006, Revue
- Crespo R., Shivaprasad H.L., França M., Woolcock P.R.** (2009) Isolation and Distribution of West Nile Virus in Embryonated Chicken Eggs. *Avian Diseases* 53: 608-612
- Cui T., Sugrue R.J., Xu Q., Lee A.K., Chan Y.C., Fu J.** (1998). Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology* 246(2):409–417.
- Daffis S., Samuel M., Keller B., Gale M., Diamond M.** (2007). Cell-Specific IRF-3 Responses Protect against West Nile Virus Infection by Interferon-Dependent and Independent Mechanisms. *PLoS Pathog* 3(7), e106.
- Daffis S., Samuel M.A., Suthar M.S., Gale M., Diamond M.S.** (2008a). Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection. *J. Virol.* 82 (21):10349–10358.
- Daffis S., Samuel M. A., Suthar M. S., Keller B. C., Gale M., Diamond M. S.** (2008b). Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection. *J. Virol.* 82(17): 8465-75.
- Daffis S., Lazear H.M., Liu W.J., Audsley M., Engle M., Khromykh A.A., Diamond M.S.** (2011). The naturally attenuated Kunjin strain of West Nile virus shows enhanced sensitivity to the host type I interferon response. *J Virol.* 85(11):5664-8.
- Dai J., Wang P., Bai F., Town T., Fikrig E.** (2008). ICAM-1 Participates in the Entry of West Nile Virus into the Central Nervous System. *J. Virol.* 82 (8): 4164–4168.
- Darnell J. E., Kerr I. M., Stark G. R.** (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264 (5164): 1415-21.

Références bibliographiques

Darnell J. E. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277 (5332): 1630-5.

Dauphin G., Zientara S. (2005). Infections par le virus du nil occidental: synthèse et actualités épidémiologiques. *Virologie*. 9 (5) : 395-408

Dauphin G., Zientara S. (2007). West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*. 25(30):5563-76.

Davis C.W., Mattei L.M., Nguyen H.Y., Ansarah-Sobrinho C., Doms R.W., Pierson, T.C. (2006a). The location of asparagine-linked glycans on West Nile virions controls their interactions with CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin). *J Biol Chem* 281: 37183–37194.

Davis C.W., Nguyen H.Y., Hanna S.L., Sanchez M.D., Doms R.W., Pierson T.C. (2006b). West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol* 80: 1290–1301.

Davis C.T., Galbraith S.E., Zhang S., Whitemann M.C., Li L., Kinney R.M., Barrett A.D.T. (2007). A Combination of Naturally Occurring Mutations in North American West Nile Virus Nonstructural Protein Genes and in the 3' Untranslated Region Alters Virus Phenotype. *J.Virol.*81 (11): 6111–6116

Day J.F., Edman J.D. (1983). Malaria renders mice susceptible to mosquito feeding when gametocytes are most infective, *J. Parasitol.* 69:163–170.

Deas T.S., Binduga-Gajewska I., Tilgner M., Ren P., Stein D.A., Moulton H.M., Iversen P.L., Kauffman E.B., Kramer L.D., Shi P-Y. (2005). Inhibition of Flavivirus Infections by Antisense Oligomers Specifically Suppressing Viral Translation and RNA Replication. *J.Virol.* 79 (8): 4599–4609

De Nova-Ocampo M., Villegas-Sepúlveda N., del Angel R. M. (2002). Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* 295(2): 337-47.

Der S. D., Zhou A., Williams B. R., Silverman R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (26): 15623-8.

Desenclos J.C., Lecollinet S., Balenghien T., Fontenille D., Lagadic L., Lagneau C., Lefait Robin R., Yébakima A. (2009). Le contexte de la lutte antivectorielle en France : 3. Les zoonoses transmises par des vecteurs. Partie d'ouvrage La lutte antivectorielle en France = Disease vector control in France. Marseille : IRD, 2009, p. 92-195. (Expertise Collégiale).

Dey M., Cao C., Dar A. C., Tamura T., Ozato K., Sicheri F., Dever T. E. (2005). Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell* 122(6): 901-13.

Dheen, S.T., Kaur C., Ling E.A. (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1189–1197

Diamond M. S., Shrestha B., Marri A., Mahan D., Engle M. (2003a). B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J. Virol.* 77:2578–2586.

Diamond M. S., Sitati E. M., Friend L. D., Higgs S., Shrestha B., Engle M. (2003b). A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* 198:1853–1862.

Diamond M.S., Shrestha B., Mehlhop E., Sitati E., Engle M. (2003c). Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol.* 16 (3), 259–278.

Diamond M.S. (2009). Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis. *PLoS Pathog.* 5(6):e1000452.

Dibner J. J., Knight C. D., Kitchell M. L., Atwell C. A., Downs A. C., Ivey F. J. (1998). Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *J. Appl. Poult. Res.* 7:425–436.

DiCiommo D. P., Bremner R. (1998). Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *J. Biol. Chem.* 273: 18060–18066

Diniz J.A.P., Travassos Da Rosa A.P.A., Guzman H., Xu F., Xiao S.Y., Popov V.L., Vasconcelos P.F.C., Tesh R.B. (2006). West Nile infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: the role of astrocytes in chronic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(4): 691–696

Douglas M. W., Kesson A. M., King N. J. (1994). CTL recognition of West Nile virus-infected fibroblasts is cell cycle dependent and is associated with virus-induced increases in class I MHC antigen expression. *Immunology* 82:561–570.

Drevets D. A., Leenen P. J. (2000). Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect.* 2:1609– 1618

Dubensky T. W. Jr., Driver D. A., Polo J. M., Belli B. A., Latham E. M., Ibanez C. E., Chada S., Brumm D., Banks T. A., Mento S. J., Jolly D. J., Chang S. M. W. (1996). Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer. *J. Virol.* 70:508–519.

Dunster L.M., Gibson C.A., Stephenson J.R., Minor P.D., Barrett A.D. (1990). Attenuation of virulence of flaviviruses following passage in HeLa cells, *J. Gen. Virol.* 71:601–607.

Elghonemy S., Davis W.G., Brinton M.A. (2005). The majority of the nucleotides in the top loop of the genomic 3' terminal stem loop structure are cis-acting in a West Nile virus infectious clone. *Virology* 331: 238–246

Emara M.M., Liu H., Davis W.G., Brinton M.A. (2008). Mutation of Mapped TIA-1/TIAR Binding Sites in the 3' Terminal Stem-Loop of West Nile Virus Minus-Strand RNA in an Infectious Clone Negatively Affects Genomic RNA Amplification. *J.Virol.* 82 (21): 10657–10670

Elshuber S., Mandl C.W. (2005). Resuscitating mutations in a furin cleavage-deficient mutant of the flavivirus tick-borne encephalitis virus. *J Virol* 79(18):11813–11823.

Erdelyi K., Ursu K., Ferenczi E., Szeredi L., Ratz F., Skare J., Bakonyi T. (2007). Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7: 181-188.

Estrada-Franco J.G., Navarro-Lopez R., Beasley D.W., Coffey L., Carrara A.S., Travassos da Rosa A., Clements T., Wang E., Ludwig G.V., Cortes A.C., Ramirez P.P., Tesh R.B., Barrett A.D., Weaver S.C. (2003). West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis*, 9: 1604-1607.

Evans J.D., Seeger C. (2007). Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *J.Virol.* 81 (21): 11809–11816

Fair J. M., Nemeth N. M., J. Taylor-McCabe K., Shou Y., Marrone B. L. (2011). Clinical and acquired immunologic responses to West Nile virus infection of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Poultry Science* 90 :328-336.

Falconar, A. K. (1999). Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. *Arch. Virol.* 144:2313–2330.

Falgout B., Chanock R., Lai C.-J. (1989). Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J Virol* 63(5):1852–1860.

Falgout B., Pethel M., Zhang Y.-M., Lai C.J. (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 65:2467–2475.

Falgout B., Markoff L. (1995) Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 69(11):7232–7243.

Fang H., Welte T., Zheng X., Chang G.J., Holbrook M.R. Soong L., Wang T. (2010). gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 71–80.

Figuerola J., Baouab R.E., Soriguer R., Fassi-Fihri O., Llorente F., Jiménez-Clavero M.A. (2009). West Nile virus antibodies in wild birds, Morocco, 2008. *Emerg Infect Dis.* 15(10):1651-3.

Filipponi G., Lelli R., Savini G. (2005). West Nile Virus surveillance in Italy: results of three years activities. 2005 National Conference on West Nile Virus in the United States, San Jose, California, February, 8-9 2005.

Firth A.E., Wills N.M., Gesteland R.F., Atkins J.F. (2011). Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3'RNA structural element. *Nucleic Acids Research*, 39 (15): 6679-6691

Firth A.E. et Brierley I. (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol*, in press

Foppa I.M., Spielman A. (2007). Does reservoir host mortality enhance transmission of West Nile virus?, *Theor. Biol. Med. Model.* 4:17.

Fratkin J., Leis A., Stokic D., Slavinski S., Geiss R. (2004). Spinal cord neuropathology in human West Nile virus infection. *Arch Pathol Lab Med* 128: 533–37.

Fredericksen B. L., Gale M. (2006). West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. *J. Virol.*80(6): 2913-23.

Gehrke R., Ecker M., Aberle S. W., Allison S. L., Heinz F. X., Mandl C. W. (2003). Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. *J. Virol.* 77:8924–8933.

Références bibliographiques

- Gehrke R., Heinz F., Davis N., Mandl C.** (2005). Heterologous gene expression by infectious and replicon vectors derived from tick-borne encephalitis virus and direct comparison of this flavivirus system with an alphavirus replicon. *J. Gen. Virol.* 86:1045–1053.
- Ghoshal, A., Das S., Ghosh S., Mishra M.K., Sharma V., Koli P., Sen E., Basu A.** (2007). Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia* 55:483–496
- Giannakopoulos N. V., Luo J.-K., Papov V., Zou W., Lenschow D. J., Jacobs B. S., Borden E. C., Li J., Virgin H. W., Zhang D.-E.** (2005). Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336(2): 496-506.
- Gidday, J.M., Gasche Y.G., Copin J.C., Shah A.R., Perez R.S., Shapiro S.D., Chan P.H., Park TS.** (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289:558–568
- Gobbi F., Napoletano G., Piovesan C., Russo F., Angheben A., Rossanese A., Cattelan A.M., Gallo L., Valsecchi M., Piazza A., Venturi G., Bisoffi Z.** (2009). Where is West Nile fever? Lessons learnt from recent human cases in northern Italy. *Eurosurveillance* 2009; 14.
- Goddard L.B., Roth A.E., Reisen W.K., Scott T.W.** (2003). Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Dipteral: Culicidae) species. *J Med Entomol*, 40: 743-746
- Gollins S.W., Porterfield J.S.** (1986a). The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: effects of pH and ammonium chloride. *J Gen Virol* 67:1941–1950.
- Gollins S. W., Porterfield J. S.** (1986b). A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by antiviral antibody. *Nature* 321:244–246.
- Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P., Blinov V.M.** (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17(12):4713–4729.
- Granwehr B.P., Lillibridge K.M., Higgs S., Mason P.W., Aronson J.F., Campbell G.A., Barrett A.D.** (2004). West nile virus: where are we now? *Lancet Infect Dis*, 4: 547-556

- Greenwood J., Etienne-Manneville S., Adamson P., Couraud P. O.** (2002). Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul. Pharmacol.* 38:315– 322
- Gritsun T. S., Gould E. A.** (1995). Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. *Virology* 214:611–618.
- Guo J.-T., Hayashi J., Seeger, C.** (2005). West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J. Virol.* 79(3), 1343-50.
- Hall R.A., Scherret J.H., Mackenzie J.S.** (2001). Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? *Ann N Y Acad Sci.* 951:153-60.
- Haller O., Stertz S., Kochs G.** (2007). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect* 9 (14-15), 1636-43.
- Hanley K.A., Manlucu L.R., Gilmore L.E., Blaney J.E. Jr., Hanson C.T., Murphy B.R., Whitehead S.S.** (2003). A trade-off in replication in mosquito versus mammalian systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4, *Virology* 312:222–232.
- Harty J. T., Badovinac V. P.** (2002). Influence of effector molecules on the CD8_ T cell response to infection. *Curr. Opin. Immunol.* 14:360–365.
- Harty R., Pitha P., Okumura A.** (2009). Antiviral Activity of Innate Immune Protein ISG15. *Journal of innate immunity* 1(5): 397-404.
- Harvey T., Liu W., Wang X., Linedale R., Jacobs M., Davidson A., Le T., Anraku I., Suhrbier A., Shi P., Khromykh A.** (2004). Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. *J. Virol.* 78:531–538.
- Hayes C.G., West Nile Fever, in: Monath T.P.** (1988), *The Arboviruses: epidemiology and ecology*, CRC Press, Boca Raton, FL, 59–88.
- Hayes E.B., Komar N., Nasci R.S., Montgomery S.P., O’Leary D.R., Campbell G.L.** (2005). Epidemiology and transmission dynamics of west nile virus disease. *Emerg Infect Dis*, 11: 1167-1173
- Heinz F.X et Stiasny K.** (2012). Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30 (2012) 4301– 4306
- Heppner F.L., Greter M., Marino D., Falsig J., Raivich G., Hövelmeyer N., Waisman A., Rüllicke T., Prinz M., Priller J., Becher B., Aguzzi A.** (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat. Med.* 11:146–152

- Hoenen A., Liu W., Kochs G., Khromykh A., Mackenzie J.** (2007). West Nile virus-induced cytoplasmic membrane structures provide partial protection against the interferon-induced antiviral MxA protein. *Journal of General Virology* 88(11): 3013- 3017.
- Höfle U., Blanco J.M., Crespo E., Naranjo V., Jiménez-Clavero M.A., Sanchez A., de la Fuente J., Gortazar C.** (2008). West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Vet. Microbiol.* 129 (1-2), 171–178.
- Holden K., Stein D., Pierson T., Ahmed A., Clyde K., Iversen P., Harris E.** (2006). Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stemloop structure. *Virology* 344(2):439–52.
- Holmes E. C.** (2008). Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 62:307–328.
- Holtmeier W., Kabelitz D.** (2005). Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical immunology and allergy* 86: 151–83.
- Holzinger D., Jorns C., Stertz S., Boisson-Dupuis S., Thimme R., Weidmann M., Casanova J.-L., Haller O., Kochs G.** (2007). Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *Journal of Virology* 81(14): 7776-85.
- Hori H., Lai C.-J.** (1990). Cleavage of dengue virus NS1-NS2A requires an octapeptide sequence at the C terminus of NS1. *J Virol* 64:4573–4577.
- Hovanessian A.** (2007). On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: The 2'–5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18(5-6), 351-361.
- Huang C.Y., Butrapet S., Pierro D.J., Chang G.J., Hunt A.R., Bhamarapavati N., Gubler D.J., Kinney R.M.** (2000). Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine, *J. Virol.* 74:3020–3028.
- Hubbard A. K., Rothlein R.** (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1379–1386
- Huhn G.D., Sejvar J.J., Montgomery S.P., Dworkin M.S.** (2003). West Nile Virus in the United States: An Update on an Emerging Infectious Disease. *American Family Physician* 68 (4): 653-660
- Hunsperger, E.A., Roehrig, J.T.** (2006). Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice. *J. Neurovirol.* 12:129–139

- Ihle J. N.** (1995). The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. *Seminars in Immunology* 7 (4): 247-54.
- Jacobsen I.D., Grosse K., Slesiona S., Hube B., Berndt A., Brock M.** (2010). Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect. Immun.* 78(7): 2995-3006.
- Jang-hann Chu J. et Ng M-L.** (2004). Interaction of West Nile Virus with $\alpha_v\beta_3$ Integrin Mediates Virus Entry into Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (52): 54533–54541
- Jeha L.E., Sila C.A., Lederman R.J., Prayson R.A., Isada C.M., Gordon S.M.** (2003). West Nile virus infection: a new acute paralytic illness. *Neurology* 61: 55-59.
- Jeurissen S. H. M.** (1991). Structure and function of the chicken spleen. *Res. Immunol.* 42:352–355.
- Johanning F. M., Conry R. M., LoBuglio A. F., Wright M., Sumerel L. A., Pike M. J., Curiel D. T.** (1995). A sindbis virus mRNA polynucleotide vector achieves prolonged and high level heterologous gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res.* 23:1495–1501.
- Johnston L.J., Halliday G.M., King N.J.** (2000). Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol* 114:560–568.
- Jones M., Davidson A., Hibbert L., Gruenwald P., Schlaak J., Ball S., Foster G. R., Jacobs M.** (2005a). Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J. Virol.* 79(9): 5414-20.
- Jones C., Patkar C., Kuhn R.** (2005b). Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 331:247–259.
- Jordan I., Briese T., Fischer N., Lau J. Y., Lipkin W. I.** (2000). Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J. Infect. Dis.* 182:1214–1217.
- Jourdain E., Toussaint Y., Leblond A., Bicout D.J., Sabatier P., Gauthier-Clerc M.** (2007). Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7 (1): 15–33.
- Jungreis I., Lin M.F., Spokony R., Chan C.S., Negre N., Victorsen A., White K.P., Kellis M.** (2011). Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoan. *Genome Research* 21: 2096-2113
- Kahler, S.C.** (2003). APHIS: West Nile virus vaccine safe for use. *J. Am.Vet. Med. Assoc.* 223 (4): 416–418

- Kajaste-Rudnitski A., Mashimo T., Frenkiel M.P., Guénet J.L., Lucas M., Desprès P.** (2006). The 2', 5'-Oligoadénylate Synthetase 1b Is a Potent Inhibitor of West Nile Virus Replication Inside Infected Cells. *J Biol Chem* 281 (6) : 4624-4637
- Kapoor M., Zhang L., Mohan P. M., Padmanabhan R.** (1995). Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene* 162:175–180.
- Kawai T., Akira S.** (2006) Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7: 131–137.
- Kelley T.W., Prayson R.A., Ruiz A.I., Isada C.M., Gordon S.M.** (2003). The neuropathology of West Nile virus meningoencephalitis. A report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 119: 749–753.
- Kerr I. M., Brown R. E.** (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *PNAS USA* 75 (1): 256–260.
- Kesson A. M., Blanden R. V., Mullbacher A.** (1987). The primary in vivo murine cytotoxic T cell response to the flavivirus, West Nile. *J. Gen. Virol.* 68(Pt. 7):2001–2006.
- Khromykh, A. A., Westaway E. G.** (1994). Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J.Virol.* 68:4580-4588
- Khromykh A.A., Westaway E.G.** (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* 71(2): 1497–505.
- Khromykh A. A., Varnavski A. N., Westaway E. G.** (1998). Encapsidation of the flavivirus Kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans. *J. Virol.* 72:5967–5977.
- Khromykh A.A., Sedlak P.L., Westaway E.G.** (1999). Trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin ns5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. *J Virol* 73 (11):9247–55.
- Khromykh A. A., Meka H., Guyatt K. J., Westaway E. G.** (2001a). Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *Journal of Virology* 75(14): 6719-28.
- Khromykh A.A., Varnavski A.N., Sedlak P.L., Westaway E.G.** (2001b) Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol* 75(10):4633–4640.

Références bibliographiques

- Kimura T., Ohyama A.** (1988). Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion, *J. Gen. Virol.* 69:1247–1254.
- Kinney R.M., Huang C.Y.H., Whiteman M.C., Bowen R.A., Langevin S.A., Miller B.R., Brault A.C.** (2006). Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J. of Gen. Virol.* 87:3611-3622.
- Klein R., Diamond M.S.** (2008). Immunological headgear: antiviral immune responses protect against neuroinvasive West Nile virus. *Trends in Molecular Medicine* 14(7):286-94.
- Komar N., Langevin S., Hinten S., Nemeth N., Edwards E., Hettler D., Davis B., Bowen R., Bunning M.** (2003). Experimental infection of North American birds with New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis*, 9 : 311-322
- Komar N., Clark G.G.** (2006). West Nile activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*, 19: 112-117
- Kong K.F., Wang X., Anderson J.F., Fikrig E., Montgomery R.R.** (2008a). West nile virus attenuates activation of primary human macrophages. *Viral Immunol* 21: 78–82.
- Kong K.F., Delroux K., Wang X., Qian F., Arjona A., Malawista S.E., Fikrig E., Montgomery R.R.** (2008b). Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly. *J Virol* 82: 7613–7623.
- Konishi E., Mason P.W.** (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 67(3):1672–1675.
- Kramer L.D., Li J., Shi P-Y.** (2007). West Nile virus *Lancet Neurol* 6: 171–81
- Kulkarni A.B., Mullbacher A., Blanden R.V.** (1991a). Functional analysis of macrophages, B cells and splenic dendritic cells as antigen-presenting cells in West Nile virus-specific murine T lymphocyte proliferation. *Immunol Cell Biol* 69: 71–80.
- Kulkarni A. B., Mullbacher A., Blanden R. V.** (1991b). In vitro T-cell proliferative response to the flavivirus, West Nile. *Viral Immunol.* 4:73–82.
- Kumar M., Verma S., Nerurkar V.R.** (2010). Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *J Neuroinflammation.* 31: 7-73.
- Kummerer B.M., Rice C.M.** (2002). Mutations in the yellow fever virus nonstructural NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 76 (10): 4773-4783

Kuno G. (1997). Factors influencing the transmission of dengue viruses, in: Gubler D.J., Kuno G. (Eds.), *Dengue and dengue hemorrhagic Fever*, CAB International, New York, 61–88.

Kutasi O., Bakonyi T., Lecollinet S., Biksi I., Ferenczi E., Bahuon C., Sardi S., Zientara S., Szenci O. (2011). Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *J Vet Intern Med.* 25(3):586-91.

Ladeau S.L., Kilpatrick A.M., Marra P.P. (2007). West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations, *Nature* 447:710–713.

Lai C. J., Zhao B. T., Hori H., Bray M. (1991). Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5139–5143.

Lai C.J., Monath T.P. (2003). Chimeric flaviviruses: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and Japanese encephalitis. *Adv. Virus Res.* 61: 469– 509.

Lanciotti R.S., Roehrig J.T., Deubel V., Smith J., Parker M., Steele K., Crise B., Volpe K.E., Crabtree M.B., Scherret J.H., Hall R.A., MacKenzie J.S., Cropp C.B., Panigrahy B., Ostlund E., Schmitt B., Malkinson M., Banet C., Weissman J., Komar N., Savage H.M., Stone W., McNamara T., Gubler D.J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286: 2333-7.

Lanciotti R.S., Ebel G.D., Deubel V., Kerst A.J., Murri S., Meyer R., Bowen M., McKinney N., Morrill W.E., Crabtree M.B., Kramer L.D., Roehrig J.T. (2002) Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe and the Middle East. *Virology* 298: 96-105.

Langevin S. A., Bunning M., Davis B., Komar N. (2001). Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7:726–729.

Langevin S.A., Arroyo J., Monath T.P., Komar N. (2003). Host-range restriction of chimeric yellow fever-West Nile vaccine in fish crows (*Corvus ossifragus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69 (1): 78– 80.

Langevin S., Bowen R., Ramey W., Sanders T., Maharaj P., Fang Y., Cornelius J., Barker C., Reisen W., Beasley D., Barrett A., Kinney R., Huang C., Brault A.C. (2011). Envelope and pre-membrane structural amino acid mutations mediate diminished avian growth and virulence of a Mexican West Nile virus isolate. *J Gen Virol.* 92(Pt 12):2810-20

Références bibliographiques

- Laurent-Rolle M., Boer E.F., Lubick K.J., Wolfenbarger J.B., Carmody A.B., Rockx B., Liu W., Ashour J., Shupert W.L., Holbrook M.R., Barrett A.D., Mason P.W., Bloom M.E., Garcia-Sastre A., Khromykh A.A., Best S.M.** (2010). The NS5 Protein of the Virulent West Nile Virus NY99 Strain Is a Potent Antagonist of Type I Interferon-Mediated JAK-STAT Signaling. *J. Virol.* 84 (7): 3503–3515
- Lawrie C.H., Uzategui N.Y., Gould E.A., Nuttall P.A.** (2004). Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg Infect Dis*, 10: 653-657
- Lecollinet S., Lefrançois T., Durand B., Leblond A., Dauphin G., De Goer J., Zientara S.** (2008). Surveillance de l'infection équine à virus West Nile en France. Bilan 2000-2007. *Epidémiologie et santé animale*, 54 : 69-80.
- Lecollinet S., Beck C., Zientara S.** (2012). Le virus West Nile : diagnostic, surveillance et évolution épidémiologique en Europe. *Bull. Acad. Vét. France - Tome 165 - N°1*
- Leppert D., Waubant E., Galardy R., Bunnett N. W., Hauser S. L.** (1995). T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J. Immunol.* 154:4379–4389
- Li W., Brinton M. A.** (2001). The 3' stem loop of the West Nile virus genomic RNA can suppress translation of chimeric mRNAs. *Virology* 287: 49–61.
- Li W., Li Y., Kedersha N., Anderson P., Emara M., Swiderek K. M., Moreno G. T., Brinton M. A.** (2002). Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *Journal of Virology* 76(23), 11989-2000.
- Li D.Q., Allison A. B., Stallknecht D. E., Fu Z. F.** (2005a). Proteomic Profiling and Neurodegeneration in West-Nile-Virus-Infected Neurons. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 3: 271–279
- Li J., Bhuvanakantham R., Howe J., Ng M.L.** (2005b). Identifying the region influencing the cis-mode of maturation of West Nile (Sarafend) virus using chimeric infectious clones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334:714-720
- Liljestrom P., Garoff H.** (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Bio/Technology* 9:1356–1361.
- Lim J. K., Lisco A., McDermott D.H., Huynh L., Ward J.M., Johnson B., Johnson H., Pape J., Foster G.A., Krysztof D., Follmann D., Stramer S.L., Margolis L.B., Murphy P.M.** (2009). Genetic Variation in OAS1 Is a Risk Factor for Initial Infection with West Nile Virus in Man *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000321

- Lin C., Amberg S.M., Chambers T.J., Rice C.M.** (1993). Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J Virol* 67(4):2327–2335.
- Lindenbach B.D., Rice C.M.** (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 73(6):4611–4621.
- Lindenbach B.D., Rice C.M.** (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59:23–61
- Lindenbach B.D., Thiel H.J., Rice C.M.** (2007). The Viruses and Their Replication. *Virology*, 5th Edition. D. M. Knipe and P. M. Howley, Flaviviridae: Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1101-1153
- Liu W.J., Chen H.B., Khromykh A.A.** (2003). Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J. Virol* 77 (14): 7804-13
- Liu W.J., Chen H.B., Wang X.J., Huang H., Khromykh A.A.** (2004). Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J Virol* 78(22):12225–12235.
- Liu W. J., Wang X. J., Mokhonov V. V., Shi P.-Y., Randall R., Khromykh, A. A.** (2005). Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J. Virol.* 79: 1934-1942.
- Liu W.J., Wang X.J., Clark D.C., Lobigs M., Hall R.A., Khromykh A.A.** (2006). A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol* 80(5):2396–2404.
- Lo L., Tilgner M., Shi P.Y.** (2003) A potential high-throughput assay for screening inhibitors of West Nile virus replication. *J Virol* 77(23):12901–12906.
- Lobigs M.** (1993). Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion requires the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6218–6222.
- Loeb K.R., Haas A.L.** (1992). The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem.* 15; 267(11):7806-13.
- Lorenz I.C., Allison S.L., Heinz F.X., Helenius A.** (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 76(11):5480–5491.

Références bibliographiques

- Lowenthal J. W., Connick T., McWaters P. G., York J. J.** (1994). Development of T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunol. Cell Biol.* 72:115–122.
- Lu G., Reinert J., Pitha-Rowe I., Okumura A., Kellum M., Knobloch K., Hassel B., Pitha P.** (2006). ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol* 52(1): 29-41.
- Lucas M., Frenkiel M-P, Mashimo T., Guénet J-L, Deubel V., Desprès P., Ceccaldi P.E.** (2004). The israeli strain IS-98-ST1 of West Nile virus as viral model for West Nile encephalitis in the Old world. *Virol J* 18: 1-9
- Lustig S., Danenberg H. D., Kafri Y., Kobiler D., Ben-Nathan D.** (1992). Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. *J. Exp. Med.* 176:707–712.
- Ma L., Jones C.T., Groesch T.D., Kuhn R.J., Post C.B.** (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(10):3414–3419.
- Ma D., Jiang D., Qing M., Weidner J.M., Qu X., Guo H., Chang J., Gu B., Shi P-Y., Block T.M., Guo J.T.** (2009). Antiviral effect of interferon lambda against West Nile virus. *Antiviral Res.* 83(1):53-60.
- Macdonald J., Tonry J., Hall R. A., Williams B., Palacios G., Ashok M. S., Jabado O., Clark D., Tesh R. B., Briese T., Lipkin W. I.** (2005). NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *J. Virol.* 79:13924–13933.
- Mackenzie J.M., Jones M.K., Young P.R.** (1996). Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220:232–240.
- Mackenzie J.M., Khromykh A.A., Jones M.K., Westaway E.G.** (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 245(2):203–215.
- Mackenzie J.M., Westaway E.G.** (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.* 75 (22): 10787-10799.
- Malet H., Massé N., Selisko B., Romette J.L., Alvarez K., Guillemot J.C., Tolou H., Yap T.L., Vasudevan S., Lescar J., Canard B.** (2008). The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* 80(1): 23-35.
- Malkinson M., Weisman Y., Pokamonski S., King R., Deubel V.** (2001a). Intercontinental transmission of West Nile virus by migrating white storks, *Emerg. Infect. Dis.* 7:540.

Références bibliographiques

- Malkinson M., Banet C., Khinich Y., Samina I., Pokamunski S., Weisman Y.** (2001b). Use of live and inactivated vaccines in the control of West Nile fever in domestic geese, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 951:255–261.
- Malkinson M., Banet C., Weisman Y., Pokamunski S., King R., Drouet M.T., Deubel V.** (2002). Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis.* 8(4):392-7.
- Manarolla G., Bakonyi T., Gallazzi D., Crosta L., Weissenbock H., Dorrestein G.M., Nowotny N.** (2010). Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet Microbiol*, 141: 159-163.
- Mandl C. W., Ecker M., Holzmann H., Kunz C., Heinz F. X.** (1997). Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J. Gen. Virol.* 78:1049–1057.
- Mashimo T., Lucas M., Simon-Chazottes D., Frenkiel M.P., Montagutelli X., Ceccaldi P.E., Deubel V., Guenet J.L., Despres P.** (2002). A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (17): 11311-11316.
- May F.J., Davis C.T., Tesh R.B., Barrett A.D.T.** (2011). Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the America. *J.Virol.* 85(6): 2964–2974
- Mazzon M., Jones M., Davidson A., Chain B., Jacobs M.** (2009). Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis* 200: 1261-1270.
- McCandless E.E., Zhang B., Diamond M.S., Klein R.S.** (2008). CXCR4 antagonism increases T cell trafficking in the central nervous system and improves survival from West Nile virus encephalitis. *PNAS* 105 (32): 11270–11275
- McLean R.G., Ubico S.R., Docherty D.E., Hansen W.R., Sileo L., McNamara T.S.** (2001) West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann N Y Acad Sci.* 951:54-7.
- Meade K.G., Higgs R., Lloyd A.T., Giles S., O'Farrelly C.** (2009). Differential antimicrobial peptide gene expression patterns during early chicken embryological development. *Dev Comp Immunol.* 33(4): 516-24.
- Meager A., Visvalingam K., Dilger P., Bryan D., Wadhwa M.** (2005). Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* 31(2), 109-18.

Références bibliographiques

- Medigeshi G.R., Lancaster A.M., Hirsch A.J., Briese T., Lipkin W.I., DeFilippis V., Früh K., Mason P.W., Nikolich-Zugich J., Nelson J.A.** (2007). West Nile Virus Infection Activates the Unfolded Protein Response, Leading to CHOP Induction and Apoptosis. *J. Virol.* 81 (20): 10849–10860
- Melian E.B., Hinzman E., Nagasaki T., Firth A.E., Wills N.M., Nouwens A.S., Blitvich B.J., Leung J., Funk A., Atkins J.F., Hall R., Khromykh A.A.** (2010). NS1' of Flaviviruses in the Japanese Encephalitis Virus Serogroup Is a Product of Ribosomal Frameshifting and Plays a Role in Viral Neuroinvasiveness. *J. Virol.* 84 (3): 1641–1647
- Mertens E., Kajaste-Rudnitski A., Torres S., Funk A., Frenkiel M-P., Iteman I., Khromykh A.A., Desprès P.** (2010). Viral determinants in the NS3 helicase and 2K peptide that promote West Nile virus resistance to antiviral action of 2', 5' oligoadenylate synthase 1b. *Virology* 399 (1): 176-185
- Meurs E., Chong K., Galabru J., Thomas N. S., Kerr I. M., Williams B. R., Hovanessian A. G.** (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62(2): 379- 90.
- Meurs E. F., Watanabe Y., Kadereit S., Barber G. N., Katze M. G., Chong K., Williams B.R., Hovanessian, A. G.** (1992). Constitutive expression of human doublestranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *Journal of Virology* 66(10), 5805-14.
- Miller S., Sparacio S., Bartenschlager R.** (2006). Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem.* 281(13):8854-63.
- Mishra M.K., Koli P., Bhowmick S., Basu A.** (2007). Neuroprotection conferred by astrocytes is insufficient to protect animals from succumbing to Japanese encephalitis. *Neurochem. Int.* 50: 764–773
- Mogensen K. E., Lewerenz M., Reboul J., Lutfalla G., Uzé G.** (1999). The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 19(10): 1069-98.
- Molenkamp R., Kooi E.A., Lucassen M.A., Greve S., Thijssen J.C., Spaan W.J., Bredenbeek, P.J.** (2003). Yellow Fever virus replicons as an expression system for hepatitis C virus structural proteins. *J. Virol.* 77: 1644– 1648.

Références bibliographiques

- Monaco F., Lelli R., Teodori L., Pinoni C., Di Gennaro A., Polci A., Calistri P., Savini G.** (2010). Re-Emergence of West Nile Virus in Italy. *Zoonoses Public Health*. 57(7-8):476-86
- Monini M., Falcone E., Busani L., Romi R., Ruggeri F.M.** (2010). West Nile Virus: Characteristics of an African Virus Adapting to the Third Millennium World. *The Open Virology Journal* 4: 42-51
- Morrey J., Smee D., Sidwell R., Tseng C.** (2002). Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. *Antivir. Res.* 55:107–116.
- Morrey J.D., Siddharthan V., Wang H., Hall J.O., Skirpstunas R.T., Olsen A.L., Nordstrom J.L., Koenig S., Johnson S., Diamond M.S.** (2008). West Nile virus-induced acute flaccid paralysis is prevented by monoclonal antibody treatment when administered after infection of spinal cord neurons. *J Neurovirol.* 14(2):152-63.
- Munoz-Jordan J.L., Sanchez-Burgos G.G., Laurent-Rolle M., Garcia-Sastre A.** (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (24):14333-8
- Munoz-Jordan J.** (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24): 14333-14338.
- Munoz-Jordan J.L., Laurent-Rolle M., Ashour J., Martinez-Sobrido L., Ashok M., Lipkin W.I., Garcia-Sastre A.** (2005). Inhibition of Alpha/Beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79: 8004–8013.
- Murgue B., Murri S., Zientara S., Durand B., Durand J.P., Zeller H.** (2001). West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 7(4):692–6.
- Murray K.O., Mertens E., Desprès P.** (2010) West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res* 41 (6): 67-81
- Muylaert I.R., Galler R.G., Rice C.M.** (1996). Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* 222:159–168.
- Nanduri S., Rahman F., Williams B. R., Qin J.** (2000). A dynamically tuned doublestranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J* 19(20), 5567-74.
- Nargi-Aizenman J.L., Havert M.B., Zhang M., Irani D.N., Rothstein J.D., Griffin D.E.** (2004). Glutamate receptor antagonists protect from virus-induced neural degeneration. *Ann. Neurol.* 55: 541–549

- Nasci R.S., Savage H.M., White D.J., Miller J.R., Cropp B.C., Godsey M.S., Kerst A.J., Bennett P., Gottfried K., Lanciotti R.S.** (2001). West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect dis*, 7: 742-744
- Nemeth N., Gould D., Bowen R., Komar N.** (2006). Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J. Wildl. Dis.* 42 (1), 1–13.
- Nemeth N.M., Bowen R.A.** (2007). Dynamics of passive immunity to West Nile virus in domestic chickens (*Gallus Gallus Domesticus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(2): 310–317
- Nemeth N. M., Oesterle P. T., Bowen R. A.** (2009). Humoral immunity to West Nile virus is long-lasting and protective in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80:864–869.
- Ng T., Hathaway D., Jennings N., Champ D., Chiang Y.W., Chu H.J.** (2003). Equine vaccine for West Nile virus. *Dev. Biol. (Basel)* 114: 221– 227.
- Nir Y., Beemer A., Goldwasser R.A.** (1965). West Nile Virus infection in mice following exposure to a viral aerosol. *Br J Exp Pathol.* 46(4):443-9.
- Nusbaum K.E., Wright J.C., Johnston W.B., Allison A.B., Hilton C.D., Staggs L.A., Stallknecht D.E., Shelnutt J.L.** (2003). Absence of humoral response in flamingos and red-tailed hawks to experimental vaccination with a killed West Nile virus vaccine. *Avian Dis.* 47 (3): 750– 752
- Nybakken G. E., Oliphant T., Johnson S., Burke S., Diamond M. S., Fremont D. H.** (2005). Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* 437:764–769.
- Okumura F., Zou W., Zhang D.-E.** (2007). ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes Dev* 21(3): 255-60.
- Oliphant T., Engle M., Nybakken G.E., Doane C., Johnson S., Huang L., Gorlatov S., Mehlhop E., Marri A., Chung K.M., Ebel G.D., Kramer L.D., Fremont D.H., Diamond M.S.** (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med.* 11(5):522-30.
- 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., Zaki S.R.** (2006). Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States. *Clin Infect Dis* 42(11):1527–35.
- Pang X., Zhang M., Dayton A.I.** (2001). Development of Dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. *BMC Microbiol.* 1-18.

Références bibliographiques

Papa A., Danis K., Baka A., Bakas A., Dougas G., Lytras T., Theocharopoulos G., Chrysagis D., Vassiliadou E., Kamaria F., Liona A., Mellou K., Saroglou G., Panagiotopoulos T. (2010). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July – August 2010. *Eurosurveillance* 15 (34) : 1-5

Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou K., Vázquez A., Tenorio A., Nowotny N. (2011): Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect Dis.* 17:920-922.

Pardridge W. M. (1983). Brain metabolism: a perspective from the bloodbrain barrier. *Physiol. Rev.* 63:1481–1535.

Perelygin A.A., Scherbik S.V., Zhulin I.B., Stockman B.M., Li Y., Brinton M.A. (2002). Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (14): 9322-7.

Pestka S., Langer J. A., Zoon K. C., Samuel C. E. (1987). Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56: 727-77.

Pestka S., Krause C. D., Walter M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.

Petersen L.R., Roehrig J.T. (2001). West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis* 7(4):611–4.

Petersen L.R., Roehrig J.T., Hughes J.M. (2002). West Nile virus encephalitis. *N Engl J Med* 347(16):1225–6.

Petersen L.R., Marfin A.A. (2002). West Nile virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med* 137(3):173–9.

Petersen L.R., Hayes E.B. (2008). West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am*, 92: 1307-1322, ix.

Pincus, S., P. Mason W., Konishi E., Fonseca B. A., Shope R. E., Rice C. M., Paoletti E. (1992). Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology* 187:290–297.

Platonov A.E., Shipulin G.A., Shipulina O.Y., Tyutyunnik E.N., Frolochkina T.I., Lanciotti R.S., Yazyshina S., Platonova O.V., Obukhov I.L., Zhukov A.N., Vengerov Y.Y. (2001). Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 7(1):128–32. 826

Platonov A.E., Karan L.S., Shopenskaia T.A., Fedorova M.V., Koliasnikova N.M., Rusakova N.M., Shishkina L.V., Arshba T.E., Zhuravlev V.I., Govorukhina M.V., Valentseva A.A., Shipulin G.A. (2011). Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2 : 29-37.

Pletnev A.G., Putnak R., Speicher J., Wagar E.J., Vaughn D.W. (2002). West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *PNAS U.S.A.* 99 (5): 3036–3041.

Polacek C., Foley J. E., Harris E. (2009a). Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region. *Journal of Virology* 83(2), 1161-6.

Polacek C., Friebe P., Harris E. (2009b). Poly(A)-binding protein binds to the nonpolyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol* 90 (Pt 3): 687-92.

Polo S., Ketner G., Levis R., Falgout B. (1997). Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J. Virol.* 71:5366–5374.

Potter P. (2004). North American birds and West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1518-1519.

Pradier S., Lecollinet S., Leblond A. (2012) West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev Tech OIE* Accepted.

Pugachev K., Guirakhoo F., Ocran S., Mitchell F., Parsons M., Penal C., Girakhoo S., Pougatcheva S., Arroyo J., Trent D., Monath T. (2004). High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. *J.Virol* 78 (2):1032-8

Puig-Basagoiti F., Deas T.S., Ren P., Tilgner M., Ferguson D.M., Shi P-Y. (2005). High-Throughput Assays Using a Luciferase-Expressing Replicon, Virus-Like Particles, and Full-Length Virus for West Nile Virus Drug Discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (12): 4980–4988

Puig-Basagoiti F., Tilgner M., Forshey B., Philpott S., Espina N., Wentworth Goebel S., Masters P.S., Falgout B., Ren P., Ferguson Shi P.Y. (2006). Triaryl pyrazoline compound inhibits flavivirus RNA replication. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4):1320–9.

Références bibliographiques

- Puig-Basagoiti F., Tilgner M., Bennett C.J., Zhou Y., Muñoz-Jordán J.L., García-Sastre A., Bernard K.A., Shi P-Y.** (2007). A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology*. 361(1): 229–241.
- Pushko P., Parker M., Ludwig G. V., Davis N. L., Johnston R. E., Smith J. F.** (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogenes in vivo. *Virology* 239:389–401.
- Qian F., Wang X., Zhang L., Lin A., Zhao H., Fikrig E., Montgomery R.R.** (2011). Impaired interferon signaling in dendritic cells from older donors infected in vitro with West Nile virus. *J Infect Dis* 203: 1415–1424.
- Quirin R., Salas M., Zientara S., Zeller H., Labie J., Murri S., Lefrancois T., Petitclerc M., Martinez D.** (2004). West Nile virus, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis*, 10: 706-708.
- Ramanathan M.P., Chambers J.A., Pankhong P., Chattergoon M., Attatippaholkun W., Dang K., Shah N., Weiner D.B.** (2006). Host cell Killing by the West Nile virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology* 345(1):56–72.
- Rawal A., Gavin P.J., Sturgis C.D.** (2006) Cerebrospinal fluid cytology in seasonal epidemic West Nile virus meningo-encephalitis. *Diagn Cytopathol* 34: 127–129.
- Rebouillat D., Hovanessian A. G.** (1999) *J. Interferon Cytokine Res.* 19: 295–308.
- Rice C. M., Grakoui A., Galler R., Chambers T. J.** (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol.* 1:285–296.
- Rios M., Zhang M. J., Grinev A., Srinivasan K., Daniel S., Wood O., Hewlett I. K., Dayton A.I.** (2006). Monocyte-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. *Transfusion* 46: 659-667
- Rios J.J., Fleming J.G.W., Bryant U.K., Carter C.N., Huber J.C., Long M.T., Spencer T.E., David L. Adelson D.L.** (2010). OAS1 Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to West Nile Encephalitis in Horses *PLoS ONE* 5 (5): e10537.
- Robinson M.J., Sancho D., Slack E.C., LeibundGut-Landmann S., Sousa C.** (2006) Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7: 1258–1265.
- Roehrig J.T., Layton M., Smith P., Campbell G.L., Nasci R., Lanciotti R.S.** (2002). The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance. *Curr Top Microbiol Immunol* 267:223–40.

Références bibliographiques

Romano P. R., Garcia-Barrio M. T., Zhang X., Wang Q., Taylor D. R., Zhang F., Herring C., Mathews M. B., Qin J., Hinnebusch A. G. (1998). Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol Cell Biol* 18(4), 2282-97.

Roosendaal J., Westaway E.G., Khromykh A., Mackenzie J.M. (2006). Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol* 80(9):4623–4632.

Rossi S.L., Zhao Q., O'Donnell V.K., 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: 457– 470

Rossi S.L., Fayzulin R., Dewsbury N., Bourne N., Mason P.W. (2007). Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence in vitro attenuate virus replication in vitro and in vivo. *Virology*. 364(1):184-95.

Rossini G., Cavrini F., Pierro A., Macini P., Finarelli A., Po C., Peroni G., Di Caro A., Capobianchi M., Nicoletti L., Landini M., Sambri V. (2008). First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 – case report. *Eur Surveill* 2008; 13.

Russell J. H., Ley T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20:323–370.

Saad M., Youssef S., Kirschke D., Shubair M., Haddadin D., Myers J., Moorman J. (2005). Acute flaccid paralysis: the spectrum of a newly recognized complication of West Nile virus infection. *J Infect* 51(2): 120–7.

Sadler A. J., Williams B. R. G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8(7): 559-68.

Saito T., Gale M. Jr (2007) Principles of intracellular viral recognition. *Curr Opin Immunol* 19: 17–23.

Sampson B. A., Ambrosi C., Charlot A., Reiber K., Veress J. F., Armbrustmacher V. (2000). The pathology of human West Nile Virus infection. *Hum. Pathol.* 31:527–531

Samuel C. E. (1979). Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(2), 600-4.

Samuel C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14(4): 778-809

Samuel C.E. (2002). Host genetic variability and West Nile virus susceptibility. *PNAS USA* 99 (18):11555-7

Samuel M.A., Diamond M.S. (2006). Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J. Virol.* 80: 9349–9360

Samuel M.A., Whitby K., Keller B.C., Marri A., Barchet W., Williams B.R., Silverman R.H., Gale M. Jr, Diamond M.S. (2006a). PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol* 80: 7009–7019.

Samuel M.A., Morrey J.D., Diamond M.S. (2006b). Caspase-3 dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* 81: 2614–2623

Samuel M.A., Morrey J.D., Diamond M.S. (2007). Caspase 3-Dependent Cell Death of Neurons Contributes to the Pathogenesis of West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* 81 (6): 2614–2623

Samuel M.A., Wang H., Siddharthan V., Morrey J.D., Diamond M.S. (2007). Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *PNAS.* 104 (43): 17140–17145

Sanchez M.D., Pierson T.C., McAllister D., Hanna S.L., Puffer B.A., Valentine L.E., Murtadha M.M., Hoxie J.A., Doms R.W. (2005). Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* 336(1):70–82.

Savage H.M., Ceianu C., Nicolescu G., Karabatsos N., Lanciotti R., Vladimirescu A., Laiv L., Ungureanu A., Romanca C., Tsai T.F. (1999). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serological and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 61: 600-11.

Savini G., Monaco F., Calistri P., Lelli R. (2008). Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Eurosurveillance* 27: 13.

Savini G., Monaco F., Terregino C., Di Gennaro A., Bano L., Pinoni C., De Nardi R., Bonilauri P., Pecorari M., Di Galleonardo L., Bonfanti L., Polci A., Calistri P., Lelli R. (2011) USUTU virus in Italy, an emergence or a silent infection? *Vet microbiol.* 151(3-4):264-74.

Scherret J.H., Poidinger M., Mackenzie J.S., Broom A.K., Deubel V., Lipkin W.I., Briese T., Gould E.A., Hall R.A. (2001). The relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg Infect Dis* 7: 697-705.

Schlick P., Taucher C., Schittl B., Tran J.L., Kofler R.M., Schueler W., von Gabain A., Meinke A., Mandl C.W. (2009). Helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$ of West Nile Virus capsid protein are dispensable for assembly of infectious virions. *J.Virol* 83 (11): 5581-5591.

Scholle F., Girard Y. A., Zhao Q., Higgs S., Mason P. W. (2004). trans-Packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. *J. Virol.* 78:11605–11614.

Schuffenecker I., Peyrefitte C.N., el Harrak M., Murri S., Leblond A., Zeller H.G. (2005). West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis.* 11(2):306-9.

Sejvar J.J., Haddad M.B., Tierney B.C., Campbell G.L., Marfin A.A., Van Gerpen J.A., Fleischauer A., Leis A.A., Stokic D.S., Petersen L.R. (2003) Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA* 290(4): 511–5.

Senne D. A., Pedersen J. C., Hutto D. L., Taylor W. D., Schmitt B. J., Panigrahy B. (2000). Pathogenicity of West Nile virus in chickens. *Avian Dis.* 44:642–649

Seregin A., Nistler R., Borisevich V., Yamshchikov G., Chaporgina E., Kwok C.W., Yamshchikov V. (2006) Immunogenicity of West Nile virus infectious DNA and its noninfectious derivatives. *Virology.* 356(1-2):115-25.

Shi P-Y., Brinton M. A., Veal J. M., Zhong Y. Y., Wilson W. D. (1996). Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. *Biochemistry* 35(13): 4222-30.

Shi P-Y., Tilgner M., Lo M.K., Kent K.A., Bernard K.A. (2002a). Infectious cDNA clone of the epidemic west nile virus from new york city. *J virol* 76 (2):5847-5856

Shi P. Y., Tilgner M., Lo M. K. (2002b). Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. *Virology* 296:219–233.

Shi P.-Y. (2003). Genetic systems of West Nile virus and their potential applications. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4:959–965.

Shieh W. J., Guarner J., Layton M., Fine A., Miller J., Nash D., Campbell G. L., Roehrig J. T., Gubler D. J., Zaki S. R. (2000). The role of pathology in an investigation of an outbreak of West Nile encephalitis in New York, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 6:370–372.

- Shirato K., Miyoshi H., Kariwa H., Takashima I.** (2006). The kinetics of proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages infected with envelope proteinglycosylated or non-glycosylated West Nile virus. *Virus Res* 121: 11–16.
- Shrestha B., Gottlieb D., and Diamond M.S.** (2003). Infection and Injury of Neurons by West Nile Encephalitis Virus. *J. Virol.* 77(24): 13203–13213
- Shrestha B., Diamond M.S.** (2004). Role of CD8+ T cells in control of west nile virus infection. *J. Virol.* 78 (15) 8312– 8321.
- Shrestha B., Samuel M. A., Diamond M. S.** (2006a). CD8+ T cells require perforin to clear West Nile virus from infected neurons. *J. Virol.* 80:119–129.
- Shrestha B., Wang T., Samuel M.A., Whitby K., Craft J., Fikrig E., Diamond M.S.** (2006b) Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J Virol* 80: 5338–5348.
- Siddharthan V., Wang H., Motter N.E., Hall J.O., Skinner R.D., Skirpstunas R.T., Morrey J.D.** (2009). *J. Virol.* 83 (9) : 4251–4261
- Simon-Chazotte D., Frenkiel M-P, Montagutelli X., Guénet J-L, Desprès P., Panthier J-J** (2011). Transgenic expression of full length 2',5'-oligoadenylate synthase 1b confers to BALB/c mice resistance against West Nile virus-induced encephalitis. *Virology* 417: 147-153.
- Sirbu A., Ceianu C.S., Panculescu-Gatej R.I., Vazquez A., Tenorio A., Reboreanu R., Niedrig M., Nicolescu G., Pistol A.** (2011). Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.* 16(2): 19762.
- Solomon T., Vaughn D. W.** (2002). Pathogenesis and clinical features of Japanese encephalitis and West Nile virus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267:171–19
- Sotelo E., Fernandez-Pinero J., Llorente F., Agüero M., Hoefle U., Blanco J.M., Jiménez-Clavero M.A.** (2009). Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology.* 395(2): 289-97.
- Sotelo E., Gutierrez-Guzmán A.V., Del Amo J., Llorente F., El-Harrak M., Pérez-Ramírez E., Blanco J.M., Höfle U., Jiménez-Clavero M.A.** (2011). Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Vet Res.* 42(1):11.

Sriburi R., Keelapang P., Duangchinda T., Pruksakorn S., Maneekarn N., Malasit P., Sittisombut N. (2001). Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid. *J. Virol. Methods* 92:71–82.

Stadler K., Allison S.L., Schlich J., Heinz F.X. (1997). Proteolytic activation of tickborne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71:8475–8481.

Staeheli P., Danielson P., Haller O., Sutcliffe J. G. (1986). Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol* 6(12): 4770-4.

Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R., Silverman R. H., Schreiber R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-64.

Steele K.E., Linn M.J., Schoepp R.J., Komar N., Geisbert T.W., Manduca R.M., Calle P.P., Raphael B.L., Clippinger T.L., Larsen T., Smith J., Lanciotti R.S., Panella N.A., McNamara T.S. (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York, *Vet. Pathol.* 37:208–224.

Steinman A., Banet C., Sutton G.A., Yadin H., Hadar S., Brill A. (2002). Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. *Vet Rec* 151(2):47–9.

Steinmetz H.M., Bokonyi T., Chvala S., Weissenböck H., Eulenberger U., Hatt J.M., Robert N., Hoop R., Nowotny N. (2007). Emergence of Usutu virus in Switzerland. *Proceedings 43rd International Symposium on Diseases of Zoo and Wild Animals*, Edinburgh, 129-131.

Steinmetz H.W., Bakonyi T., Weissenböck H., Hatt J.M., Eulenberger U., Robert N., Hoop R., Nowotny N.(2011). Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland--genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet Microbiol.* 148(2-4):207-12.

Stertz S., Reichelt M., Krijnse-Locker J., Mackenzie J., Simpson J. C., Haller O., Kochs G. (2006). Interferon-induced, antiviral human MxA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum. *J Interferon Cytokine Res* 26(9), 650-60.

Sumiyoshi H., Hoke C. H., Trent D. W. (1992). Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J. Virol.* 66:5425–5431.

Suthar M.S., Ma D.Y., Thomas S., Lund J.M., Zhang N., Daffis S., Rudensky A.Y., Bevan M.J., Clark E.A., Kaja M.K., Diamond M.S., Gale M. Jr. (2010). IPS-1 is essential for the control of West Nile virus infection and immunity. *PLoS Pathog* 6: e1000757.

Références bibliographiques

Swayne D.E., Beck J.R., Smith C.S., Shieh W.J., Zaki S.R. (2001). Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus, *Emerg. Infect. Dis.* 7:751–753.

Takahashi K., Ip W.E., Michelow I.C., Ezekowitz R.A. (2006) The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol* 18: 16–23.

Takeuchi T., Kobayashi T., Tamura S., Yokosawa H. (2006). Negative regulation of protein phosphatase 2C β by ISG15 conjugation. *FEBS Letters* 580(18): 4521–6.

Tardei G., Ruta S., Chitu V., Rossi C., Tsai T.F., Cernescu C. (2000). Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J Clin Microbiol* 38(6):2232–9.

Taylor D. R., Lee S. B., Romano P. R., Marshak D. R., Hinnebusch A. G., Esteban M., and Mathews, M. B. (1996). Autophosphorylation sites participate in the activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR. *Mol Cell Biol* 16(11): 6295–302.

Tesh R.B., Travassos da Rosa A.P., Guzman H., Araujo T.P., Xiao S.Y. (2002a). Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* 8(3):245–51.

Tesh R.B., Arroyo J., Travassos Da Rosa A.P., Guzman H., Xiao S.Y., Monath T.P. (2002b). Efficacy of killed virus vaccine, live attenuated chimeric virus vaccine, and passive immunization for prevention of West Nile virus encephalitis in hamster model. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (12): 1392– 1397.

Thurner C., Witwer C., Hofacker I. L., Stadler P. F. (2004). Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol* 85(Pt 5): 1113–24.

Toussaint J.F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. (2007) Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments *Journal of Virological Methods* 140 (2007) 115–123

Town T., Bai F., Wang T., Kaplan A.T., Qian F., Montgomery R.R., Anderson J.F., Flavell R.A., Fikrig E. (2009). Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity* 30: 242–253.

Tsai T.F., Popovici F., Cernescu C., Campbell G.L., Nedelcu N.I. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352(9130):767–71.

Turell M.J., O’Guinn M.L., Oliver J. (2000). Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg* 62: 413–414.

Turell M.J., O’Guinn M.L., Dohm D.J., Jones J.W. (2001). Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 38: 130–134.

Turell M.J., O'Guinn M.L., Dohm D.J., Webb J.P. Jr, Sardelis M.R., (2002 a). Vector competence of *Culex tarsalis* from Orange County, California, for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2: 193–196.

Turell M.J., Sardelis M.R., O'Guinn M.L., Dohm D.J. (2002 b). Potential vectors of West Nile virus in North America. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 241–250.

Tyler K.L., Pape J., Goody R.J., Corkill M., Kleinschmidt-DeMasters B.K. (2006). CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis. *Neurology* 66: 361–365.

van Marle G., Antony J., Ostermann H., Dunham C., Hunt T., Halliday W., Maingat F., Urbanowski M.D., Hobman T., Peeling J., Power C. (2007). West Nile Virus-Induced Neuroinflammation: Glial Infection and Capsid Protein-Mediated Neurovirulence. *J. Virol.* 81(20): 10933–10949

Varnavski A.N., Young P.R., Khromykh A.A. (2000). Stable High-Level Expression of Heterologous Genes In Vitro and In Vivo by Noncytopathic DNA-Based Kunjin Virus Replicon Vectors. *J. Virol.* 74 (9): 4394–4403

Vazquez S., Guzman M. G., Guillen G., Chinea G., Perez A. B., Pupo M., Rodriguez R., Reyes O., Garay H. E., Delgado I., Garcia G., Alvarez M. (2002). Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine* 20:1823–1830.

Vazquez A., Sanchez-Seco M.P., Ruiz S., Molero F., Hernandez L., Moreno J. , Magallanes A., Tejedor C.G., Tenorio A. (2010). Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 16:549–52.

Verma S., Lo Y., Chapagain M., Lum S., Kumar M., Gurjav U., Luo H., Nakatsuka A., Nerurkar V.R. (2009). West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology* 385(2):425-33.

Volk D. E., Beasley D. W., Kallick D. A., Holbrook M. R., Barrett A. D., Gorenstein D. G. (2004). Solution structure and antibody binding studies of the envelope protein domain III from the New York strain of West Nile virus. *J. Biol. Chem.* 279:38755–38761.

Wang T., Scully E., Yin Z., Kim J.H., Wang S., Yan J., Mamula M., Anderson J.F., Craft J., Fikrig E. (2003a). IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. *J Immunol* 171: 2524–2531.

Wang Y., Lobigs M., Lee E., Mullbacher A. (2003b). CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* 77:13323–13334.

Wang T., Town T., Alexopoulou L., Anderson J.F., Fikrig E., Flavell R.A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10: 1366–1373

Wang P., Dai J., Bai F., Kong K.F., Wong S.J., Montgomery R.R., Madri J.A., Fikrig E. (2008). Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile virus entry into the brain. *J Virol* 82: 8978–8985.

Wang H., Siddharthan V., Hall J.O., Morrey J.D. (2009). West Nile virus preferentially transports along motor neuron axons after sciatic nerve injection of hamsters. *J Neurovirol.* 4:1-7.

Ward M.P., Levy M., Thacker H.L., Ash M., Norman S.K., Moore G.E., Webb P.W. (2004). Investigation of an outbreak of encephalomyelitis caused by West Nile virus in 136 horses. *J Am Vet Med Assoc* 225(1):84–9.

Ward M. R., Stallknecht D. E., Willis J., Conroy M. J., Davidson W. R (2006). Wild bird mortality and West Nile virus surveillance: Biases associated with detection, reporting, and carcass persistence. *J. Wildl. Dis.* 42:92–106.

Weaver S.C., Brault A.C., Kang W., Holland J.J. (1999). Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells, *J. Virol.* 73:4316–4326.

Weinberger M., Pitlik S.D., Gandacu D., Lang R., Nassar F., Ben David D., Rubinstein E., Izthaki A., Mishal J., Kitzes R., Siegman-Igra Y., Giladi M., Pick N., Mendelson E., Bin H., Shohat T. (2001). West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis* 7(4):686–91.

Weingartl H. M., Drebot M. A., Hubalek Z., Halouzka J., Andonova M., Dibernardo A., Cottam-Birt C., Larence J., Marszal P. (2003). Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Can. J. Vet. Res.* 67:128–132.

Weissenbock H., Kolodziejek J., Url A., Lussy H., Rebel-Bauder B., Nowotny N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis*, 8: 652-656

Weissenbock H., Kolodziejek J., Fragner K., Kuhn R., Pfeffer M., Nowotny N. (2003). Usutu virus activity in Austria, 2001-2002. *Microbes Infect*, 5: 1132-1136.

Welgus H. G., Campbell E. J., Cury J. D., Eisen A. Z., Senior R. M., Wilhelm S. M., Goldberg G. I. (1990). Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J. Clin. Investig.* 86:1496–1502.

Welte T., Reagan K., Fang H., Machain-Williams C., Zheng X., Mendell N., Chang G.J., Wu P., Blair C.D., Wang T. (2009) Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection. *J Gen Virol* 90: 2660–2668.

Wengler G. (1993). The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* 197(1):265–273.

Westaway E.G. (1987). Flavivirus replication strategy, *Adv. Virus Res.* 33:45–90.

Westaway E.G., Mackenzie J.M., Kenney M.T., Jones M.K., Khromykh A.A. (1997). Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol* 71(9):6650–6661.

Westaway E.G., Mackenzie J.M., Khromykh A.A. (2002). Replication and gene function in Kunjin virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 267:323–351.

Westaway E.G., Mackenzie J.M., Khromykh A.A. (2003). Kunjin RNA replication and application of Kunjin replicons. *Advances in Virus Research.* 59: 99-140

Whiteman M.C., Li L., Wicker J.A., Kinney R.M., Huang C., Beasley D.W., Chung K.M., Diamond M.S., Solomon T., Barrett A.D. (2010). Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus. *Vaccine.* 28(4):1075-83.

Wicker J.A., Whiteman M.C., Beasley D.W.C., Todd Davis C., Zhang S., Schneider B.S., Higgs S., Kinney R.M., Barrett A.D.T. (2006). A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology* 349(2): 245-253

Wilson J.R., de Sessions P.F., Leon M.A., Scholle F. (2008). West Nile Virus Nonstructural Protein 1 Inhibits TLR3 Signal Transduction. *J. Virol.* 82 (17): 8262–8271

Yamshchikov V.F., Compans R.W. (1994). Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study. *J Virol* 68(9):5765–5771.

Yamshchikov V. F., Wengler G., Perelygin A. A., Brinton M. A., Compans R. W. (2001a). An infectious clone of the West Nile flavivirus. *Virology* 281:294–304

Yamshchikov V., Mishin V., Cominelli F. (2001b). A new strategy in design of _RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology* 281:272–280.

Yamshchikov G., Borisevich V., Seregin A., Chaporgina E., Mishina M., Mishin V., Kwok C.W., Yamshchikov V. (2004). An attenuated West Nile prototype virus is highly immunogenic and protects against the deadly NY99 strain: a candidate for live WN vaccine development. *Virology*. 330(1):304-12.

Yang J.S., Ramanathan M.P., Muthumani K., Choo A.Y., Jin S.H., Yu Q.C., Hwang D.S., Choo D.K., Lee M.D., Dang K., Tang W., Kim J.J., Weiner D.B. (2002). Induction of Inflammation by West Nile virus Capsid through the Caspase-9 Apoptotic Pathway. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (12): 1379-84.

Yaremych S. A., Warner R. E., Mankin P. C., Brawn J. D., Raim A., Novak R. (2004). West Nile virus and high death rate in American crows. *Emerg. Infect. Dis.* 10:709–711.

Ying H., Zaks T. Z., Wang R.-F., Irvine K. R., Kammula U. S., Marincola F. M., Leitner W. W., Pestifo N. P. (1999). Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat. Med.* 7:823–827.

You S., Padmanabhan R. (1999). A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J Biol Chem* 274(47): 33714-22.

Yu X., Lin S.G., Huang X.R., Bacher M., Leng L., Bucala R., Lan H.Y. (2007). Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. *J. Interferon Cytokine Res.* 27: 103–109

Yu L., Putnak J.R., Pletnev A.G., Markoff L. (2008). Attenuated West Nile viruses bearing 3'SL and envelope gene substitution mutations. *Vaccine* 26 (47): 5981-5988

Zeller H.G., Murgue B. (2001). Rôle des oiseaux migrateurs dans l'épidémiologie du virus West Nile. *Med. Mal. Infect.*, 31 (suppl 2) : 168s-174s

Zeller H.G., Schuffenecker I. (2004). West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 3:147-56.

Zhang S., Li L., Woodson S.E., Huang C.Y., Kinney R.M., Barrett A.D., Beasley D.W. (2006). A mutation in the envelope protein fusion loop attenuates mouse neuroinvasiveness of the NY99 strain of West Nile virus. *Virology* 353 (1): 35-40.

Zhang S., Bovshik E.I., Maillard R., Gromowski G.D., Volk D.E., Schein C.H., Huang C.Y., Gorenstein D.G., Lee J.C., Barrett A.D., Beasley D.W. (2010) Role of BC loop residues in structure, function and antigenicity of the West Nile virus envelope protein receptor-binding domain III. *Virology*. 403(1):85-91.

Zhao C., Denison C., Huibregtse J. M., Gygi S., Krug R. M. (2005). Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(29): 10200-5.

Zou G., Puigbasagoiti F., Zhang B., Qing M., Chen L., Pankiewicz K., Felczak K., Yuan Z., Shi P. (2008). A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology* 384, 242-252.

Zientara S. (2002). Infection à virus West Nile, situation épidémiologique, risque pour l'Homme et épizootie en France (2000-2001). *Bull. Acad. Vét. France*, 155 : 67-72.

Zientara S, Lecollinet S. (2010). Le virus West Nile, sa diffusion limitée en Europe par comparaison avec sa rapide implantation en Amérique du Nord. *Rapports de l'Académie Nationale de Médecine*, Edition Lavoisier. Chapitre 13, p179-193.

ANNEXE

Equine Encephalomyelitis Outbreak Caused by a Genetic Lineage 2 West Nile Virus in Hungary

O. Kutasi, T. Bakonyi, S. Lecollinet, I. Biksi, E. Ferenczi, C. Bahuon, S. Sardi, S. Zientara, and O. Szenci

Background: The spread of lineage 2 West Nile virus (WNV) from sub-Saharan regions to Europe and the unpredictable change in pathogenicity indicate a potential public and veterinary health threat and requires scientific awareness.

Objectives: To describe the results of clinical and virological investigations of the 1st outbreak of a genetic lineage 2 WNV encephalomyelitis in horses.

Animals: Seventeen horses with neurologic signs.

Methods: Information regarding signalment, clinical signs, and outcome was obtained for each animal. Serology was performed in 15 cases, clinicopathological examination in 7 cases, and cerebrospinal fluid was collected from 2 horses. Histopathology was carried out in 4 horses, 2 of which were assessed for the presence of WNV in their nervous system.

Results: WNV neutralizing antibody titers were between 10 and 270 (median, 90) and the results of other serological assays were in agreement with those of the plaque reduction neutralization test. Common signs included ataxia, weakness, asymmetric gait, muscle tremors, hypersensitivity, cranial nerve deficits, and recumbency. Twelve animals survived. Amplicons derived from the infection-positive specimens allowed molecular characterization of the viral strain.

Conclusions and Clinical Importance: From our results, we conclude that this outbreak was caused by a lineage 2 WNV strain, even though such strains often are considered nonpathogenic. Neurological signs and survival rates were similar to those reported for lineage 1 virus infections. The disease occurrence was not geographically limited as had been the typical case during European outbreaks; this report describes a substantial northwestern spread of the pathogen.

Key words: Horse; Nervous system; West Nile virus.

Phylogenetic studies have identified 2 main lineages of West Nile virus (WNV) strains. Strains from lineage 1 are present in Africa, India, and Australia and are responsible for outbreaks in Europe, in the Mediterranean Basin, and in North America, whereas lineage 2 strains have been reported only in sub-Saharan Africa and Madagascar.^{1–3} The higher morbidity and mortality rates because of WNV lineage 1 strains relative to lineage 2 strains led to the supposition that lineage 1 strains are highly pathogenic whereas lineage 2 strains endemic to Africa are less virulent.⁴ However, it was subsequently demonstrated that lineage 2 strains also may cause severe disease.¹ Furthermore, experiments using mice showed marked differences in the neuroinvasive phenotype that did not correlate with the lineages, suggesting that highly and less neuroinvasive phenotypes exist in both lineages.¹ In Hungary, the WNV strain that causes lethal encephalitis emerged in geese in 2003 but there were no recognized equine clinical cases or positive postmortem diagnoses established until the autumn of 2007. In 2004 and 2005, lethal WNV encephalitis was recorded in birds of prey and in a single sheep.^{5,6} A lineage 1 strain was detected in 2003 from geese, and this strain exhibited the closest genetic relationship to the strains isolated in Israel in 1998 and to the strain that emerged in the United States in 1999.⁷ The cases from 2004 and 2005, and an equine case from 2007, were caused by a strain belonging to lineage 2 that was previously isolated only in sub-Saharan Africa.^{5,8} In 2008, WNV was found to be responsible for neurological conditions in horses in Italy, in addition to Hungary.⁹

Abbreviations:

BLAST	basic local alignment search tool
CSF	cerebrospinal fluid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assays
FAM	6-carboxy-fluorescein
HIT	hemagglutination inhibition test
IFAT	indirect fluorescent antibody test
MEGA	molecular evolutionary genetic analysis
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PRNT ₉₀	plaque reduction neutralization test, endpoint 90% neutralization level
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction)
TAMRA	6-carboxytetramethyl-rhodamine;
WBC	white blood cell
WNV	West Nile virus

From the Large Animal Clinic, Faculty of Veterinary Science, Szent Istvan University, Ullo, Hungary (Kutasi, Biksi, Sardi, Szenci); Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Science, Szent Istvan University, Budapest, Hungary (Bakonyi); ANSES, Animal Health Laboratory, UMR1161 INRA, ANSES, ENVA, Maisons-Alfort, France (Lecollinet, Bahuon, Zientara); and Department of Virology, National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary (Ferenczi). This work was performed in the Large Animal Clinic of Faculty of Veterinary Science, Szent Istvan University, Hungary. This work was presented at Congress of the British Equine Veterinary Association, 2009, Birmingham, 55th Annual Convention American Association of Equine Practitioners, 2009, Las Vegas.

Corresponding author: Orsolya Kutasi, Large Animal Clinic, Faculty of Veterinary Science, Szent Istvan University, H-2225, Dora major, Ullo, Hungary; e-mail: kutasi.orsolya@aotk.szie.hu

Submitted June 22, 2010; Revised December 23, 2010; Accepted February 15, 2011.

Copyright © 2011 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/j.1939-1676.2011.0715.x

The aim of the present study is to describe the results of clinical and virological investigations of the 1st outbreak of a genetic lineage 2 WNV encephalomyelitis in horses in Hungary.

Materials and Methods

Clinical and virological data were collected from 17 horses showing neurological symptoms between August and October in 2008. None of the horses were vaccinated for WNV.

Routine physical and specific neurological examinations were undertaken for all horses. Venous blood was withdrawn from 7 horses for CBC with an automated hematology analyzer,^a and serum biochemistry including glucose, protein, and various enzymes with a spectrophotometer.^b Cerebrospinal fluid (CSF) was collected from the atlantooccipital space after induction of general anesthesia with xylazine^c (1.1 mg/kg), diazepam^d (0.1 mg/kg), and ketamine^e (2.2 mg/kg) in 2 cases showing signs of encephalitis. The appearance of the CSF and cytological features, protein concentration, and specific IgG concentration in the CSF were determined.

Complete necropsy was carried out in 4 horses, and representative samples of the central nervous system were fixed in 10% neutral buffered formalin and processed routinely for histopathology. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin.

Fifteen horses were serologically tested, and WNV infection was proven by histopathology and polymerase chain reaction (PCR) examinations in 2 other cases. Antibody responses such as IgM, IgG, or neutralizing responses were evaluated according to the World Organization for Animal Health guidelines by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) or the plaque reduction neutralization (PRNT₅₀) test. Sera also were tested with the hemagglutination inhibition test (HIT) and indirect fluorescent antibody tests (IFAT). IFAT was used for the detection of WNV IgG and IgM antibodies on in-house slides. Vero cells^f were infected with a lineage 1 WNV strain that was isolated in Hungary.¹⁰ This strain's nucleotide sequence is similar to the Eg 101 prototype strain (isolated in Egypt in 1951, unpublished data). The infected cells were harvested on the 3rd day after infection, trypsinized, and spotted on slides. The IgG content of sera were tested first at a 1:10 dilution of serum and at subsequent 2-fold dilutions, and then incubated in a wet chamber for 1 hour 37°C, washed (3 times for 5–10 minutes and incubated for 30 minutes with fluorescein-conjugated anti-horse IgG^g in a wet chamber at 37°C. Sera tested for IgM were chromatographed by ion-exchange chromatography¹¹ and examined at final serum dilutions of 1:10 and 1:20 and incubated for 3 hours in a wet chamber at 37°C. After washing (3 times for 5–10 minutes), the samples were incubated for 30 minutes with anti-horse IgM conjugate^g in a wet chamber at 37°C. CSF samples were tested undiluted for IgG and IgM. Positive cases were examined for other flavivirus infections (tick-borne encephalitis and Usutu viruses) by performing parallel tests. Paired sera were always titrated side-by-side on the same antigen.

The HIT using an in-house hemagglutinating antigen was performed by the classical method described previously.¹²

In an attempt to characterize the virus, isolation, nested reverse transcriptase (RT)-PCR, real-time RT-PCR, and sequencing techniques were used. Peripheral blood samples from 10 symptomatic horses were collected in 4 mL collection tubes containing tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K₃EDTA).^h Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from the buffy coat fractions of the blood samples with Buffer L, which is an erythrocyte lysis buffer.ⁱ Nervous system tissues from the lumbosacral region of a 6-month-old foal and from the brainstem of an 8-year-old mare were examined. Brain and spinal cord samples were frozen and stored at –80°C before virological investigations. Nervous system tissue samples first were homogenized in ceramic mortars with sterile quartz sand, and the homogenates were suspended in Minimal Essential Medium.^j Organ samples were centrifuged at 1,500 × g for 10 minutes, and viral RNA was extracted from 140 µL of the supernatants with the QIAamp Viral RNA Mini Kit.ⁱ Viral RNA also was purified from the PBMCs with the same kit according to the specific protocol provided by the manufacturer. The WNV nucleic acid was amplified by RT-PCR as described previously.⁸

Samples first were tested with a universal Japanese encephalitis virus specific serocomplex,¹³ as well as with WNV lineage 1 and lineage 2 specific oligonucleotide primer pairs. The samples additionally were tested with a TaqMan technology-based real-time RT-PCR assay. The target region of the assay is the NS3 protein coding region of the WNV lineage 2 strain's genome (genomic primer: WNV 5009f, 5'-GAACGTCAGGTTCCCCCATT-3'; complementary primer: WNV 5103r, 5'-GGCGCTTATGTATGAACCATTAGG-3'; TaqMan probe: WNV 5050p, FAM-5'-ATTGGATTGTATGGAAACGGCGTCATC-3'-TAMRA). The SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System Kit^k was used for the amplifications according to the manufacturer's instructions; primers and probe were applied at a 0.2 µM concentration. Reaction mixtures (25 µL) contained 2.5 µL template RNA, and all samples were tested in duplicate. Amplifications were performed in an 7,300 Real-Time PCR System^l with 96-well plates. The thermal profile of the reactions were as follows: 48°C for 15 minutes (RT), 95°C for 2 minutes (Taq activation), and 45 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 30 seconds (amplification).

Nucleotide sequences of the amplification products were determined by the fluorescence-based direct sequencing method. Sequences were identified by a BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and were subjected to phylogenetic analysis by the neighbor-joining statistical algorithm. Details of the methods have been described earlier.⁸

Specimens that were diagnosed as WNV positive by RT-PCR were subjected to virus isolation by inoculation into suckling mouse brain and in Vero cell lines, as described previously.³ Isolates were identified by partial nucleic acid sequence determination after RT-PCR on the 2nd or 3rd passages.

Results

The mean age of the affected horses was 8.0 (SD, 3.8) years, ranging from a 6-month-old Thoroughbred Colt to a 16-year-old Standardbred mare. Affected horses included 8 mares, 6 geldings, and 3 stallions, and originated from different parts of the country with a distribution that was reflective of the typical hospital population. Most of the horses were Standardbreds (10/17), but Thoroughbreds (3/17), Shetland Ponies (3/17), and 1 Friesian also were diagnosed with the disease.

The 1st case occurred on August 26 and the last one on October 10, 2008 (Fig 1). Only 3 horses had low-grade fever at the onset of the disease. The most common signs were ataxia (in 13/17 of cases) and weakness (in 13/17 of cases). Weakness and ataxia were more pronounced in the forelimbs in 4 horses and an asymmetric gait was observed in another 4 horses. Fasciculation of triceps, quadriceps, head, and neck muscles (7/17), hypersensitivity (5/17), and muscle rigidity (5/17) also were observed. Two horses showed behavioral changes and 4 had signs of cranial nerve deficits such as dysphagia, salivation, and unilateral facial paralysis. There was progression of paresis to tetraplegia and recumbency in 7 horses, 5 of which were euthanized or died. Nine animals completely recovered within 2 months, whereas 3 horses continued to show signs of facial paralysis, hindlimb ataxia, or both at 6 months after the acute phase. Serological investigations indicated positive antibody responses in all tested horses. Serology was considered confirmatory for acute WNV infection when a 4-fold increase was found for IgG in 2 serum samples of 1 animal,

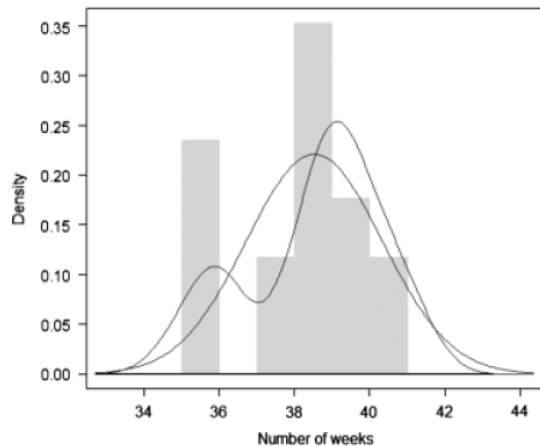


Fig 1. Histogram of the number of cases with estimated normal curve and estimated general density curve.

IgM positivity in at least one of the methods used or both. Neutralizing antibody titers ranged between 10 and 270 (median, 90) at 2–35 days after the onset of clinical signs. Results of other serological assays were in agreement with the PRNT₉₀ test. Hematology was usually negative but showed increased white blood cell (WBC) count and neutrophilia in 3 fatal cases. Metabolic profiles were within reference values, except for increased plasma protein concentration (> 8.9 g/dL) in some horses (n = 2) and high creatine kinase activity in recumbent animals (> 3,233 IU/L). The 2 CSF samples were clear and colorless but revealed pleocytosis with mainly neutrophils and a low number of small lymphocytes on cytology, increased protein level (> 210 mg/dL), and one showed a weak antibody response. Gross pathology was negative in each case. The neuropathological pattern was characterized by lymphocytic-plasmacytic perivascular infiltration and gliosis and some focal neutrophil-granulocyte infiltration with neuronal degeneration (Fig 2). Alterations mostly were found in the brainstem, medulla,

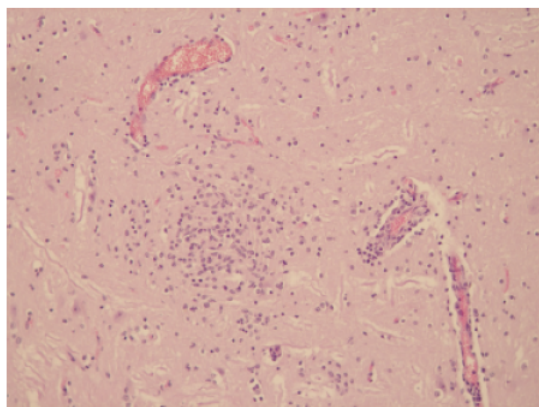


Fig 2. Focal glial proliferation and nonsuppurative perivascularitis and encephalitis because of West Nile virus lineage 2 infection; horse brain, hematoxylin-eosin, 200 ×.

and gray matter of the spinal cord, with the most severe lesions in the cervico-thoracic and in lumbar regions. Two horses were assessed for the presence of WNV in their nervous system (brainstem and lumbar region) by RT-PCR; both specimens were positive and allowed for molecular characterization of the viral strain. PCR testing on leukocytes resulted in 1 of 10 horses testing positive for WNV. The phylogenetic tree that was drawn after multiple alignment with diverse lineage 1 and 2 strains clearly shows that the currently circulating WNV in Hungary belongs to lineage 2 (Fig 3).

Discussion

The Hungarian equine WNV outbreak reported herein was the first to be caused by a lineage 2 sub-Saharan strain in Europe. The pathogenicity of this lineage 2 strain resembled that of lineage 1 strains, and its sudden spread was unpredictable.

The survival rate in our study was approximately 70%, which is similar to the data previously reported for lineage 1 outbreaks.^{9,14} In our study, 25% of horses had sequelae at approximately 6 months after the diagnosis. In a study by Wilson et al,¹⁵ 40% of the horses in an outbreak in the United States experienced permanent nervous system abnormalities. In contrast, full recoveries were reported in a small outbreak in Italy in 1998, in which 8 survivors had no permanent sequelae.¹⁶ Horse owners' perception of what constituted a full recovery was not reliable. Only 1 horse owner reported gait abnormality, but sequelae were detected upon veterinary re-evaluations in the other 2 cases. Weakness, ataxia, and paralysis are typical features of nervous system involvement in WNV infections, but these usually develop primarily in the hindquarters.^{14,15,17,18} In four of our cases, the signs were more prominent in the forelimbs at the onset of the disease. Fever and cranial nerve abnormalities have been observed in some previous outbreaks.^{16,17} Forelimb ataxia, asymmetric gait and head posture, fever, and hyperexcitability also were described in a South African retrospective study on lineage 2 equine infections.¹⁹ Factors other than the strain alone may account for the clinical manifestation of disease. Individual factors of receptivity also are thought to be of major importance for the evolution and clinical expression of WNV infection. Indeed, several authors have demonstrated that variations in certain loci of the host's genome influenced susceptibility and clinical presentation.²⁰ Furthermore, the presence of antibodies against other flaviviruses is thought to play a role in determining the clinical presentation in certain areas.²¹

In the report by Cantile,²⁰ detailed laboratory results were lacking in many case descriptions, but hematology was found to be negative in most horses. We found pronounced increases in WBC counts with neutrophilia in 3 cases. Regarding human cases with central nervous system involvement, increased WBC counts were reported in approximately 40% of patients in an Israeli outbreak, and mild increases in mean WBC count and prolonged lymphocytopenia have been reported in several US cases.²² Neutrophil predominance in CSF was a unique finding among clinical data in horses, but it is

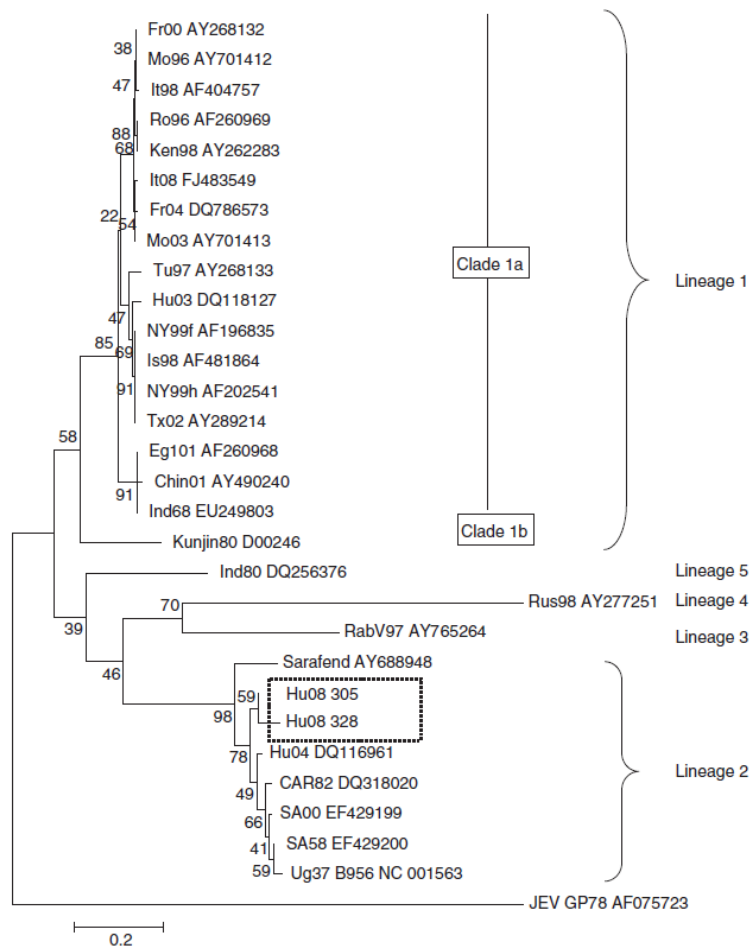


Fig 3. Phylogenetic tree of West Nile virus strains based on a 282nt fragment of the Envelope gene. The tree was constructed with the program MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) by neighbor-joining. Bootstrap confidence level (1,000 replicates) and a confidence probability value based on the standard error test were calculated by MEGA. WNV strains are named according to the following rules: a set of letters corresponding to the place where the strain was isolated (Fr, France; Mo, Morocco; It, Italy; Ro, Romania; Ken, Kenya; Tu, Tunisia; Hu, Hungary; NY, New York; Is, Israel; Tx, Texas; Eg, Egypt; Chin, China; Ind, India; Rus, Russia; Rab, Rabensburg; CAR, Central African Republic; SA, South Africa; Ug, Uganda), 2 numbers for the isolation year (ex: 00 = 2000, 96 = 1996), and GenBank accession number. Sequences obtained from the 2 horse samples in Hungary 2008 are highlighted (rectangle). JEV, a close flavivirus, was used to root the phylogenetic tree.

similar to some results in human patients. In humans, CSF samples invariably show increased protein concentrations and pleocytosis, with a predominance of neutrophils²² or lymphocytes.³ In horses, the CSF was abnormal in most cases showing mononuclear pleocytosis with lymphocytic predominance, but in some cases, only a high protein concentration was found.²³ In 27% of the cases, the values were within reference ranges even during advanced disease.²⁴

The antemortem diagnosis of acute WNV infection is based on the detection of specific IgM antibodies in serum, CSF or both by an ELISA test and an increase in IgG titers between acute-phase and convalescent sera. In IgM-positive cases, it is necessary to confirm the diagnosis by a neutralization test that is able to differentiate between closely related flaviviruses.^{3,23} Cross reactions might have been caused by the tick-borne encephalitis virus, which

also is endemic in Hungary. At least 2 different types of serological tests were performed in each case and different serotests gave reliable, homogeneous results. RT-PCR with blood samples has low diagnostic sensitivity because of the low titers and short duration of viremia in horses and humans, and therefore, the virus may not be present in blood at the time of clinical manifestation of signs.^{22,23}

With regard to the outbreak in Europe, there were 2 unique features: the causative agent was a sub-Saharan strain and the infections were not limited to a single geographic area.

This outbreak was caused by a lineage 2 WNV, which often is considered nonpathogenic for animals or humans. A lineage 1 strain also was shown to circulate in the same geographic area, and although this genetic line typically is responsible for outbreaks in Europe, it has

never caused an equine epidemic in Hungary.⁸ The lineage 2 virus had been detected in 2004 and caused isolated encephalomyelitis cases in different species, but had never previously been associated with a severe equine outbreak. The strain sequenced during this epidemic in 2008 has diverged slightly from the virus isolated in 2004. International literature regarding WNV infections and disease caused by lineage 2 strains are somewhat conflicting. Some Southern African lineage 2 isolates were associated with single isolated cases of encephalitis in a human and a dog, and with fatal hepatitis in a human and death of an ostrich chick.² A recent South African retrospective study also reported the causative role of lineage 2 WNV strains in 7 cases of neurologic disease in horses.¹⁹ Other experimental studies indicated that exposure of horses to the endemic Southern African strains of WNV was not associated with neurological disease.²⁵ Neurological disease was not detected in any of the horses included in the study, and 2 horses inoculated with a recent lineage 2 South African isolate of WNV showed no clinical signs of the disease after infection, virus was not detected in their blood.²⁵

WNV had also re-emerged and caused equine cases in Italy in 2008. Phylogenetic analysis of the Italian isolates indicated that these viruses belonged to lineage 1 strains. Confirmed clinical cases occurred from the end of August to mid-October, similar to the cases in our study. Thirty-three horses showing clinical signs with a 15.1% fatality rate were reported from 3 regions along the Po River Delta, Italy.⁹

All WNV infections in Hungary were limited to the same wetland areas before August 2008, but in 2008, cases occurred in many parts of the country. Interestingly, the highest incidence occurred around the capital. Parallel with the chronology and geographic locations of equine infections, birds of prey died of WNV encephalitis and human cases also were diagnosed. According to the localization of the equine, avian, and human cases, Hungary experienced substantial northwestern spread of the pathogen. Six human cases were identified in Italy, but there was no significant increase in bird mortality.⁹ The role of different bird species in transmission of the virus among different geographic locations and among rural, urban and suburban areas should be investigated.

Most lineage 2 WNV infections are not thought to be symptomatic in equids. Therefore, all infected horses may not have been identified. A serosurvey is ongoing to detect the extent of previous WNV infection among horses and birds. More equine encephalomyelitis cases may have occurred, but animals might have not been tested for the disease by local veterinarians because of lack of knowledge about WNV appearance in the region. This outbreak illustrates the possibility of the emergence and re-emergence of new viral infections in Hungary.

Footnotes

^a Abacus, Diatron Kft, Budapest, Hungary

^b BTS 330, Biosystems, Costa Brava, Spain

^c CP-Xylazine 2% inj., CP-Pharma, Burgdorf, Germany

^d Seduxen inj., Richter Gedeon, Budapest, Hungary

^e CP-Ketamin inj., CP-Pharma

^f American Type Culture Collection, Manassas, VA

^g Bethyl Laboratories, Montgomery, TX

^h VACUETTE, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria

ⁱ Qiagen, Hilden, Germany

^j Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Germany

^k Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA

^l Applied Biosystems, Life Technologies

Acknowledgments

The authors thank the referring vets and all colleagues of the Large Animal Clinic for their contribution and assistance.

The study was partially supported by the grant OTKA K67900.

References

- Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M, et al. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerg Infect Dis* 2008;14:222–230.
- Burt FJ, Grobbelaar AA, Leman PA, et al. Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates. *Emerg Infect Dis* 2002;8:820–826.
- Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:147–156.
- Schepp-Berglind J, Luo M, Wang D, et al. Complex adeno-virus-mediated expression of C, PreM, E, and NS1 proteins of West Nile virus induces both humoral and cellular immune responses. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1117–1126.
- Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, et al. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007;7:181–188.
- Keckemeti S, Bajmocy E, Bacsadi A. Encephalitis due to West Nile virus in a sheep. *Vet Rec* 2007;161:568–569.
- Glavits R, Ferenczi E, Ivanics E, et al. Occurrence of West Nile fever in a circovirus infected goose flock in Hungary. *Avian Pathol* 2005;34:408–414.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2006;12:618–623.
- Monaco F, Lelli R, Teodori L, et al. Re-emergence of West Nile virus in Italy. *Zoonoses Public Health* 2010;57:476–486.
- Molnár E, Gresiková M, Kubásova T, et al. Arboviruses in Hungary. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1973;17:1–10.
- Nagy G, Mezey I. The use of ion exchange chromatography for demonstration of rubella-specific IgM antibodies. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1977;24:189–194.
- Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561–573.
- Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, et al. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2002;8:652–656.
- Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD, et al. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet Microbiol* 2006;118:255–259.
- Wilson JH, Davis A, Bender JB, Minicucci LA. Residual effects of West Nile Viral encephalomyelitis in horses. Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of

Equine Practitioners, November 21–25, 2003; New PubMed Orleans, Louisiana. Lexington: AAEP; 2003.

16. Cantile C, Di Guardo G, Eleni C, et al. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J* 2000;32:31–35.

17. Murgue B, Murri S, Zientara S, et al. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 2001;7:692–696.

18. Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, et al. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis* 2005;11:306–309.

19. Venter M, Human S, Zaayman D, et al. Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2009;6:877–884.

20. Rios JJ, Fleming JG, Bryant UK, et al. OAS1 polymorphisms are associated with susceptibility to West Nile encephalitis in horses. *PLoS One* 2010;5:e10537.

21. Rodríguez Mde L, Rodríguez DR, Blitvich BJ, et al. Serologic surveillance for West Nile virus and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic patients, and asymptomatic blood donors in northern Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010;10:151–157.

22. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, et al. West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol* 2006;60:286–300.

23. Pellegrini-Masini A, Livesey LC. Meningitis and encephalomyelitis in horses. *Equine Practice* 2006;22:553–589.

24. Wamsley HL, Alleman AR, Porter MB, et al. Findings in cerebrospinal fluids of horses infected with West Nile virus: 30 cases (2001). *J Am Vet Med Assoc* 2002;221:1303–1305.

25. Guthrie AJ, Howell PG, Gardner IA, et al. West Nile virus infection of Thoroughbred horses in South Africa (2000–2001). *Equine Vet J* 2003;35:601–605.

- **Résumé**

Le virus West Nile (VWN) est un virus neurotrope principalement transmis par piqûre de moustique et dont le réservoir est constitué par la faune aviaire sauvage. Les souches circulant en Europe appartiennent à 4 lignages génétiques différents à l'origine de nombreuses épidémies d'ampleur modérée à faible et limitées géographiquement, contrairement à ce qui a été observé en Amérique du Nord. En 1998 en Israël, une importante épidémie a été associée pour la première fois à une forte mortalité de la faune aviaire sauvage. Le virus (souche IS-98-ST1, lignage 1a) a été isolé du cerveau d'une cigogne moribonde.

L'objet de cette thèse a été de construire un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 afin d'en explorer les propriétés de neuroinvasion et de pouvoir mettre en évidence les déterminants moléculaires de sa virulence. Le virus obtenu à partir de la construction clone infectieux s'est révélé posséder les mêmes propriétés biologiques que le virus parental, que ce soit *in vitro* sur cellules Vero ou *in vivo* sur souris sensibles ou résistantes ou encore sur l'embryon de poulet. L'embryon de poulet est présenté ici comme un nouveau modèle d'évaluation de la virulence du VWN. Un modèle cellulaire neuronale (lignée de neuroblastomes humains, SK-N-SH) est aussi évalué dans ce manuscrit.

En conclusion, un nouvel outil de génétique inverse a été obtenu pour le VWN. Cet outil permettra de travailler sur l'impact de mutations ponctuelles, ou de modifications plus importantes touchant un ou plusieurs gènes viraux sur la virulence du VWN, spécifiquement dans le contexte européen.

Mots-clés: virus West Nile, clone infectieux, déterminants moléculaires, virulence

- **Summary**

West Nile virus (WNV) is a neurotropic virus mainly transmitted through mosquito bites. Wild birds represent the main reservoir hosts. Strains circulating in Europe belong to four lineages and have caused numerous but limited epidemics over the last few years. In 1998, an important outbreak associated to huge bird fatalities caused by a highly neuroinvasive strain (IS-98-ST1) took place in Israel. We aimed at producing a new infectious clone, based on the lineage 1a IS-98-ST1 WNV strain, for the characterization of its neuroinvasion properties as well as the molecular determinants of European WNV virulence. The growth kinetics of recombinant and parental WNV were similar in Vero cells. Moreover, the phenotypes of recombinant and parental WNV were indistinguishable in terms of viremia, viral load in the brain and mortality in susceptible and resistant mice. Finally, the pathobiology of the infectious clone was examined in embryonated chicken eggs, proposed as a new model for the evaluation of WNV virulence. The potential of human neuroblastoma cells (SK-N-SH) to discriminate between highly and mildly virulent WNV strains was assayed.

In conclusion: a new molecular tool that is useful for the study of molecular determinants of WNV virulence has been generated. We take advantage of the high genetic stability of our one-piece infectious WNV cDNA clone to produce mutant viruses through the insertion of point mutations or the exchange of genetic fragments between WNV strains into the backbone of the IS-98-ST1 infectious clone.

Key-words: West Nile virus, infectious clone, molecular determinants, virulence

- **Laboratoire :** UMR 1161 de Virologie ANSES-INRA-ENVA
23 avenue du Général De Gaulle
94700 Maisons-Alfort