



HAL
open science

La protéine non-structurale NS1 du virus West Nile : étude fonctionnelle et cible potentielle de nouvelles molécules antivirales

Wilhelm Furnon

► **To cite this version:**

Wilhelm Furnon. La protéine non-structurale NS1 du virus West Nile : étude fonctionnelle et cible potentielle de nouvelles molécules antivirales. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1008 . tel-01775222

HAL Id: tel-01775222

<https://theses.hal.science/tel-01775222>

Submitted on 24 Apr 2018

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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1008

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341-E2M2

Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat : Microorganismes, Interactions, Infections

Discipline : Virologie

Soutenue publiquement le 18/01/2018, par :

Wilhelm Furnon

La protéine non-structurale NS1 du virus West Nile : Etude fonctionnelle et cible potentielle de nouvelles molécules antivirales

Devant le jury composé de :

Monsieur Bruno Lina , Professeur - Université Claude Bernard Lyon1	Examineur
Madame Sylvie Lecollinet , Chargée de Recherche - ANSES, Maisons-Alfort	Rapporteuse
Monsieur Alain Kohl , Professor - University of Glasgow CVR	Rapporteur
Monsieur Pascal Fender , Directeur de Recherche - CNRS/IBS, Grenoble	Rapporteur
Madame Saw-See Hong , Chargée de Recherche - IVPC, Lyon	Directrice de Thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de recherche UMR 754 Infections Virales et Pathologie Comparée (IVPC), INRA-UCBL-EPHE-VetAgroSup,

Dans le groupe « Biologie des *Phlebovirus* », dirigé par le Dr. Frédérick ARNAUD, CR1 INRA

Sous la direction du Dr. Saw-See HONG, CR1 Inserm

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger et évaluer mon travail ainsi que pour le dynamisme et la pertinence apportés lors d'une discussion des plus stimulante durant ma soutenance de thèse. Ce moment d'échanges scientifiques auquel j'ai pris plaisir à participer, bien que stressant, restera gravé dans ma mémoire. Merci au **Professeur Bruno Lina** pour avoir accepté de présider le jury. Un grand merci au **Docteur Sylvie Lecollinet**, au **Professeur Alain Kohl** et au **Docteur Pascal Fender** pour la lecture approfondie de mon manuscrit et pour leur analyse critique et constructive.

Je souhaite également remercier le **Professeur Dominique Pontier**, le **Professeur Karen Moreau**, le **Docteur Michèle Ottmann** et enfin le **Docteur Philippe Marianneau** pour leur accompagnement et leurs précieux conseils au cours des comités de suivi de thèse.

Ensuite, je voudrais donc remercier l'ensemble des membres, actuels et anciens, de l'unité. Ces années passées au sein de l'UMR754 ont été géniales, n'ayant pas vu le temps passer et ce, grâce à vous toutes et tous. C'était un réel plaisir de venir chaque jour au labo, de travailler et d'échanger avec vous. J'espère que mes petits jeux de mots et autres blagues vous auront fait rire (ou pas...) et auront un peu égayé vos journées.

Je tiens donc à dire merci à chacun d'entre vous.

A **Saw-See**, je ne saurai jamais comment te remercier de m'avoir accueilli et encadré durant ces années. Merci pour toute la confiance que tu m'as accordé sur ce stimulant projet West Nile et ce, depuis mon stage de Master. Celle-ci m'a permis, entre autres, de présenter en congrès, de voyager en Thaïlande afin de rencontrer nos collaborateurs et ainsi de gagner en maturité scientifique et personnelle. Un grand merci pour ton aide, tes conseils, ton implication, ta bonne humeur mais aussi et surtout pour ton humanité et ton écoute. Tu m'as toujours laissé exprimer et défendre mes idées et hypothèses, même lorsqu'elles étaient mauvaises. Dans le même bureau, nous avons pu échanger au quotidien nos avis, parfois différents mais toujours dans un esprit d'avancer, ensemble. Je pense que

tout ceci reflète ce qu'une relation, entre l'étudiant et l'encadrant, devrait toujours être. Pour cela, j'ai vraiment eu beaucoup beaucoup de chance de t'avoir. Nous avons malheureusement rencontré de multiples obstacles tout au long du projet, nous empêchant d'avancer comme nous le souhaitions. Malgré cela, tu as toujours su faire preuve d'optimisme et tu as constamment cherché des solutions à nos problèmes. Et ce, lorsque moi-même je pouvais perdre cette part d'optimisme. De façon la plus sincère, Saw-See, je peux dire aujourd'hui que je te considère comme ma « mère de science ». MERCI

A **Pierre Boulanger**, merci pour votre implication, votre aide, vos critiques constructives et conseils tout au long de ces années. Merci d'avoir toujours accepté d'apporter votre expérience sur les travaux rédactionnels. J'ai pris un réel plaisir à discuter et échanger avec vous sur des sujets scientifiques ou non, divers et variés, tout aussi enrichissant les uns que les autres. Ce fût un honneur pour moi de partager ces moments avec vous.

A tout le groupe Phlebo

A **Fred**, merci de ton implication dans le projet et ce, dès le premier jour où nous avons officiellement rejoint le groupe, avec Saw-See. Un grand merci pour tes conseils, tes critiques au combien pertinentes et constructives ainsi que pour le partage de ta rigueur. Celle-ci, de même que ta vivacité d'esprit de réflexion scientifique, resteront un véritable exemple pour moi. J'apprécie aussi ce style direct qui te caractérise car cela facilite souvent beaucoup les choses. Tu as toujours répondu présent lorsque j'avais des questions bien que tu sois très occupé du fait de tes différentes fonctions. Je dois également avouer que certaines de tes actions ainsi ton humour assez pince-sans-rire m'ont parfois beaucoup fait rire ! Encore merci Fred.

A **Maxime**, ton arrivée au sein de l'unité et du groupe Phlebo en 2015 a vraiment été un bénéfice pour moi. Merci pour le partage et la transmission des techniques que tu maîtrises parfaitement. Merci également pour ton implication, ta gestion rigoureuse du BSL3, tout en tenant compte de nos demandes, de nos besoins et de nos contraintes pour les manip. Tu as réussi à venir à bout de cet autoclave caractériel ! Je voudrai également te remercier pour tous les échanges (scientifiques ou non) que nous avons pu avoir, c'était toujours avec plaisir et d'une grande aide. Merci Max !

A **Marie-Pierre**, merci d'être ce que tu es ! Ton esprit scientifique, ta rigueur, ta réactivité mais aussi ta gentillesse hors norme sont un plaisir au quotidien. Ta connaissance parfaite du fonctionnement du labo et de ses équipements est toujours d'une grande aide pour nous autres, donc merci à toi. Merci pour tout ce que tu fais, avec Maxime, pour le BSL3 ainsi que pour m'avoir formé à la manipulation dans cette « boîte ». Je voulais aussi te dire que je suis très content d'être parti avec toi en Thaïlande pour rencontrer nos collaborateurs. Nous avons vu pleins de belles choses là-bas et c'était un plaisir de le partager avec toi. Enfin, je voudrais te souhaiter bonne chance et bon courage dans ton diplôme EPHE. Je ne me fais pas trop de soucis pour que tu le mènes à bout et le défendes avec brio ! Cela sera plus que mérité !

A **Sophie**, merci pour ton aide et les heures que nous avons passé au confocal, dans le froid. Merci pour ta gestion et ton référencement des anticorps nous facilitant la vie. J'appréciais nos divers échanges sur la bio mol mais aussi sur la vie en générale. Merci d'avoir supporté ces quelques petites blagues lorsque je venais vous voir dans le bureau, Maryline, Alex et toi. J'espère que tout le travail que tu as fait ainsi que ton expertise en clonage porteront leurs fruits !

A **Barbara V**, la reine des droso, merci pour ta gentillesse et pour les discussions que nous avons pu avoir. Bien que le monde des drosophiles ne soit pas le mien, j'ai toujours pris plaisir à suivre ton travail et à t'écouter présenter tes résultats. Que les projets droso vivent encore et encore et qu'ils soient fructueux.

A **François**, même si tu es parti en retraite depuis un peu plus d'1 an, pour nous tu fais partie intégrante du labo et du groupe Phlebo. Je te remercie pour tous les discussions que nous avons pu avoir à travers différentes occasions. Que cela soit au dans le couloir du labo, en lab meeting, le midi à la cantine ou bien autour d'un (ou plusieurs) verre(s) j'ai toujours pris un grand plaisir à échanger avec toi. Avoir la chance de discuter et de confronter nos avis avec une personne plus expérimentée que nous est toujours une source d'évolution et de gain en maturité. J'espère que nous aurons à nouveau l'occasion d'aller boire un verre ensemble mais aussi de rester en contact dans le futur. Porte toi bien François et profite bien de cette retraite !

A **Marlène**, je me souviens encore du jour où tu es venue passer ton entretien au labo pour la thèse ECOFECT, pour laquelle tu as évidemment été retenue. J'ai apprécié les moments et les discussions que nous avons pu partager au labo ainsi qu'en soirées, même si les discussions pouvaient parfois être d'un niveau sonore élevé ^^ Je te souhaite donc bon courage et bonne chance dans la suite de ton projet de thèse, en te le souhaitant le plus fructueux possible, car ce serait mérité ! Je te souhaite aussi un épanouissement dans ta vie privée.

A **Justine**, ne quitte jamais ce sourire et cette persévérance qui te caractérisent. Bonne chance pour la fin de ton Master 2 et surtout j'espère que tu pourras travailler sur le sujet de thèse qui te fait envie. Je ne parle que du sujet car pour la thèse, je sais que tu réussiras à en faire une.

To our thaï collaborators, **Ging and Goy**, many thanks for your great help on the alpha-Rep project ! It is my pleasure to know you and I will never thank you enough for being our guides in your wonderful country. Please, keep your smile girls ! I wish you all the best in your life !

Ensuite, à tous les étudiants/stagiaires qui sont passés ou sont encore dans le groupe Phlebo, **Clémentine, Mégane, Jérémy, Etienne**, merci pour votre bonne humeur mais aussi votre envie d'apprendre et de partage. Bonne continuation à vous toutes et tous et j'espère que vous vous épanouissez ou vous épanouirez dans votre vie et votre travail.

Enfin, je souhaiterais avoir une pensée pour toi, **Christophe**. Tu es malheureusement parti bien trop tôt, mais je me souviens de chacune des interactions et des discussions que nous avons pu avoir. Tu as joué un rôle dans la possibilité, pour moi, de faire ma thèse au labo avec Saw-See, donc pour cela je te dis encore merci. Tu as également su donner une nouvelle impulsion à l'unité afin que la science l'emporte sur le reste.

Aux autres membres de l'UMR754

A **Sylvie**, « Mme Farget ! », merci de nous faciliter la vie dans les commandes, les tâches et les documents administratifs, les réservations pour les congrès, le stock de gants et de papier toilette (eh oui, c'est important aussi, il faut le dire !) bref, merci de prendre soin de nous au quotidien. Merci d'avoir toujours été réactive et efficace (même durant tes jours

« off ») lorsque j'avais besoin de certains réactifs en urgence. Merci pour ton écoute et ton humour mais aussi merci d'avoir supporté le mien. Pour te citer je dirais : « Non, mais le problème... » c'est qu'on ne va plus se voir maintenant. J'espère néanmoins que nous resterons en contact !

A **Barbara G**, merci pour ta joie de vivre et tes chansons dans le laboratoire. Merci d'avoir éveillé ma curiosité à propos des serpents (une véritable phobie me concernant), des lézards et autres reptiles. Tu fais partie de l'âme de ce labo, sans toi cela ne serait pas pareil. J'ai toujours adoré discuter et rigoler avec toi. Merci de m'avoir toujours accordé de l'importance lorsque je venais te demander conseils ou même de l'aide. Tu es une belle personne Barbara, je te souhaite donc le meilleur pour la suite.

A **Caroline**, merci pour tes conseils tout au long de ma thèse dans le labo. Un grand merci par rapport à l'informatique et au réseau dans toute l'unité. Cela est vraiment agréable au quotidien, nous facilitant le travail dans chacune de nos tâches et sur n'importe quel équipement présent dans l'unité. J'ai apprécié les échanges que nous avons pu avoir, de plus, tu étais toujours prête à m'aider ou à me permettre d'utiliser certains des appareils utilisés par les membres de ton équipe.

A **Christine**, merci pour ta gestion des règles de sécurité et d'hygiène dans l'unité ainsi que pour la gestion au combien utile des déchets que nous produisons chaque jour dans notre travail. Merci pour ta gentillesse et pour les échanges que nous avons eu au cours de mes années dans le labo. Je te souhaite bonne chance pour la soutenance prochaine et donc la réussite de ton diplôme EPHE.

A **Alexandra**, enfin « Alex » car tu ne viens pas au travail habillée en draps... (désolé, j'ai retenu tout jeu de mot jusqu'à maintenant^^). Merci pour ta grande gentillesse, ta sympathie et ton sourire au quotidien. Merci de m'avoir toujours dépanné lorsque nous étions en ruptures de plastiques ou autres consommables. Merci d'avoir ri à mes « blagues » par goût pour l'humour de talent ou bien par dépit (on va dire que c'est pour la première raison, hein). Nos discussions étaient toujours intéressantes et stimulantes, c'est pourquoi je prenais plaisir à échanger avec toi. Bonne continuation Alex et j'espère que tout le travail que tu fournis sera valorisé.

A **Fabienne**, merci pour tous tes précieux conseils et pour les discussions toujours plus intéressantes les unes que les autres que nous avons eu durant ces années. J'adorais nos échanges sur le côté neuro pour lequel ton expertise était importante pour moi. Tu sais être à l'écoute, tout en jouant ton rôle de DU et je trouve important de le noter. Sans revenir sur les aléas qui t'ont conduit ici, personnellement, j'ai trouvé que tu avais su prendre le taureau par les cornes. Grâce à ce mélange de fermeté et d'humanité, la science est finalement privilégiée (eh BAM ! ça rime !). Cela me ferait très plaisir que nous restions en contact. Bon courage pour la suite Fabienne !

A **Donna Carine di p53 della morte**, grande maîtresse des AlphaGirls, grâce à toi, p53 n'a plus de secret pour moi. Non, en fait je n'ai jamais rien compris. Je me souviendrai longtemps des quelques fous rires que nous avons eu. Merci pour tes conseils et ton avis critiques toujours constructif durant ces années. Je prenais beaucoup de plaisir à échanger avec toi à propos de bio cell, de bio mol, de bioch mais aussi un peu de viro 😊. Je te souhaite que tes projets aboutissent et soient valorisés comme il se doit.

A **Catherine**, merci pour ta bonne humeur constante. Tes anecdotes et péripéties, mais aussi ta façon de les raconter m'auront toujours fait rire aux éclats. Ta gentillesse innée, quant à elle, me permettait d'avaler la pillule métrologie avec plus d'aisance ! J'appréciais aussi nos discussions sur la vie en générale et je te souhaite donc le meilleur pour la suite.

A ma petite Canette et à ma grande Galette, **Céline et Kathy**, merci pour tous ces bons moments que nous avons passés ensemble, au labo, à la cantine ou même en dehors ! Vous êtes parmi les premières personnes avec qui j'ai pu échanger lors de mon 1^{er} stage, je m'en souviens encore, et je suis très heureux que cela ait pu continuer ainsi tout au long de ces années.

Céline, notre petit poulet à nous, merci pour ta joie de vivre, ton sourire, ton rire « démoniaque », ta folie, tes « mais, j'sais pô moi ! », sans oublier tes papillonnements de cils ^^ Même lorsque la vie a joué des coudes, tu as toujours gardé ce côté solaire qui émane de chez toi (je ne parle pas de ta maison hein, puisque j'ai toujours la gorge asséchée :p). Tu es toujours enclin à déconner et qu'est-ce que c'est agréable ! D'autre part, je prenais énormément de plaisir lors de nos discussions sur des sujets divers et variés, parfois sérieux,

car tu es une personne très intéressante. Surtout ne change rien Céline ! Je ne te souhaite que le meilleur pour toi et tes enfants.

Kathy, nos « maiiiiiiiis qui c'eeest qui est làààààààààà ?!?!?! » et tes arrêts devant mon bureau vont me manquer ! Tu appartiens aux très belles rencontres que j'ai pu faire au labo et en dehors. Si tu savais comme j'appréciais nos discussions et nos confrontations d'avis toujours propices à ressortir grandit. Ton mélange d'intelligence, d'humour et de folie, de gentillesse mais aussi et surtout de sincérité, font que tu es une belle personne Kathy. Ne change rien toi non plus ! Merci pour le partage de ton expertise en bio mol, j'ai énormément appris grâce à toi. Je te souhaite pleins pleins de bonnes et belles choses à toi ainsi qu'à ton petit Maxime et ton Vincent pour la suite.

Les filles, aujourd'hui, je peux dire qu'au-delà de très bonnes collègues de travail, je vous considère comme des amies. Il est donc hors de question de perdre le contact !

Aux doctorants actuels et anciens de l'UMR754 et d'ailleurs, groupe du Je(u)di, que la force reste avec nous. A toutes et à tous, merci pour tous ces bons moments que nous avons vécus ensemble : délires, discussions scientifiques, bières, bières, bières, soirées, bières, bières et bières, et autres très bonnes choses.

Aux doctorants de l'unité, **Marie**, **Lulu** et **Jean-Michel**, merci pour votre bonne humeur et nos fous rires. C'est tellement agréable d'évoluer dans cette ambiance entre étudiants !

A **Marie**, ou « Cresson » comme je préfère t'appeler, merci pour ta joie de vivre, ton humour, ton appétit et ton besoin de nourriture sans égal, ton côté un peu planneur, mais aussi pour ta gentillesse. Tu es toujours prête à aider, à donner des conseils, à partager tes connaissances et ton expertise avec les autres. Tu es une belle personne, ne change rien ! Nos sessions psychologies en culture cell vont me manquer, car c'était des bons moments. J'espère que tu pourras valoriser tout l'énorme travail que tu as fait, ce serait plus que mérité. Je te souhaite enfin le meilleur pour la suite, aussi bien côté pro que perso.

A **Lulu**, autre belle rencontre dans le labo, merci pour ton sourire permanent. J'ai toujours pris plaisir à discuter et déconner avec toi. Ton grain de folie et tes talents de rappeuse m'ont fait mourir de rire à plusieurs reprises ! C'est super agréable de voir

quelqu'un de motivé et d'impliqué dans son projet. J'espère donc que tout cela payera ! Bonne continuation Lulu et j'espère que la réussite sera présente dans tous tes projets.

A **Jean-Michel**, enfin « Bernard » ou « Thierry » ou « Jean-Pierre », merci de ta simplicité (je n'ai pas dit simplet). Malgré que tu ne puisses être présent au labo tous les jours, le mercredi et le jeudi étaient pour moi les jours de Jean-Mimi où on allait se marrer. Merci pour tes séminaires toujours plus intéressants les uns que les autres. Pleins de bonnes choses pour la suite Jean-Michel !

A vous 3, je vous souhaite donc bon courage pour la fin de thèse ainsi qu'une belle soutenance, essayez de prendre du plaisir (même si ce n'est pas évident avec le stress...) !

Aux anciens doctorants de l'unité, **Najate, Franck, View, Margaux, Cyrielle, Margot** et **Maryline**, merci à vous pour toujours répondre présents en cas d'interrogations, de doutes, de questions sur des techniques que je ne maîtrisais pas encore. C'est très enrichissant de discuter avec vous. **Franck**, ta connaissance sur des sujets divers et variés m'a toujours impressionnée. Bien qu'il y ait des moments stressants, je sais que tu t'éclates à Marseille donc j'espère que cela continuera encore longtemps. **Najate**, merci de m'avoir pris un peu sous ton aile dès mon premier stage. Merci pour le partage des techniques que tu maîtrises parfaitement. Mais aussi merci d'avoir joué un rôle dans ma « rencontre » avec Claire... 😊 J'espère que tu trouves ton bonheur, aujourd'hui, dans ce que tu fais. **Cyrielle** et **Margaux**, merci pour votre gentillesse et votre sourire à toute épreuve. Pleins de bonnes choses pour vous et la réussite dans vos projets. **Margot**, j'appréciais nos échanges et j'espère que tu trouves ton bonheur non loin de l'UMR754. **View**, thanks to you I started to increase my English level and now, I am not afraid to speak in this language. You are one of the kindest and most smiling people I know. We spent very good moments together. I wish you all the best ! A **Maryline**, eh oui, tant de choses se sont passées depuis que nous avons fait la visite hygiène et sécurité ensemble. Dire que ce jour là nous n'avions pas échangé 1 seul mot alors que maintenant je remercie le ciel lorsque tu cesses de parler ! Tu fais vraiment partie d'une des plus belles rencontres que j'ai pu faire jusqu'à aujourd'hui. Merci, oh grand merci d'être mon plus fidèle (le seul ?) public pour mes jeux de mots

pourris... Merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble : soirées, binouses, randonnées et autres escapades ! J'espère que tous ces moments se reproduiront encore et encore ! Je te souhaite tout le bonheur du monde (on dirait la chanson) dans le futur, avec pleins de bonnes choses pour toi aussi bien la vie pro que dans la vie privée.

A vous autres, **Nico B**, **Nico D**, **Marie** et **Stéph'**, merci pour tous ces supers bons moments que nous passons ensemble. Nos soirées et autres activités extérieures, remplies de rigolades, aident vraiment à décompresser et à se changer les idées ! Que tous ces moments perdurent ! Nico D, un grand merci pour nos discussions scientifiques sur nos projets respectifs et pour ton aide 😊 Les Nico(s), bon courage pour la fin de thèse, déchirez tout !

Aux étudiants ayant transités dans l'unité, **Julien**, **Claire**, **Nader**, merci pour votre gentillesse et votre joie de vivre. **Julien**, j'ai été triste que tu ne puisses pas faire ta thèse au labo après ton Master 2 car on avait de bons délires, mais je sais que tu t'éclates et t'épanouis à Glasgow, donc « enjoy » ! **Claire**, tes tartes au pommes, indescriptibles tellement elles étaient délicieuses, une tuerie ! Mais outre ces succulentes tartes, j'ai beaucoup apprécié ta simplicité, ta gentillesse et ton franc parlé. Bonne continuation à toi et ne change rien.

En dehors du cercle scientifique, il y a d'autres personnes qui ont été importantes durant mes années de thèses et avant. Ces personnes le seront toujours ! C'est pourquoi je tiens à les remercier elles aussi. Il s'agit de mes amis et de ma famille.

A **Jess** et **Marina**, voilà plus de 12 ans que nous nous connaissons et que nous sommes devenus amis. Depuis la seconde, et ce même si nos chemins ont bifurqué, nous sommes toujours restés proches. Merci d'être là dans les bons moments comme dans les mauvais.

A mes potos **Lio** et **Hugues**, merci d'être là les gars ! J'adore discuter et passer des moments avec vous. C'est assez indescriptible les fous rires que l'on peut avoir ensemble ! Paradoxalement, vous répondez aussi présents sur les sujets sérieux (joyeux ou non) et ça, ça n'a pas de valeurs. Merci les amis !

Bien entendu, je souhaite remercier mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

Ma petite **Maman**, merci pour tout ce que tu as fait depuis ma naissance. Tu as toujours fait en sorte que je me sente bien et ça, peu importe la situation et le contexte. Tu as été une mère parfaite ! Jamais je ne pourrai assez te remercier pour tout cela.

A toi, **Titet**, mon père, qui m'as soutenu dans chacun de mes choix de vie mais aussi pour les études. Tu as également toujours fait en sorte que je puisse les faire dans des conditions excellentes et pour cela un ENORME merci ! Tous les deux, vous n'avez jamais décidé pour moi concernant les études, j'étais libre de mes choix mais, surtout je sentais que vous aviez confiance en moi. C'était très important à mes yeux. MERCI

Enfin, je souhaiterais remercier la personne qui partage ma vie depuis plus de 3 ans maintenant, **Claire**. Merci pour toutes ces belles choses que nous vivons ensemble. Un immense merci pour ton soutien, dans le cadre de la thèse mais aussi en dehors, au combien important pour moi dans les moments de doute. Je te remercie également de me supporter au quotidien, car j'ai bien conscience de la difficulté de la tâche... Merci d'être à mes côtés, j'ai vraiment beaucoup de chance. Du chemin a été fait depuis que notre histoire a débuté grâce au labo et j'espère que nous aurons l'occasion de poursuivre ce chemin ensemble encore longtemps.

RESUME

Parmi les virus émergents transmis par des moustiques (arbovirus), le genre *Flavivirus* est fortement représenté avec les virus Dengue, Zika, et le virus West Nile (WNV). Le WNV est responsable de nombreux cas de maladies neuroinvasives sévères, parfois mortelles, chez l'humain et les chevaux. Ce virus représente donc un problème de santé publique humaine et animale. Il n'existe pour le moment aucun vaccin humain ni aucun traitement spécifique anti-WNV.

Parmi les déterminants viraux essentiels à l'infection par les *Flavivirus*, la glycoprotéine non-structurale NS1 possède des propriétés multifonctionnelles. La forme sNS1, sécrétée dans le milieu extracellulaire, est fortement impliquée dans la dérégulation du système immunitaire de l'hôte. Ces mécanismes participent à l'évasion du virus à la réponse antivirale et, paradoxalement, à la pathogenèse observée dans les formes sévères de la maladie. L'essentiel de ces données concernant le virus de la Dengue, nous souhaitons étudier les propriétés fonctionnelles, *in vitro*, de la protéine sNS1^{WNV} au cours de l'infection de cellules épithéliales, gliales et neuronales de mammifères. En effet, la structure des protéines sNS1 de *Flavivirus* étant très similaire, notre hypothèse suppose un rôle de sNS1^{WNV} dans les infections neuroinvasives.

Si la protéine sNS1^{WNV} ne semble pas moduler les étapes de l'infection virale, elle est cependant à l'origine d'un remodelage du cytosquelette d'actine dans les cellules épithéliales. Elle est aussi impliquée dans l'activation de voies antivirales chez les cellules neuronales non infectées. D'autre part, en ciblant sNS1 et la protéine d'enveloppe E du WNV, nous avons pu isoler, par criblage de molécules α Rep (protéines artificielles à motifs alpha-hélicoïdaux répétés), des ligands de haute affinité pour ces déterminants viraux. Ces nouvelles molécules, capables de se lier spécifiquement aux protéines sNS1 et E, ont le potentiel pour servir de base au développement de nouveaux outils de diagnostics et d'agents thérapeutiques antiviraux.

Mots Clés : Arbovirus, *Flavivirus*, West Nile, protéine NS1, pathogenèse, protéine E, Phage Display, molécules α Rep

ABSTRACT

Among emerging mosquito-borne viruses (arboviruses), flaviviruses like Dengue, Zika and West Nile virus (WNV) are very often involved in outbreaks. WNV causes several neuroinvasive diseases, which can be lethal, in humans and horses each year. This virus is a threat for both, human and animal public health. Furthermore, there is no human vaccine currently or any specific antiviral treatments against WNV.

Among viral factors which are essential for Flavivirus infection, the nonstructural glycoprotein NS1 is a multifunctional protein. The secreted form sNS1, is released in the extracellular medium from infected cells and is strongly involved in immune system dysregulation. The functions of sNS1 play roles in immune escape and, paradoxically, in pathogenesis which is observed in severe forms of the disease. Because most of this data are about Dengue Virus, we would like to study, in vitro, functional properties of the sNS1^{WNV} during infection of epithelial, glial and neuronal mammalian cells. Based on the high sNS1 protein structure similarities among flaviviruses, our hypothesis suggests a role of sNS1^{WNV} in neuroinvasive infections.

The sNS1^{WNV} protein doesn't seem to modulate viral infection steps. However, it is involved in actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells. sNS1^{WNV} is also involved in the activation of antiviral response pathways in non-infected neuronal cells. On the other hand, by targeting sNS1 and envelope protein E of WNV, we performed a screening of α Rep molecules (artificial proteins with alphahelicoïdal repeats) and isolated ligands with high affinity for these viral factors. Because this new type of molecules is able to specifically bind to sNS1 and E, they have potential to be used for the development of new diagnostic tools and antiviral therapeutic agents.

Title : The West Nile Virus nonstructural NS1 protein : Functional study and as potential target for novel antiviral molecules

Keywords : Arbovirus, *Flavivirus*, West Nile Virus, NS1 protein, pathogenesis, E protein, Phage Display, α Rep molecules

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	19
LISTE DES ABREVIATIONS	25
LISTE DES FIGURES	29
LISTE DES TABLEAUX	35
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	37
I. Le virus West Nile	39
I.1 Découverte du virus et épidémiologie.....	39
I.1.1 Manifestations cliniques	40
I.1.2 Phylogénie	42
I.1.2.1 Classification virale	42
I.1.2.2 Lignages du WNV	43
I.1.3 Circulation du virus en Europe et dans le bassin méditerranéen	48
I.1.4 Circulation du virus sur le continent américain	52
I.2 Cycle de transmission du WNV	57
I.2.1 Transmission du WNV et compétence vectorielle	57
I.2.2 Virémie et transmission inter-espèces.....	58
I.3 Structure et génome du WNV	59
I.3.1 La Particule Virale.....	59
I.3.2 Organisation génomique du WNV	61
I.3.2.1 Les régions non codantes.....	63
I.3.2.2 Les protéines Structurales	64
I.3.2.3 Les protéines Non-Structurales	69
I.4 Le cycle de réplication du virus	72
I.4.1 Entrée du virus	72
I.4.2 Etapes cytoplasmiques.....	74
I.4.2.1 Réplication : Transcription/traduction	75
I.4.2.2 Assemblage des particules virales et sortie des virions.....	76
I.5 Pathogenèse et tropisme	78

I.5.1	Infection, amplification virale et dissémination.....	78
I.5.2	Infection du SNC.....	80
I.5.2.1	Les différentes voies d'entrée dans le SNC.....	80
I.5.2.2	Physiopathologie de l'infection du SNC.....	83
I.5.3	La réponse antivirale	88
I.5.3.1	Rôle de l'immunité innée.....	88
I.5.3.2	La réponse adaptative.....	96
I.5.3.3	Mécanismes d'évasion du WNV au système immunitaire de l'hôte	98
I.6	Traitements, vaccins et diagnostic.....	101
I.6.1	Approches antivirales.....	101
I.6.2	Approches vaccinales	102
I.6.3	Outils de diagnostic	103
II.	La protéine NS1 des <i>Flavivirus</i>	107
II.1	Fonctions de NS1 au niveau intracellulaire	111
II.1.1	Rôle dans la réplication virale et l'assemblage	111
II.1.2	Rôle dans l'évasion à la réponse immunitaire innée	114
II.2	Fonctions de la forme sécrétée sNS1.....	115
II.2.1	Attachement et tropisme de sNS1.....	116
II.2.2	Immuno-modulation de la réponse de l'hôte par sNS1.....	117
II.2.2.1	Rôle dans l'évasion à la réponse immune médiée par le complément....	117
II.2.2.2	Activation immunitaire et perméabilisation endothéliale/épithéliale....	120
Objectifs		128
PARTIE EXPERIMENTALE		130
Chapitre 1		132
Etude fonctionnelle de la protéine sNS1 du virus West Nile au cours de l'infection		132
I.	Production et purification de la forme sécrétée de la protéine NS1 du WNV	134
I.1	Contexte	134
I.2	Matériel et méthodes	134
I.3	Résultats.....	141
I.3.1	Production de la protéine sNS1 ^{WNV-IS98}	141
I.3.2	Purification de la protéine hexamérique sNS1 ^{WNV-IS98}	143

II. La protéine sNS1^{WNV-IS98} interagit avec la cellule de manière dépendante du type cellulaire.....	147
II.1 Contexte	147
II.2 Matériel et méthodes	147
II.3 Résultats.....	149
II.3.1 Interaction sNS1-cellule dépendante du type cellulaire.....	149
III. La protéine sNS1^{WNV-IS98} induit un remodelage du cytosquelette dans les cellules épithéliales.....	153
III.1 Contexte	153
III.2 Matériel et méthodes	154
III.3 Résultats.....	156
III.3.1 Remodelage du cytosquelette de cellules épithéliales induit par la protéine sNS1 ^{WNV-IS98}	156
III.3.1.1 La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} induit un remodelage du réseau de microfilament d'actine	156
III.3.1.2 La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'induit pas d'altération du réseau de microtubules	157
III.3.2 Le cytosquelette des cellules neuronales n'est pas impacté par la protéine sNS1 ^{WNV-IS98}	161
III.3.2.1 Absence de remodelage du réseau de microfilaments d'actine dans les cellules neuronales.....	161
III.3.2.2 Le réseau de microtubules n'est pas impacté par l'interaction de sNS1 ^{WNV-IS98} avec les cellules neuronales.....	163
IV. La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas l'efficacité d'infection et la réplication du virus West Nile.....	165
IV.1 Contexte	165
IV.2 Matériel et Méthodes	165
IV.3 Résultats.....	169
IV.3.1 La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'influence pas l'infection des cellules épithéliales par le WNV	169
IV.3.1.1 L'entrée virale n'est pas modulée par sNS1 ^{WNV-IS98}	169
IV.3.1.2 Les effets cytopathiques induits par le WNV ne dépendent pas de sNS1 ^{WNV-IS98}	169
IV.3.1.3 La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de réplication du WNV en cellules épithéliales	172

IV.3.2	La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de croissance du WNV en cellules gliales et neuronales	175
V.	La forme sécrétée sNS1^{WNV-IS98} semble activer une réponse cellulaire médiée par IRF3 dans les cellules neuronales	179
V.1	Contexte	179
V.2	Matériel et Méthodes	180
V.3	Résultats.....	182
V.3.1	La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} induit l'activation du facteur de transcription IRF3 dans les cellules neuronales	182
VI.	Formation de structures de type filopodes dans les cellules épithéliales exprimant par la protéine NS1^{WNV-IS98}	186
VI.1	Matériel et méthodes	186
VI.2	Résultats.....	187
	Discussion.....	192
	Chapitre 2	204
	Criblage de nouvelles molécules dirigées contre le WNV à visées diagnostic et antivirale	204
I.	Construction d'une plateforme de pseudotypage de la protéine d'enveloppe E du WNV	206
I.1	Contexte	206
I.2	Matériel et méthodes	207
I.3	Résultats.....	215
I.3.1	La protéine E ^{WNV-IS98} est exprimée dans les lignées stables Sf9-E ^{WNV} et Sf9-SP-E ^{WNV}	215
I.3.2	La protéine E ^{WNV-IS98} est localisée à la membrane plasmique des cellules Sf9-SP-E ^{WNV}	216
I.3.3	Pseudotypage de la protéine d'enveloppe E ^{WNV-IS98} en système cellules de mammifères	218
I.3.3.1	Expression de E ^{WNV-IS98} dans les cellules de mammifères transfectées....	218
I.3.4	Incorporation de la protéine E ^{WNV-IS98} dans les VLP lentivirales en système cellules mammifères	220
I.3.5	Infection des cellules cibles avec les VLP lentivirales ou les pseudotypes VSV221	221
II.	Criblage de la banque de molécules α-Rep contre les protéines virales E et sNS1	223
II.1	Contexte	223

II.2	Matériel et méthodes	225
II.3	Résultats.....	228
II.3.1	Criblage de la banque de molécules α Rep contre la protéine d'enveloppe E du WNV	228
II.3.2	Criblage de la banque de molécules α Rep contre la protéine sNS1 du WNV .	232
	Discussion.....	236
	Publication	242
	Références Bibliographiques	264

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNsb	ARN simple brin
ARNdb	ARN double brin
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Adénosine TriPhosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BSL2-3-4	Biosafety Level 2-3-4
CCHFV	Crimean-Congo hemorrhagic fever virus
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DC-SIGN integrin	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DC-SIGNR	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin Receptor
DENV	Dengue virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBOV	Ebola virus
eCDC	European Centre for Disease Control
eIF	Eukaryotic Initiation Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GAC-ELISA	IgG Antibody Capture Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GTAase	Guanosine TriPhosphate
HCV	Hepatitis C virus
HIV-1	Human immunodeficiency virus 1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL-1 β	Interleukine 1 β
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRF	Interferon Response Factor
ISG	Interferon Stimulated Gene
ISRE	Interferon Stimulated Response Element
JEV	Japanese encephalitis virus
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KUNV	Kunjin virus
LASV	Lassa virus
MAC-ELISA	IgM Antibody Capture Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
MIF	Macrophage Inhibition Factor
MMP9	Matrix MetalloPeptidase 9
MOI	Multiplicity of Infection
MVEV	Murray Valley encephalitis virus
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NTPase	Nucleotide Phosphatase
OAS	2'5'-Oligoadénylate Synthétase
OIE	Organisation Mondiale de la Santé Animale
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
pH	Potentiel Hydrogène
p.i	Post-Infection
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaque Forming Unit

PRR	Pattern Recognition Receptor
RC	Replication Complex
RE	Réticulum Endoplasmique
RTPase	ARN Triphosphatase
RVFV	Rift Valley fever virus
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SLEV	Saint Louis encephalitis virus
SNC	Système Nerveux Central
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCID50	Tissue Culture Infective Dose 50%
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
USUV	Usutu virus
UTR	Untranslated Region
VLP	Virus Like Particle
VSV	Vesicular stomatitis virus
WNV	West Nile virus
YFV	Yellow fever virus
ZIKV	Zika virus

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Carte de la répartition mondiale du WNV (2017).....	40
Figure 2 : Diagramme de distribution des manifestations cliniques d'une infection à WNV .	42
Figure 3 : Arbre phylogénétique des souches européennes de lignages 1 et 2 du WNV.....	45
Figure 4 : Arbre phylogénétique du WNV représentant les 9 lignages	47
Figure 5 : Carte cumulative de la distribution des cas de WNV par zones affectées en Europe et dans le bassin méditerranéen, de 2011 à 2016	51
Figure 6 : Distribution des cas de WNV chez les humains et les équidés dans l'Union Européenne en 2017	52
Figure 7 : Incidence de formes neuroinvasives d'infection à WNV aux Etats-Unis, par comté, de 1999 à 2004	54
Figure 8 : Représentation schématique du cycle de transmission du WNV	58
Figure 9 : Structure de la particule virale WNV.....	60
Figure 10 : Organisation génomique du WNV	62
Figure 11 : Maturation des virions par clivage protéasique Furine-dépendant de prM/M. ..	65
Figure 12 : Représentation structurale de la glycoprotéine d'enveloppe E. (sous sa forme homodimérique).....	67
Figure 13 : Représentation structurale de la protéine E sous forme trimérique après la fusion	68
Figure 14 : Modélisation structurale de l'organisation de la protéine E à la surface des virions	69
Figure 15 : Entrée du WNV par endocytose médiée par la clathrine.....	73
Figure 16 : Mécanisme de fusion pH-dépendante de la membrane virale avec la membrane de l'endosome médié par la protéine E d'enveloppe	74
Figure 17 : Représentation schématique du complexe de réplication des <i>Flavivirus</i> . HF = Facteur cellulaire	75
Figure 18 : Représentation schématique récapitulative du cycle de multiplication virale du WNV	77
Figure 19 : Représentation schématique des étapes d'infection, d'amplification et de dissémination du WNV dans l'hôte infecté	79

Figure 20 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique	81
Figure 21 : Représentation schématique des différentes voies d'entrée du WNV dans le SNC	82
Figure 22 : Coupes histologiques de cerveau de souris infectées par WNV (lignage 1a) ou KUNV (lignage 1b).....	83
Figure 23 : Représentation schématique simplifiée de la neuropathogenèse induite par l'infection du SNC avec WNV	85
Figure 24 : Réactivité des astrocytes dans le SNC lors de l'infection par WNV (inflammation)	85
Figure 25 : Induction de l'apoptose dans le cortex cérébrale de souris lors de l'infection par WNV	87
Figure 26 : Représentation schématique simplifiée de la réponse innée médiée par le système TLR.....	90
Figure 27 : Représentation schématique simplifiée de la réponse innée médiée par le système RLR lors d'une infection par WNV.....	91
Figure 28 : Réponse antivirale dépendante de l'IFN de type I et de la voie JAK-STAT.....	92
Figure 29 : Représentation schématique de la voie anti-WNV des 2',5'-Oligoadénylate synthétases	93
Figure 30 : Cinétique des différentes phases de l'infection par WNV.....	97
Figure 31 : Représentations schématiques des mécanismes d'évasion à la réponse immunitaire du WNV	101
Figure 32 : Principaux tests sérologiques de diagnostic d'une infection à WNV.	104
Figure 33 : Représentations schématiques des trois différentes méthodes ELISA pour le diagnostic d'infections à WNV	105
Figure 34 : Alignement des séquences peptidiques correspondant à la NS1 des principaux <i>Flavivirus</i>	107
Figure 35 : Structure de la protéine sNS1 des <i>Flavivirus</i>	109
Figure 36 : Représentation schématique résumant le trafic de la protéine NS1 en cellules de mammifères	110
Figure 37 : Représentation schématique du décalage du cadre ribosomique de lecture conduisant à la production de la protéine NS1'	111

Figure 38 : Représentation schématique d'une vésicule (VP) associée au complexe de réplication du WNV et de sa formation	112
Figure 39 : Représentation schématique du rôle de NS1 dans l'assemblage et la production des particules flavivirales.....	113
Figure 40 : Représentation schématique des mécanismes d'évasion à la réponse cellulaire médiés par la protéine NS1	115
Figure 41 : Modèle schématique de l'antagonisme du complément par la protéine sNS1 de DENV.....	119
Figure 42 : Représentation schématique de l'activation du système complément par la protéine NS1.....	121
Figure 43 : Rôle de sNS1 dans l'induction d'auto-anticorps liés au dysfonctionnement de l'endothélium des vaisseaux sanguins	122
Figure 44 : Représentation schématique du rôle de sNS1 dans le déclenchement d'une réponse immunitaire dérégulée.....	124
Figure 45 : Schéma général des différentes fonctions de la protéines sNS1 ^{DENV} présente dans la circulation sanguine lors de l'infection par DENV	126
Figure 46 : Représentation schématique de la stratégie de clonage du gène NS1 en vecteur d'expression mammifère.....	136
Figure 47 : Schéma d'illustration de la purification de la protéine sNS1 ^{WNV-IS98} avec la résine d'agarose Ni-NTA sur colonne.....	140
Figure 48 : Expression de la protéine NS1 ^{WNV-IS98} dans les cellules HEK-293T transfectées avec la construction pNS1 ^{WNV-IS98}	141
Figure 49 : Observation de l'expression de NS1 ^{WNV-IS98} en HEK-293T par immunofluorescence indirecte.....	142
Figure 50 : Sécrétion de la protéine NS1 au cours du temps dans le surnageant de culture de cellules HEK-293T transfectées avec la construction pNS1 ^{WNV-IS98}	143
Figure 51 : Détection de la protéine sNS1 ^{WNV-IS98} avant et après purification	145
Figure 52 : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de la forme hexamérique de la protéine sNS1 ^{WNV-IS98}	146
Figure 53 : La fixation et l'internalisation de sNS1 ^{WNV-IS98} sont dépendantes du type cellulaire	151

Figure 54 : Remodelage transitoire du réseau de microfilaments d'actine par sNS1 ^{WNV-IS98} dans des cellules épithéliales	158
Figure 55 : Pourcentage de cellules présentant un remodelage du réseau de microfilaments d'actine après traitement avec sNS1 ^{WNV-IS98}	159
Figure 56 : sNS1 ^{WNV-IS98} n'induit pas de remodelage du réseau de microtubules dans les cellules épithéliales	160
Figure 57 : La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'induit pas de remodelage du réseau de microfilaments d'actine dans les cellules neuronales	162
Figure 58 : La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'induit pas de remodelage du réseau de microtubules dans les cellules neuronales	164
Figure 59 : La forme sécrétée de la protéine NS1 ^{WNV-IS98} n'influence pas l'efficacité d'entrée du virus dans la cellule	170
Figure 60 : sNS1 ^{WNV-IS98} n'est pas impliquée dans les effets cytopathiques induits par le WNV.	171
Figure 61 : La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'affecte pas le nombre de foyer d'infection WNV en cellules épithéliales	171
Figure 62 : Représentation schématique du plan expérimental d'étude du rôle de sNS1 ^{WNV-IS98} dans la cinétique de réplication du WNV en cellules épithéliales	172
Figure 63 : Le pré-traitement des cellules avec sNS1 ^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de réplication virale en cellules épithéliales	174
Figure 64 : Représentation schématique du plan expérimental d'étude du rôle de sNS1 ^{WNV-IS98} dans la cinétique de réplication du WNV en cellules gliales et neuronales	176
Figure 65 : Représentation schématique du plan expérimental d'étude du rôle de sNS1 ^{WNV-IS98} dans la cinétique de réplication du WNV en cellules gliales et neuronales	176
Figure 66 : Le traitement des cellules avec sNS1 ^{WNV-IS98} en simultanée avec l'infection n'influence pas la cinétique de réplication virale en cellules gliales et neuronales	177
Figure 67 : Le pré-traitement des cellules avec sNS1 ^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de réplication virale en cellules gliales et neuronales	178
Figure 68 : La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} n'induit pas la translocation de IRF3 dans le noyau de cellules d'astroglioblastome humain	184
Figure 69 : La protéine sNS1 ^{WNV-IS98} active la translocation de IRF3 dans le noyau de cellules neuronales (neuroblastome humain)	185

Figure 70 : Filopodes observés par immunofluorescence indirecte en cellules épithéliales exprimant la protéine NS1 ^{WNV-IS98}	189
Figure 71 : Filopodes observés par immunofluorescence indirecte en cellules épithéliales exprimant la protéine NS1 ^{WNV-IS98}	191
Figure 72 : Filopodes observés par immunofluorescence indirecte en cellules épithéliales exprimant la protéine NS1 ^{WNV-IS98}	191
Figure 73 : Modèle du rôle potentiel de la protéine sNS1 ^{WNV-IS98} dans la déstabilisation de la barrière épithéliale des Plexus Choroïdes permettant l'entrée du WNV dans le SNC ..	195
Figure 74 : Modèle de la fonction de sNS1 ^{WNV-IS98} dans l'activation des mécanismes de la réponse innée potentiellement liée à la mort neuronale et à la déstabilisation de la BHE lors de l'infection du SNC par WNV	201
Figure 75 : Représentation schématique de la stratégie de clonage du gène E en vecteur d'expression insecte.....	209
Figure 76 : Plasmides exprimant le gène E de l'enveloppe du WNV en cellules de mammifères	209
Figure 77 : Représentation schématique de la production de vecteur lentiviral pseudotypé	212
Figure 78 : Représentation schématique de la production de virus VSV pseudotypés	213
Figure 79 : Expression de la protéine E ^{WNV-IS98} dans les lignées stables Sf9-E ^{WNV} et Sf9-SP-E ^{WNV}	216
Figure 80 : Localisation de E ^{WNV-IS98} à la surface des lignées stables Sf9-E ^{WNV} et Sf9-SP-E ^{WNV} par immunofluorescence indirecte	217
Figure 81 : Analyse par Western Blot de l'expression de la protéine E ^{WNV-IS98} dans les cellules HEK-293T.....	219
Figure 82 : Observations par immunofluorescence indirecte de l'expression de la protéine E ^{WNV-IS98} dans les cellules HEK-293T.....	219
Figure 83 : Détection de la protéine E ^{WNV-IS98} après ultracentrifugation des VLP	220
Figure 84 : Test de l'infectiosité des VLP rétrovirales en cellules VeroE6	222
Figure 85 : Représentation de la structure des ankyrines et DARPins	224
Figure 86 : Représentation de la structure des protéines α Rep	224
Figure 87 : Représentation schématique de la stratégie de criblage de la banque de molécule α Rep par Phage Display.....	227

Figure 88 : Schéma du plan expérimental du criblage des molécules α Rep contre la protéine $E^{WNV-IS98}$ présentée à la surface des cellules Sf9-SP- E^{WNV}	230
Figure 89 : Caractérisation moléculaire des clones α Rep E^{WNV} par séquençage.....	231
Figure 90 : Schéma du plan expérimental du criblage des molécules α Rep contre la protéine $sNS1^{WNV-IS98}$	233
Figure 91 : Caractérisation moléculaire des clones α RepsNS1 WNV par séquençage	234
Figure 92 : Expression des protéines α RepNS1 en cellules de HEK-293T	235
Figure 93 : Analyse par méthode ELISA de l'affinité de fixation des molécules α Rep pour la protéine $sNS1^{WNV-IS98}$	235

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principaux <i>Flavivirus</i> pathogènes et leurs sérogroupes d'appartenance	45
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principaux foyers d'infections à WNV à la fin des années 1990 en Europe	49
Tableau 3 : Tableau des cas de maladie à WNV et des décès associés rapportés par le CDC par année et forme clinique (1999-2016)	55
Tableau 4 : Facteurs de l'hôte qui modulent l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique	82
Tableau 5 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour la détection de la protéine NS1 au niveau intracellulaire et de la protéine sNS1 non purifiée dans le surnageant de culture ou purifiée.....	138
Tableau 6 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine NS1 ^{WNV-IS98} par immunofluorescence indirecte.....	139
Tableau 7 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine NS1 ^{WNV-IS98} par immunofluorescence indirecte pour l'analyse au cytomètre de flux.....	149
Tableau 8 : La fixation et l'internalisation de sNS1 ^{WNV-IS98} varient selon le type cellulaire ...	152
Tableau 9 : Anticorps/drogue et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire du cytosquelette et de la protéine NS1 ^{WNV-IS98} par immunofluorescence indirecte	156
Tableau 10 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine d'enveloppe E du WNV par immunofluorescence indirecte.....	167
Tableau 11 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine IRF3 par immunofluorescence indirecte	181
Tableau 12 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine NS1 ^{WNV-IS98} et du cytosquelette par immunofluorescence indirecte	187
Tableau 13 : Anticorps et leur condition d'utilisation en Western Blot pour la détection intracellulaire de l'expression des protéines E ^{WNV-IS98} et Pr55Gag ^{HIV-1}	211
Tableau 14 : Anticorps et leur condition d'utilisation en immunofluorescence indirecte pour la détection de la protéine E ^{WNV-IS98}	212

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le virus West Nile

I.1 Découverte du virus et épidémiologie

Le virus West Nile est un arbovirus (« Arthropod-Borne Virus ») transmis par les moustiques. Il a été isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda, dans la province « West Nile », à partir d'un échantillon de sang d'une femme présentant un accès de fièvre (Smithburn et al., 1940). Au cours des décennies qui ont suivi, la fièvre West Nile était considérée comme une maladie arbovirale mineure, responsable majoritairement d'infections asymptomatiques ou d'un syndrome pseudo-grippal chez l'homme. Bien que circulant en Afrique et dans le bassin méditerranéen, les épidémies étaient de faible ampleur et les cas d'encéphalites, pouvant être fatales, rares. La population équine était également peu touchée, se limitant à quelques cas isolés d'infection.

La situation a changé de manière drastique dans les années 1990, en Europe et sur le pourtour méditerranéen. Des épidémies avec de nombreux cas humains ainsi que des épizooties touchants les équidés se sont déclarées dans ces régions à partir du milieu des années 1990 (Tsai et al., 1998; Murgue et al., 2001a; Platonov et al., 2001; Murgue et al., 2001b; Zeller and Schuffenecker, 2004). Le continent américain, territoire naïf vis-à-vis du WNV avant la fin des années 1990, est également touché par des épidémies de WNV. En effet, un tournant majeur survient en 1999, lorsqu'une épidémie éclate à New York et sa région avec une mortalité observée chez l'homme, les chevaux et plusieurs espèces d'oiseaux sauvages tels que les Corvidae (corbeaux) (Lanciotti et al., 1999). Moins de 10 ans plus tard, le virus est considéré comme endémique sur tout le territoire nord-américain. Aujourd'hui, le WNV est présent sur tous les continents, excepté l'Antarctique, et est responsable de foyers épidémiques et épizootiques réguliers dont le nombre ne cesse d'augmenter (Figure 1) (Gray and Webb, 2014).

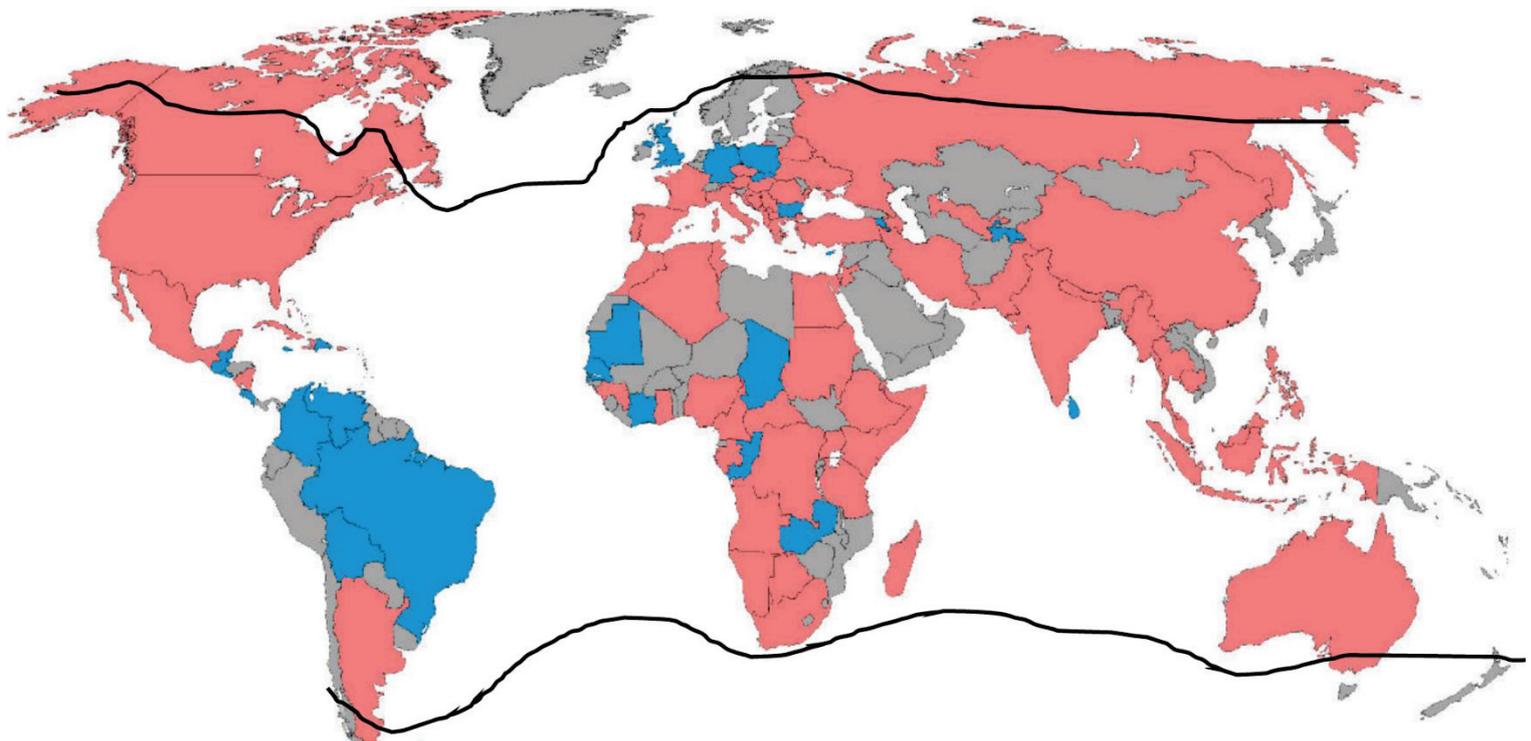


Figure 1 : Carte de la répartition mondiale du WNV (2017) Rouge : Cas humains ou séropositivité chez l’homme ; Bleu : cas non humains/moustiques ou séropositivité ; Gris : pas de données ou aucun cas positif rapporté. Les lignes noires représentent la distribution mondiale des principaux moustiques vecteurs du WNV. (Vieira et al., 2015) ont rapportés le premier cas humain de WNV confirmé en laboratoire au Brésil (Etat Piauí). D’après (Chancey et al., 2015).

I.1.1 Manifestations cliniques

Les signes cliniques associés à une infection par le WNV sont divers et variés (**Figure 2**). La compilation de données cliniques et sérologiques concernant le WNV ont permis d’estimer qu’environ 80% des individus infectés représentent des cas asymptomatiques (Danis et al., 2011; Mostashari et al., 2001). C’est-à-dire qu’approximativement 20% des infections sont symptomatiques, avec majoritairement un syndrome pseudo-grippal (fièvre West Nile) (Hubálek, 2001; Solomon, 2004). La fièvre West Nile se manifeste par des maux de tête, une fièvre, une fatigue générale, des douleurs musculaires et articulaires, des vomissements et parfois un rash (Gray and Webb, 2014; Hubálek, 2001). De manière générale, ces formes modérées de l’infection sont observables avec l’ensemble des *Flavivirus* pathogènes pour l’homme et l’animal (Solomon, 2004). Parmi les cas

symptomatiques, certains peuvent développer une forme sévère conduisant à une maladie neuroinvasive (Gray and Webb, 2014; Kramer et al., 2007). Celle-ci est observée chez moins de 1% des infections causées par le WNV (Kramer et al., 2007). Les formes neuroinvasives se caractérisent par des encéphalites, des méningites ou une paralysie flasque aiguë de type poliomyélite. Les patients peuvent parfois présenter des syndromes se chevauchant tels qu'une méningo-encéphalite. Ces formes sévères de maladies neuroinvasives, causées par le WNV, peuvent amener l'individu infecté jusqu'à une issue fatale.

Une méningite due au WNV est caractérisée par une fièvre et des signes d'inflammation des méninges comprenant des maux de tête importants, une raideur de la nuque et une photophobie (Gray and Webb, 2014). Les encéphalites à WNV se présentent sous la forme d'un état altéré de la conscience, d'une ataxie, de tremblements et de multiples défaillances du système nerveux central qui peuvent conduire occasionnellement au coma et/ou au décès (Gray and Webb, 2014; Yeung et al., 2017). Malgré un pourcentage de guérison proche de 80%, la majorité des patients ayant présenté une encéphalite souffre de séquelles durant plusieurs mois (Fromm et al., 2015; Hart et al., 2014; Weatherhead et al., 2015). Le retour à un état fonctionnel complet peut parfois prendre plus d'un an (Balakrishnan et al., 2016). Une paralysie flasque aiguë est quant à elle observée chez 15 à 20% des patients souffrant d'une maladie neuroinvasive, avec une atteinte neuromusculaire importante due à une myélite (Alker, 2015; Leis and Stokic, 2012). D'autres manifestations cliniques, plus rares, dues au WNV ont été rapportées incluant des hépatites fulminantes, des pancréatites et des myocardites (Gray and Webb, 2014; Kushawaha et al., 2009; Perelman and Stern, 1974).

L'âge semble jouer un rôle important dans le développement de la maladie. En effet, l'avancement de l'âge est fortement associé à une augmentation du risque de maladie neuroinvasive (Carson et al., 2012; Danis et al., 2011). Un patient sur 50, âgé de plus de 65 ans, développe une forme neuroinvasive (Carson et al., 2012). D'autres facteurs sont à risques dans le développement de formes sévères, tels que des antécédents de cancer, d'hypertension artérielle, de diabète ou encore l'alcoolisme (Bode et al., 2006). Enfin, bien que des cas d'infections congénitales ont été décrits, il n'existe pas de preuves d'une augmentation significative du taux d'anomalies fœtales à la suite d'une infection par le WNV durant la grossesse (O'Leary et al., 2006; Stewart et al., 2013). Néanmoins, le WNV semble

se répliquer efficacement *ex vivo*, dans des tissus fœtaux humains, et induire chez la souris des dommages importants dans le développement du fœtus (Platt et al., 2018).

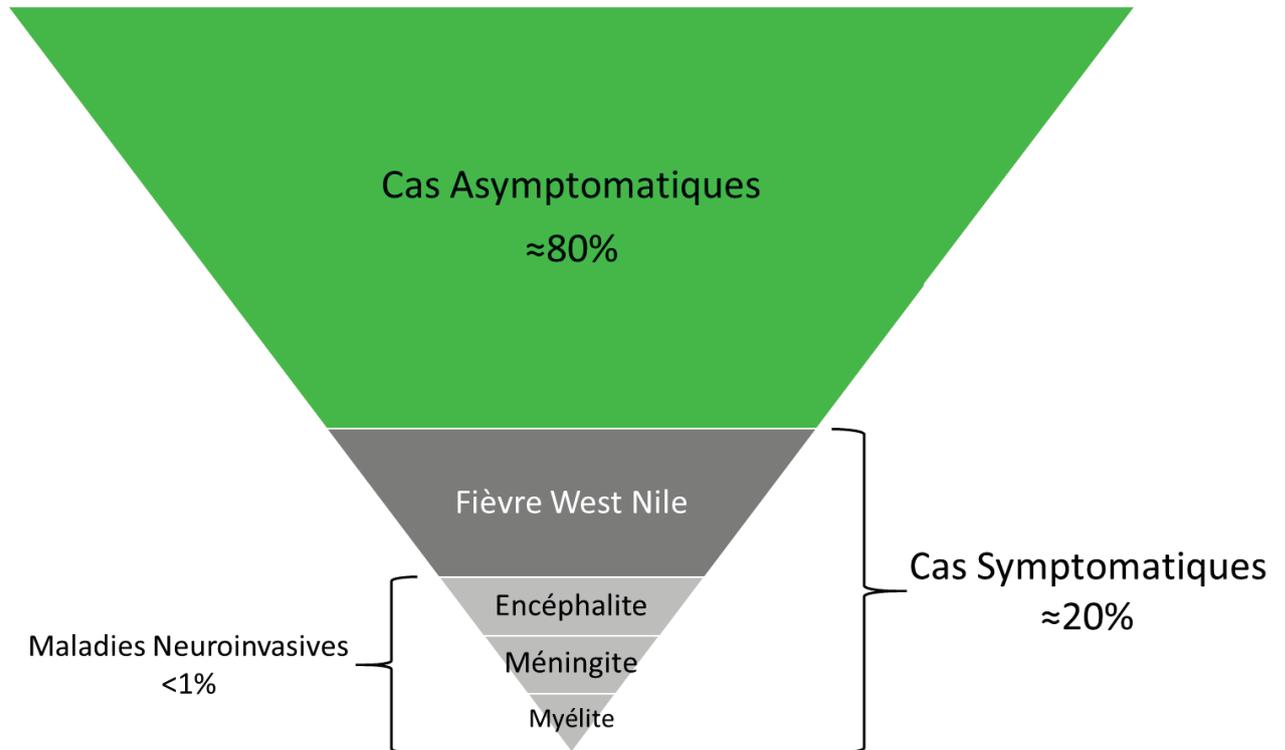


Figure 2 : Diagramme de distribution des manifestations cliniques d'une infection à WNV.

1.1.2 Phylogénie

1.1.2.1 Classification virale

Le WNV appartient à la famille des *Flaviviridae* qui comprend les genres *hepacivirus* (avec le virus de l'hépatite C, HCV), *pestivirus* (dont le virus de la peste porcine classique) et *Flavivirus*. L'origine du nom du genre *Flavivirus* vient du virus de la fièvre jaune, YFV, (archétype de ce groupe) avec *flavius* qui signifie « blond » ou « jaune » en latin. Le genre *Flavivirus* regroupe une grande diversité de virus, infectant à la fois les arthropodes et les vertébrés. Certains sont spécifiques uniquement de l'insecte, avec une incapacité à se répliquer dans des cellules de vertébrés, et ne sont donc pas transmis à ces derniers

(McLean et al., 2015). Cependant, on compte plus de 70 *Flavivirus*, transmis par des arthropodes, qui infectent un large éventail d'hôtes vertébrés. Plusieurs membres de ce groupe sont associés à d'importantes maladies humaines et représentent donc un danger en santé publique. Parmi ceux-ci, on retrouve donc le WNV, au même titre que le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le virus de l'encéphalite à tique (TBEV), le virus de l'encéphalite de Saint Louis (SLEV), le virus de l'encéphalite de la vallée de Murray (MVEV), le virus Usutu (USUV) ou encore le virus Zika (ZIKV). On retrouve aussi des virus responsables de fièvres hémorragiques tels que le virus de la dengue (DENV), le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus de la maladie de la forêt de Kyasanur (KFDV) ou encore le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk (OHFV), dont l'incidence croissante en Asie du Sud inquiète les autorités sanitaires (**Tableau 1**).

Le WNV ainsi que d'autres *Flavivirus* transmis par des moustiques et responsables d'encéphalites (ex : JEV, SLEV, MVEV, USUV) sont regroupés au sein du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise (**Tableau 1**). Cette classification supplémentaire repose sur la capacité de neutralisation croisée des anticorps polyclonaux d'un sérum, dirigé contre un virus donné, avec d'autres virus proches d'un point de vue antigénique et génétique (Calisher et al., 1989; Poidinger et al., 1996).

1.1.2.2 Lignages du WNV

Les analyses phylogénétiques visent essentiellement les alignements de séquences génomiques des régions codant la protéine d'enveloppe E ou la polymérase NS5, mais aussi le génome entier (lorsqu'il est disponible), des différents isolats de virus West Nile retrouvés dans différentes zones géographiques (Savage et al., 1999; Zeller and Schuffenecker, 2004). Ces analyses montrent l'existence d'une grande diversité génétique au sein de l'espèce West Nile, permettant une classification plus fine à des niveaux taxonomiques inférieurs, tels que les lignages génétiques et les clades. Du fait de leur implication prédominante dans les épidémies et épizooties de ces 20 dernières années, deux lignages majeurs sont retrouvés : le Lignage 1 et le Lignage 2 (**Figure 3**). Ils divergent de 20 à presque 30% en séquences nucléotidiques (Koraka et al., 2016; Lanciotti et al., 2002).

Groupe virus	Espèce virus	Souches virus/Sous-types	Abréviation	Distribution géographique	Hôtes présentant maladie
Flavivirus transmis par moustiques					
Sérocomplexe de l'encéphalite japonaise	Virus de l'encéphalite japonaise	Japanese encephalitis virus	JEV	Asie	Porcs, chevaux, humain
	Virus de l'encéphalite de Saint-Louis	St-Louis encephalitis virus	SLEV	Amériques	Oiseaux, humain
	Virus West Nile	West Nile virus	WNV	Mondiale	Reptiles, oiseaux, mammifères dont humain
	Virus de l'encéphalite de la vallée de Murray	Murray Valley encephalitis virus	KUNV	Australie, Indonésie	Oiseaux, mammifères dont humain
Groupe du virus de la Dengue	Virus Koutango	Alfuy virus	MVEV	Australie, Papouasie-Nouvelle-Guinée	Jeunes moutons et primates dont l'humain
	Virus Cacipacore	Koutango virus	ALFV	Australie	Inconnu
	Virus Usutu	Cacipacore virus	KOUV	Sénégal	Inconnu
	Virus Yaounde	Usutu virus	CPCV	Brésil	Inconnu
	Virus de la Dengue	Yaounde virus	USUV	Afrique, Europe	Oiseaux, humain
		Dengue virus 1	YAOV	Afrique centrale	Inconnu
		Dengue virus 2	DENV-1	Tropical, subtropical	Primates dont humain
		Dengue virus 3	DENV-2	Tropical, subtropical	Primates dont humain
		Dengue virus 4	DENV-3	Tropical, subtropical	Primates dont humain
		Yellow fever virus	DENV-4	Tropical, subtropical	Primates dont humain
Groupe du virus de la fièvre jaune	Virus de la fièvre jaune	Yellow fever virus	YFV	Afrique tropicale, Amérique du sud	Primates dont humain
	Virus Wesselsbron	Wesselsbron virus	WSLV	Afrique, Madagascar, Thaïland	Moutons, chèvres, bovins
	Virus Sepik	Sepik virus	SEPV	Nouvelle-Guinée	Inconnu
	Virus Aroa	Aroa virus	AROAV	Vénézuela	Inconnu
Groupe du virus Aroa		Bussuquara virus	BSQV	Brésil, Colombie, Panama	Inconnu
		Iguape virus	IGUV	Brésil	Inconnu
		Naranjal virus	NILV	Equateur	Inconnu
Groupe du virus Kokobera	Virus Kokobera	Kokobera virus	KOKV	Australie, Papouasie-Nouvelle-Guinée	Inconnu
		Stratford virus	STRV	Australie	Inconnu
Groupe du virus Ntaya	Virus Ntaya	Ntaya virus	NTAV	Afrique	Inconnu
	Virus Bagaza	Bagaza virus	BAGV	Afrique	Inconnu
	Virus Ilheus	Ilheus virus	ILHV	Amérique centrale et du sud	Inconnu
	Virus de la méningoencéphalite de la dinde d'Israël	Rocio virus	ROCV	Brésil	Oiseaux
	Virus Tembusu	Israel turkey meningoencephalitis virus	ITV	Israël, Afrique du sud	Dindes
	Virus Zika	Tembusu virus	TMUV	Malaisie, Thaïland	Inconnu
		Zika virus	ZIKV	Afrique, Asie, Amérique du sud, Micronésie	Primates dont humain
Flavivirus transmis par tiques					
Groupe des virus transmis aux mammifères	Virus de l'encéphalite à tique	Tick-borne encephalitis virus	TBEV	Europe, Russie, Chine, Japon	Veaux, agneaux, chèvres, humain
	Virus Powassan	Powassan virus	POWV	Russie, Amérique du nord	Petits ruminants
	Virus Louping ill	Louping ill virus	LIV	Europe	Moutons, chèvres
	Virus de la maladie de la forêt de Kyasanur	Kyasanur forest disease virus	KFDV	Inde, Arabie Saoudite	Rongeurs, chameaux, primates dont humain
	Virus Langat	Alkhurma hemorrhagic fever virus	AHFV	Péninsule arabique	Primates dont humain
	Virus de la fièvre hémorragique d'Omsk	Langat virus	LGTV	Malaisie, Thaïland, Russie	Humain
	Virus Meaban	Omsk hemorrhagic fever virus	OHFV	Asie, Russie	Rongeurs, rats musqués, humain
Groupe des virus transmis aux oiseaux marins	Virus du récif Saumarez	Meaban virus	MEAV	France (Bretagne)	Oiseaux marins
		Saumarez Reef virus	SREV	Australie	Oiseaux marins

Tableau 1 : Les principaux *Flavivirus* pathogènes et leurs sérogroupes d'appartenance.
Synthèse personnelle à partir de (Go et al., 2014)

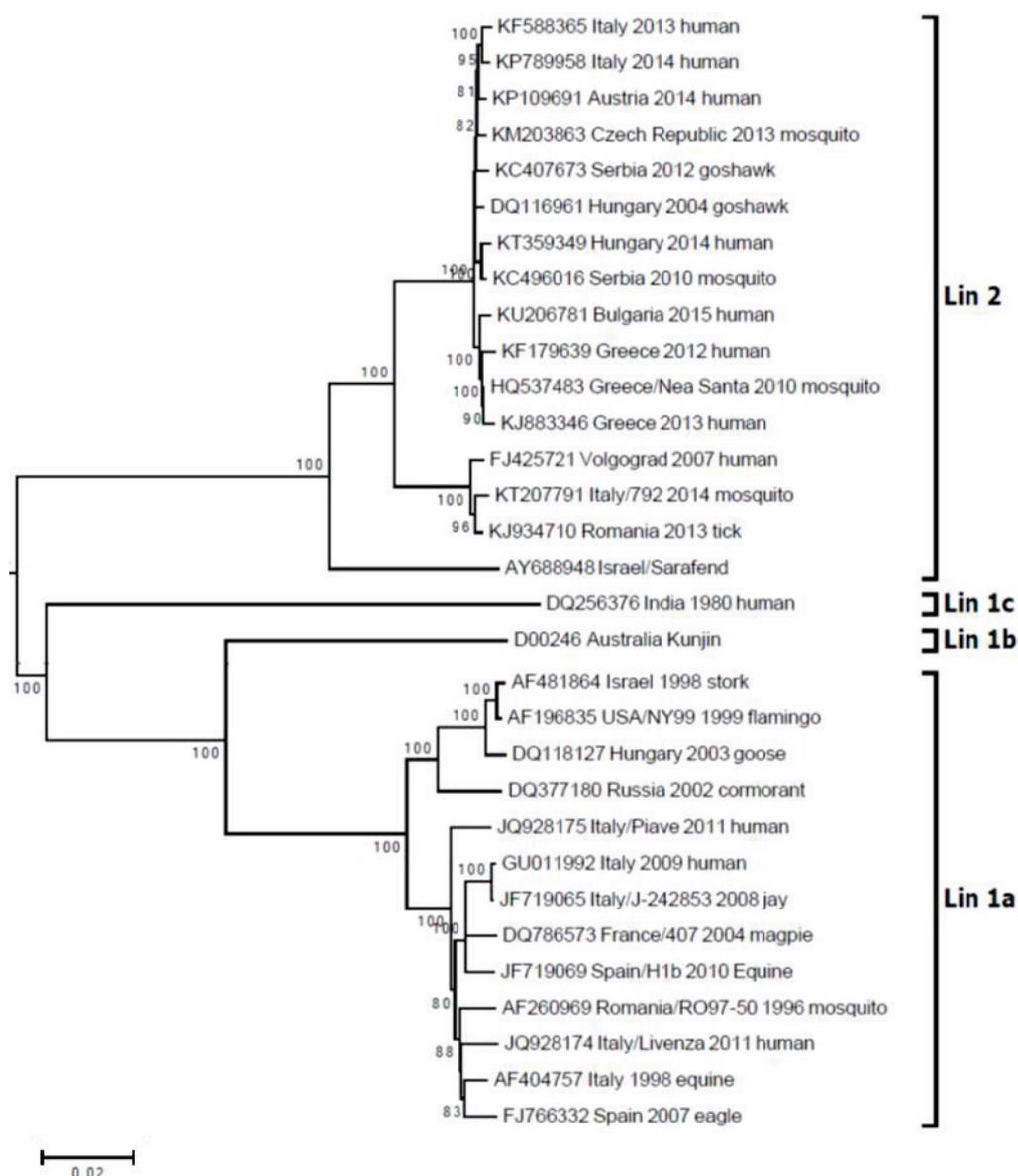


Figure 3 : Arbre phylogénétique des souches de lignages 1 et 2 du WNV. D'après (Koraka et al., 2016).

Le lignage 1 est constitué de souches virales ayant une distribution géographique très vaste, avec une présence sur 5 continents. Ce lignage 1 peut être subdivisé en 3 clades, clades 1a, 1b et 1c. Le clade 1a présente la plus grande richesse puisqu'il contient des souches circulant en Europe, au Moyen-Orient, en Asie, en Afrique et en Amérique. Ce groupe peut alors se répartir en différents clusters, au nombre de 6, en fonction de la

situation géographique, donc en tenant compte d'une variabilité génétique plus fine (Charrel et al., 2003; May et al., 2011; Monaco et al., 2010). Le clade 1b correspond aux souches australiennes du virus Kunjin (Scherret et al., 2001a). Le clade 1c, quant à lui, comprend les souches isolées en Inde mais, il a également été proposé comme un lignage génétique distinct, le lignage 5 (Bondre et al., 2007; Kemenesi et al., 2014; Koraka et al., 2016).

Le lignage 2 était essentiellement composé des isolats et des souches de Madagascar et d'Afrique sub-saharienne (Berthet et al., 1997). Aujourd'hui, on retrouve également des souches appartenant au Lignage 2 en Europe (Bakonyi et al., 2006; Wodak et al., 2011). Jusqu'en 2004, les souches de lignage 2 étaient en effet contenues au continent africain mais depuis, elles se sont répandues dans une bonne partie de l'Europe avec une augmentation de la morbidité associée chez les mammifères (Bakonyi et al., 2013; Chaskopoulou et al., 2011; Danis et al., 2011; Papa et al., 2011).

D'autres lignages ont été proposés au sein du virus West Nile, pour des isolats présentant des différences génétiques avec les lignages 1 et 2. On note donc l'existence du lignage 3 (souche Rabensburg isolée en République Tchèque), et du lignage 4 (souche isolée en Russie) (Bondre et al., 2007). Les lignages 6 et 7, quant à eux, concernent des virus isolés en Malaisie (virus Sarawak) et au Sénégal (virus Koutango) respectivement (Hall et al., 2001). Aujourd'hui, des études récentes ont proposé l'ajout d'un 8^{ème} et d'un 9^{ème} lignages pour des souches virales isolées en Espagne, en Hongrie et en Autriche (**Figure 4**) (Kemenesi et al., 2014; Pachler et al., 2014; Vazquez et al., 2010).

Le WNV présente donc une grande diversité génétique mais aussi géographique. Les différents lignages mais aussi les autres niveaux taxonomiques, traduisant une grande variabilité de séquences génomiques, ne sont pas toujours corrélés avec la distribution géographique du virus. Néanmoins, le continent africain (territoire où a été isolé pour la première fois le WNV) apparaît comme le point d'origine des différentes souches de WNV introduites par la suite dans les autres régions du globe (May et al., 2011). Une surveillance soutenue de la circulation du virus couplée aux analyses phylogénétiques et à l'étude de la pathogénicité, semblent essentielles pour suivre et comprendre l'évolution des souches de WNV dans cette région mais aussi en Europe et en Amérique. Ceci appuie l'hypothèse d'une approche multifactorielle pour l'étude des souches virales et la prévision de nouvelles

émergences de WNV. En particulier dans les régions peuplées d'Amérique du Nord et d'Europe où les épidémies et épizooties continuent de s'intensifier.

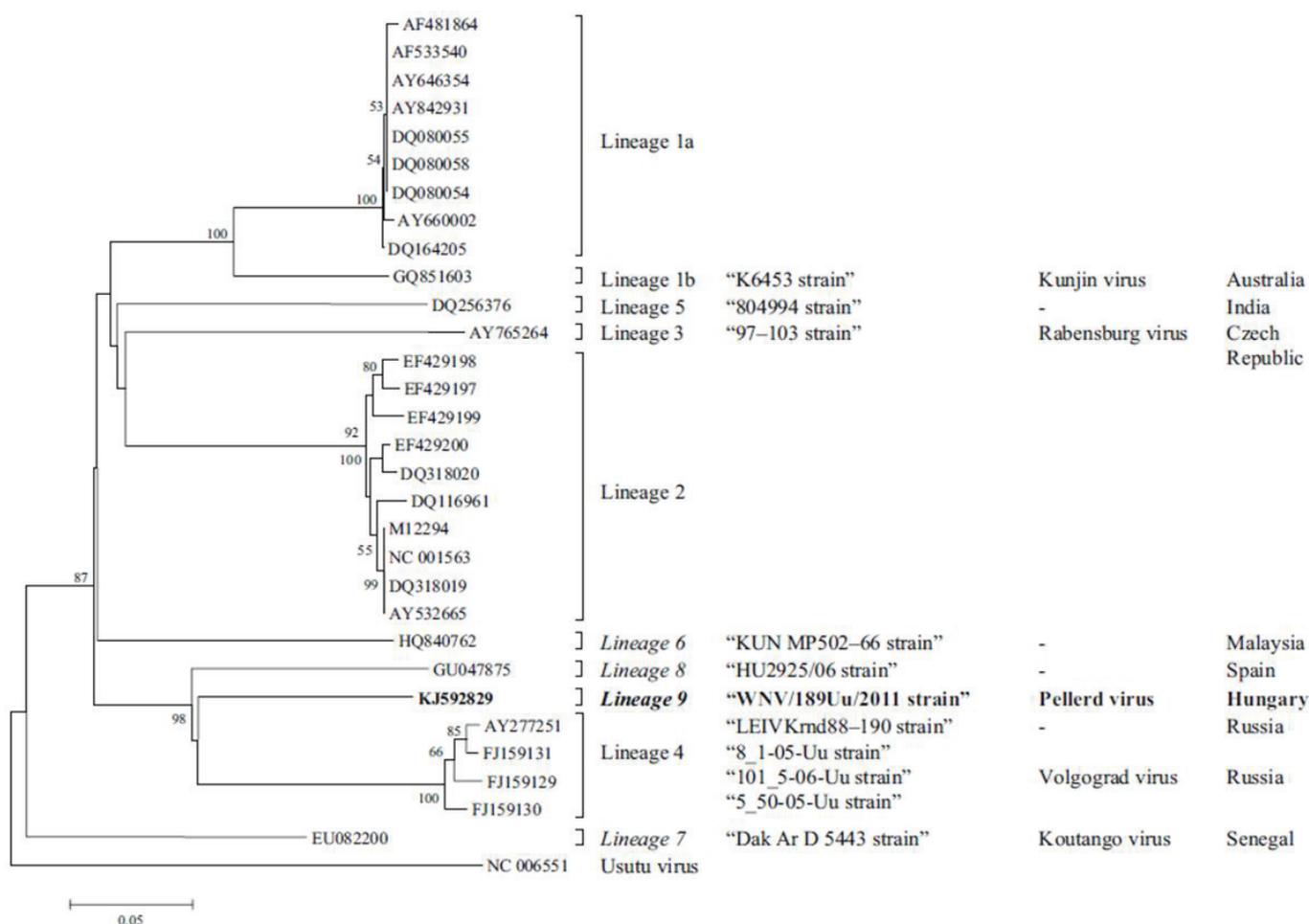


Figure 4 : Arbre phylogénétique du WNV représentant les 9 lignages. L'arbre a été construit avec le logiciel MEGA en utilisant la méthode du Neighbor-joining avec les paramètres du modèle de maximum de vraisemblance. L'analyse est basée sur les séquences nucléotidiques d'une région de 875pb du gène NS5. Le virus Usutu a été utilisé comme groupe extérieur pour l'enracinement. (Kemenesi et al., 2014).

I.1.3 Circulation du virus en Europe et dans le bassin méditerranéen

La surveillance de l'infection à virus West Nile en Europe et sur le pourtour méditerranéen nous indique que le WNV est présent depuis très longtemps, puisque déjà décrit au Portugal, à Chypre, en Israël ou en France dans les années 1960. Des traces sérologiques chez l'homme ou l'animal étaient mises en évidence, mais des isolats viraux étaient plus rarement obtenus ([Filipe and Pinto, 1969](#); [Joubert et al., 1970](#)).

En Israël, dans les années 1950 à 1980, plusieurs épisodes de transmission du WNV ont été rapportés avec des cas d'atteintes du système nerveux central parfois mortelles. Les pays du Maghreb et les autres pays du pourtour méditerranéen ont déclaré une augmentation de cas de WNV à partir des années 1990. Plusieurs épizooties affectant les chevaux ont été décrites dans le bassin méditerranéen touchant ainsi, l'Italie, le Maroc, et la France ([Durand et al., 2005](#); [Pradier et al., 2008](#); [Zeller and Schuffenecker, 2004](#)). Au cours de la même période, le WNV a été à l'origine de plusieurs épidémies en Europe Occidentale et de l'Est (**Tableau 2**). Deux épisodes importants en zone urbaine se sont démarqués, à Bucarest (Roumanie, 1996-1997) et à Volgograd (Russie, 1999-2000), avec plus de 800 cas de formes neuro-invasives, dont des dizaines de décès recensés, survenus principalement chez des personnes âgées ([Ceianu et al., 2001](#); [Hubálek and Halouzka, 1999](#)).

Un premier évènement majeur à noter dans la circulation du WNV dans cette région du globe est la description d'une mortalité aviaire anormale, liée au virus chez des oies domestiques et des oiseaux migrateurs. Cette virulence accrue a été observée en 1998 en Israël. Par la suite, de nombreux cas d'infections à WNV dans ce pays ont été rapportés chez l'homme et chez les chevaux en 2000 ([Bin et al., 2001](#)).

Pays	Année
Algérie	1994
Roumanie	1996-2002
République Tchèque	1997
Israël	1998-2003
Italie	1998
Russie	1999-2001
France	2000/2004/2006

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principaux foyers d'infections à WNV à la fin des années 1990 en Europe.

Les différentes souches virales isolées et identifiées au cours de l'ensemble de ces épisodes sont très proches au niveau phylogénétique et appartiennent au lignage 1. Depuis, le virus a continué de circuler à bas bruit jusqu'aux années 2008-2010. Cependant, un second évènement notable dans l'épidémiologie au niveau européen a eu lieu au cours de l'année 2004. En effet, une souche de WNV appartenant au lignage 2 a émergé en Hongrie, causant la mort de plusieurs oiseaux sauvages, tels que des rapaces (Bakonyi et al., 2006). Ceci, alors que la mortalité aviaire des suites d'une infection par le WNV restait un phénomène rare en Europe (Zeller and Schuffenecker, 2004). De plus, les virus appartenant au Lignage 2 étaient considérés comme moins virulents que les souches du Lignage 1. Ce virus WNV du lignage 2, inhabituel en Europe et contre lequel la faune et la population européenne sont probablement naïves, s'est installé de façon endémique sur le territoire. Il n'a causé que quelques cas sporadiques d'infections entre 2004 et 2007. Mais de manière inattendue, une dissémination explosive du virus dans toute la Hongrie a été observée en 2008. Des maladies neuro-invasives à WNV à la fois chez des humains, des chevaux et des oiseaux ont été diagnostiquées sur l'ensemble du pays, ayant toutes pour agent étiologique cette souche WNV du lignage 2 (Bakonyi et al., 2013).

Au même moment, ce virus s'est aussi répandu jusqu'à l'est de l'Autriche, où il a été détecté dans des cadavres d'oiseaux sauvages. En 2009, une épidémie récurrente a été observée en Hongrie et en Autriche chez les animaux et les humains dans les mêmes régions que l'année précédente. Les analyses génétiques des deux isolats (2008 et 2009) ont montré

qu'ils étaient quasi identiques à la souche du lignage 2 qui avait émergé en 2004 (Wodak et al., 2011). Comme nous le savons aujourd'hui, l'expansion explosive du WNV Lignage 2 à partir de 2008 n'a pas été restreinte qu'à la Hongrie et l'Autriche. Le virus s'est aussi disséminé au sud dans plusieurs pays des Balkans, jusqu'à atteindre la Grèce, où il a causé une importante épidémie de formes neuro-invasives chez l'humain en 2010 (197 cas sévères dont 34 décès, soit 17% de mortalité parmi ces patients) (Chaskopoulou et al., 2011; Danis et al., 2011). Ceci démontrant une augmentation de la pathogénicité de ce virus du Lignage 2. Des souches de ce lignage ont également été impliquées dans de récentes épidémies en Italie, en Roumanie et détectées en Espagne en 2017 (**Figure 6**) (sources eCDC et OIE).

On constate donc que sur ces dernières années, la circulation du WNV s'est intensifiée en Europe avec des cas cliniques humains et/ou équin en augmentation dans une dizaine de pays avec la présence de virus à la fois du Lignage 1 et du Lignage 2 (Gray and Webb, 2014). Une surveillance accrue, du fait de 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 de cas d'infections à WNV.

Cependant, les études du cycle de transmission du WNV sont difficiles car elles nécessitent la prise en compte de nombreux paramètres écologiques tels que la connaissance des espèces d'oiseaux migrateurs et sédentaires dans une région donnée ainsi que la détermination des circuits migratoires (Gray and Webb, 2014). Mais aussi la biologie des insectes, les facteurs climatiques, hydrologiques, écologiques des régions considérées et des relations entre les populations hôtes et les populations cibles (Gossner et al., 2017; Pradier et al., 2012). Ceci rend la plupart des flambées épidémiques imprévisibles et difficiles à contrôler. La situation épidémiologique des pays européens au regard du risque d'infection à WNV est de plus en plus précisément suivie, avec la mise en place d'un réseau de surveillance par l'eCDC.

Le virus West Nile semble donc s'être installé de façon pérenne sur le territoire européen et dans le bassin méditerranéen (**Figures 5-6**). De façon plus préoccupante, il semble gagner du terrain depuis 2008, puisque chaque année de nouveaux pays, de nouvelles mais aussi d'anciennes régions touchées en Europe signalent des cas d'infection à WNV (Gray and Webb, 2014). Ainsi, des foyers humains (2015, 2017) et équin (2015)

d'infections ont été détectés en France, au niveau de la Camargue et des Alpes maritimes (**Figure 6**). Il s'agit des premiers cas chez l'homme et le cheval dans le pays depuis 2003 et 2006 respectivement ([sources eCDC et OIE](#)).

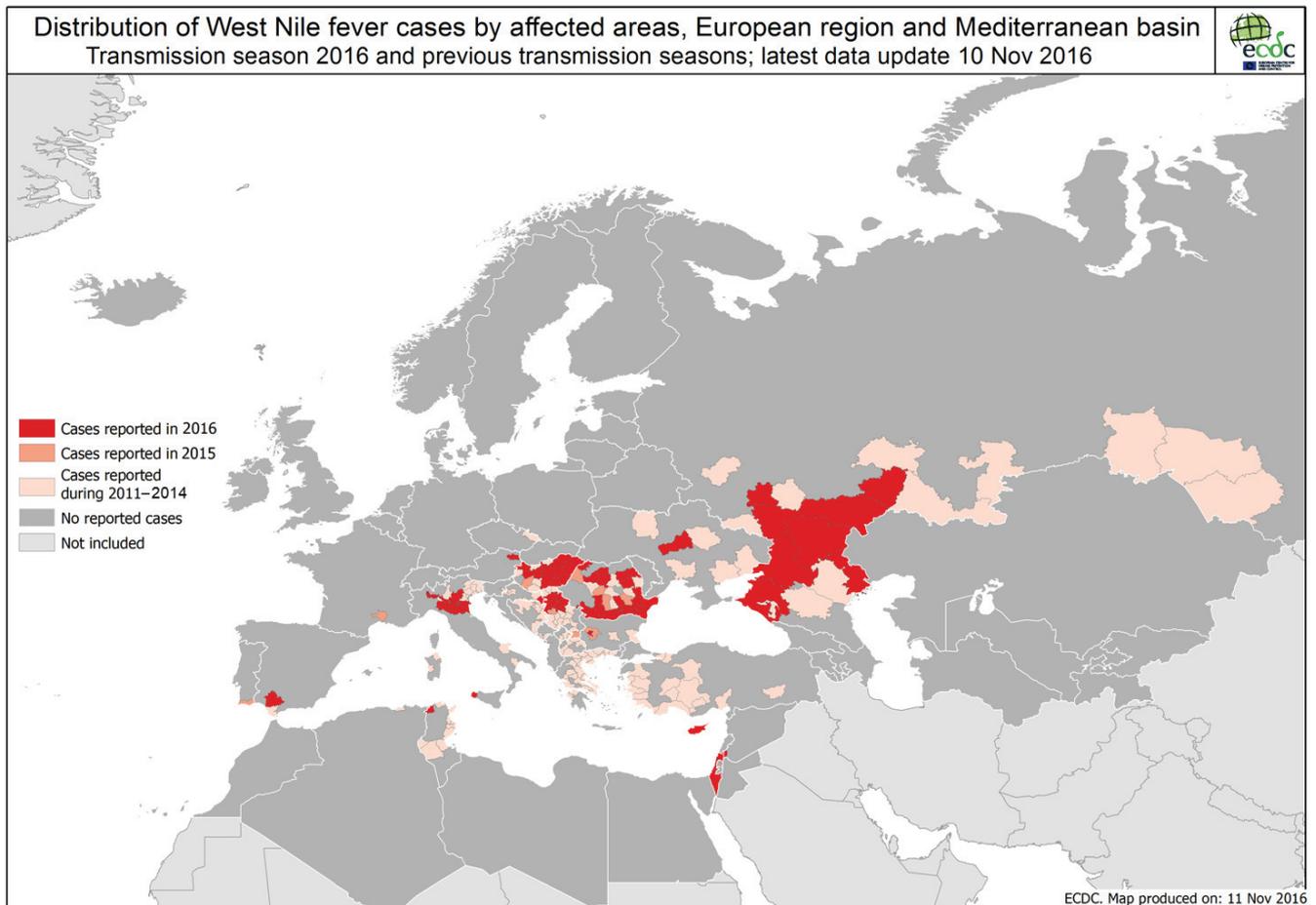


Figure 5 : Carte cumulative de la distribution des cas de WNV par zones affectées en Europe et dans le bassin méditerranéen, de 2011 à 2016. Les données prennent en compte les cas de maladies neuroinvasives, non-neuroinvasives et les donneurs de sang asymptomatiques. Seuls les cas confirmés en laboratoires sont pris en compte. ([eCDC](#))

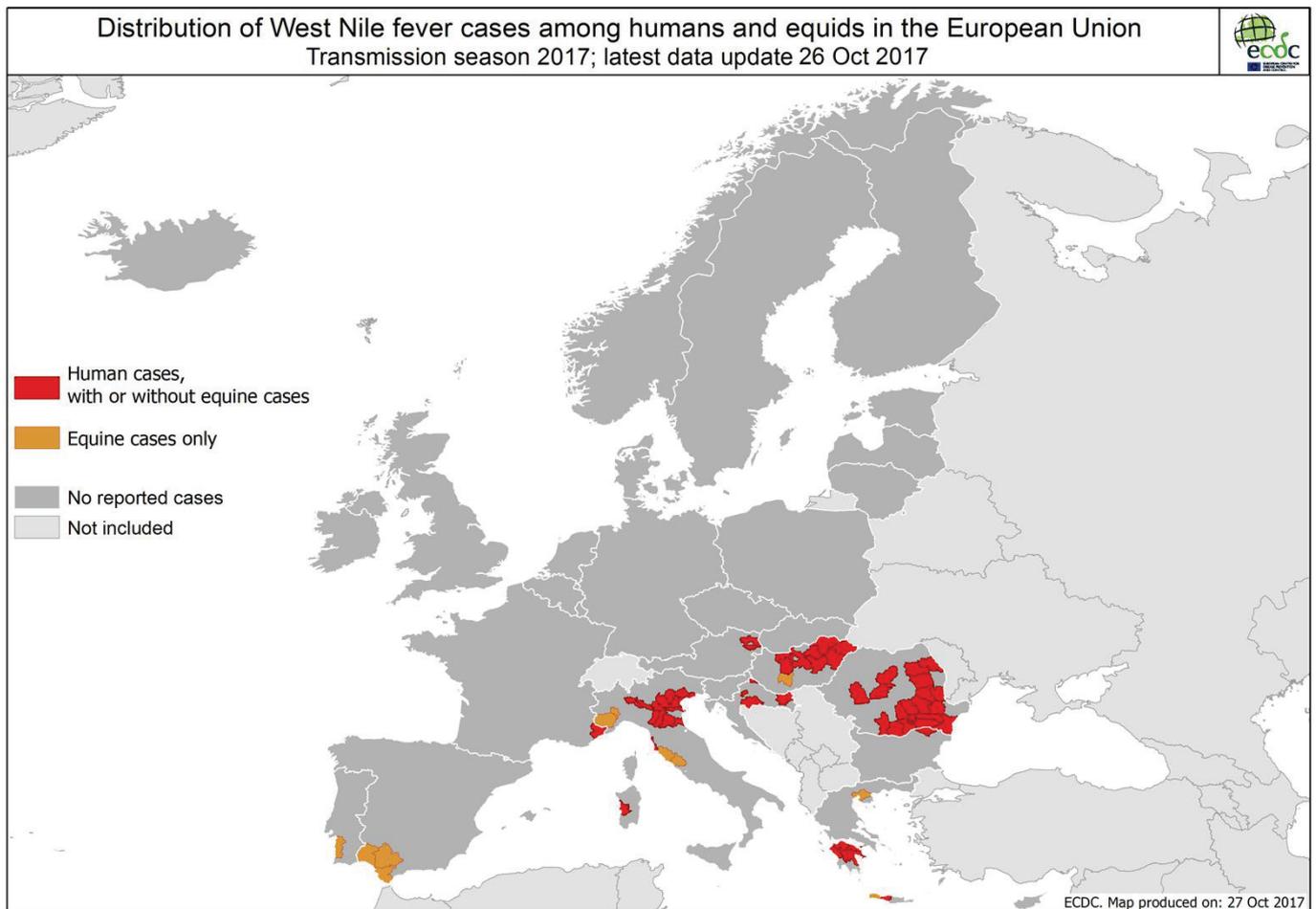


Figure 6 : Distribution des cas de WNV chez les humains et les équidés dans l'Union Européenne en 2017. Les données prennent en compte les cas de maladies neuroinvasives, non-neuroinvasives et les donneurs de sang asymptomatiques. Seuls les cas confirmés en laboratoires sont pris en compte. Les données sont arrêtées au 27/10/2017. La surveillance de la saison de transmission 2017 étant encore en cours, la carte peut être mise à jour. (Sources eCDC : <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/human-and-equine-west-nile-fever-cases>)

I.1.4 Circulation du virus sur le continent américain

Les autorités de santé évoquent l'importante circulation du virus West Nile aux Etats-Unis mais aussi sur l'ensemble du continent américain. Néanmoins, il est important de noter que cette région du globe était restée longtemps exempte de cas locaux d'infection à WNV. En effet, ce territoire naïf vis-à-vis du WNV a connu sa première épidémie en 1999, à New York (CDC, 1999; Lanciotti et al., 1999; Nash et al., 2001). L'émergence inattendue du WNV sur ce continent en 1999, s'est manifestée par l'apparition de plusieurs cas d'encéphalites

humaines avec des décès à New York, qui furent considérés initialement comme des cas d'encéphalite de Saint-Louis (Nash et al., 2001). En parallèle, la forte mortalité observée des oiseaux de la famille des *Corvidae*, a permis l'isolement du virus et sa caractérisation.

Les analyses par séquençage du génome viral mettent en avant un très fort pourcentage d'identité nucléotidique et protéique (99,8%) entre ce virus, la souche NY99 et la souche Israël 1998 (Lanciotti et al., 1999, 2002). Une hypothèse mise en avant quant à l'origine de cette première épidémie mettait en cause les nombreux échanges commerciaux, en provenance de la région d'Israël. Notamment l'importation légale ou illicite d'oiseaux infectés mais aussi le transport involontaire de populations de moustiques porteurs du WNV dans une cale de bateau (Johnston and Conly, 2000). Une introduction du virus la même année est peu probable au regard de la dynamique d'émergence de la souche du Lignage 2 en Europe. En effet, celle-ci a causé sa première épidémie trois ans après avoir été isolée dans cette région.

Cela souligne donc une possible introduction du virus antérieure à 1999 sur le sol américain. Le WNV s'est ensuite propagé rapidement dans le pays, touchant 21 états en 2001, avant d'atteindre la côte ouest et donc l'ensemble du territoire en 2004 (Hayes et al., 2005) (Figure 7). Cette dissémination très rapide du virus a notamment été facilitée par l'apparition d'un nouveau génotype du WNV, en 2002, dont la période d'incubation extrinsèque chez les vecteurs moustiques était significativement réduite (Davis et al., 2005; Ebel et al., 2004). En effet, ce nouveau génotype de WNV s'est ainsi adapté à la population de moustiques locale, favorisant la vectorisation dans de nouvelles régions. De fait, le génotype 2002 a supplanté le précédent qui dérivait de la souche NY99.

Au cours des années 2002-2003, correspondant au premier pic de transmission du WNV aux Etats-Unis, 5812 cas de maladies neuro-invasives (encéphalites, méningites, méningo-encéphalites) ont été rapportés, dont 548 décès. Soit un taux de létalité durant ces deux épidémies de plus de 9% parmi les formes sévères (Tableau 3). Les années suivantes ont vu le nombre cas de WNV diminuer avant une nouvelle flambée d'infections pendant l'été 2012. Le CDC a recensé 2873 cas d'atteinte cérébrale entraînant une issue fatale pour 270 patients (Tableau 3). A noter, depuis l'introduction du WNV dans cette région du globe, l'infection en parallèle de milliers de chevaux et d'oiseaux avec une mortalité associée

importante. Le WNV reste donc en 2017 un agent pathogène prioritaire pour les autorités sanitaires et de santé aux Etats-Unis.

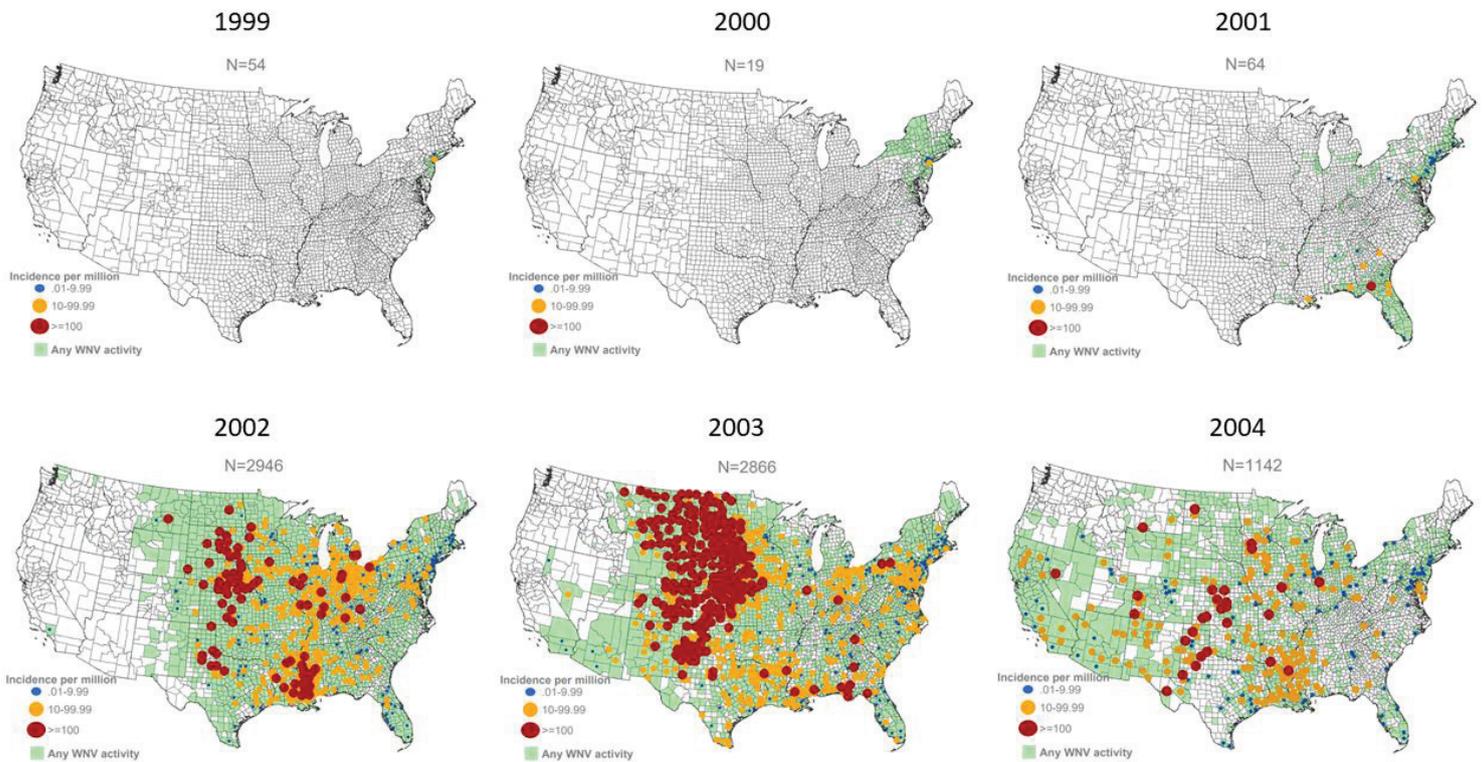


Figure 7 : Incidence de formes neuroinvasives d'infection à WNV aux Etats-Unis, par comté, de 1999 à 2004. D'après (Hayes et al., 2005)




Year	Neuroinvasive disease		Non-neuroinvasive disease		Total	
	Cases	Deaths	Cases	Deaths	Cases	Deaths
	No.	No. (%)	No.	No. (%)	No.	No. (%)
1999	59	7 (12)	3	0 (0)	62	7 (11)
2000	19	2 (11)	2	0 (0)	21	2 (10)
2001	64	10 (16)	2	0 (0)	66	10 (15)
2002	2,946	276 (9)	1,210	8 (1)	4,156	284 (7)
2003	2,866	232 (8)	6,996	32 (<1)	9,862	264 (3)
2004	1,148	94 (8)	1,391	6 (<1)	2,539	100 (4)
2005	1,309	104 (8)	1,691	15 (1)	3,000	119 (4)
2006	1,495	162 (11)	2,774	15 (1)	4,269	177 (4)
2007	1,227	117 (10)	2,403	7 (<1)	3,630	124 (3)
2008	689	41 (6)	667	3 (<1)	1,356	44 (3)
2009	386	32 (8)	334	0 (0)	720	32 (4)
2010	629	54 (9)	392	3 (1)	1,021	57 (6)
2011	486	42 (9)	226	1 (<1)	712	43 (6)
2012	2,873	270 (9)	2,801	16 (1)	5,674	286 (5)
2013	1,267	111 (9)	1,202	8 (<1)	2,469	119 (5)
2014	1,347	87 (6)	858	10 (1)	2,205	97 (4)
2015	1,455	142 (10)	720	4 (<1)	2,175	146 (7)
2016	1,309	105 (8)	840	1 (<1)	2,149	106 (5)
Total	21,574	1,888 (9)	24,512	129 (<1)	46,086	2,017 (4)

Source: ArboNET, Arboviral Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention

Tableau 3 : Tableau des cas de maladie à WNV et des décès associés rapportés par le CDC par année et forme clinique (1999-2016). Ces données tiennent compte uniquement des cas déclarés par les médecins et confirmés en laboratoire. D'après les données du CDC (<https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/cumMapsData.html>).

Le Canada a été touché dès l'an 2000, avec la déclaration de maladies à WNV chaque année depuis. Ensuite les Caraïbes, avec la Guadeloupe en 2002 et le Mexique, pour atteindre l'Amérique du Sud avec l'Argentine en 2006 (Estrada-Franco et al., 2003; Komar and Clark, 2006; Petersen and Hayes, 2008; Quirin et al., 2004). Néanmoins, la situation sur le continent américain est très contrastée. Les Etats-Unis et le Canada rapportent chaque

année de nombreux cas humains et dans la population animale, tandis que dans les pays d'Amérique Latine, la circulation du virus West Nile n'a été mise en évidence que par l'enregistrement de séroconversions chez les chevaux et les oiseaux. Peu de cas neurologiques d'infection à WNV ont été détectés jusqu'ici (Komar and Clark, 2006). La circulation de *Flavivirus* proches du WNV sur ces territoires peut conférer une immunité protectrice contre une infection ultérieure par le WNV. Ceci compte tenu d'importantes réactions croisées entre un serum dirigé contre un *Flavivirus* mais pouvant reconnaître les antigènes de surfaces de plusieurs autres *Flavivirus*. Or, un grand nombre de *Flavivirus*, tels que le virus de l'encéphalite de Saint-Louis, les virus Rocio, Iguape, mais aussi et surtout le virus de la Dengue sont présent en Amérique du Sud (Batista et al., 2011). Cependant, la prévalence des premiers virus est trop faible pour expliquer une différence si marquée entre l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud. Le DENV, quant à lui, même s'il est très répandu dans les régions du centre et du sud, n'expliquerait pas le faible nombre de cas cliniques chez les chevaux et les oiseaux. En effet, DENV ne se réplique pas, ou faiblement, chez ces hôtes vertébrés (Blitvich, 2008).

Malgré une distribution mondiale du WNV, on observe des situations épidémiologiques très contrastées entre l'Europe, les Etats-Unis ou encore l'Amérique Centrale et du Sud. Les principales hypothèses avancées concernent des différences de virulence parmi les souches circulantes du WNV. En particulier des mutations induisant une virulence accrue pour la faune aviaire comme cela a pu être observé pour le Lignée 2 en Europe ou encore pour les souches circulant en Amérique du Nord (Brault et al., 2007). Ce phénotype pourrait alors être la cause unique de l'apparition d'épidémies importantes dans cette région. Cependant, la plupart des virus isolés en Amérique Latine sont très proches des isolats nord-américains et ne semblent pas présenter une virulence atténuée pouvant expliquer cette différence entre les deux zones. L'explication la plus probable repose donc sur des différences dans l'écologie complexe du WNV, telles que les facteurs environnementaux, la susceptibilité et l'amplification du virus dans l'avifaune, ainsi que la capacité et la compétence vectorielle des moustiques, entre une région donnée et les autres où le virus West Nile circule (Brault, 2009).

I.2 Cycle de transmission du WNV

I.2.1 Transmission du WNV et compétence vectorielle

Le virus West Nile est un arbovirus, c'est-à-dire qu'il est véhiculé par un arthropode vecteur, dans le cas de ce virus, le moustique. Cependant, son cycle de transmission implique un hôte aviaire qui est le réservoir naturel du WNV (**Figure 8**). Dans les années 1950, en Egypte, le rôle d'hôtes amplificateurs du virus par les oiseaux a été mis en évidence (Taylor et al., 1956). Cela a également été démontré chez les moustiques vecteurs, notamment chez le genre *Culex* (Ciota and Kramer, 2013; Taylor et al., 1956). Les moustiques s'infectent en ingérant le virus lors d'un repas sanguin. Le virus va ensuite se répliquer après passage de la barrière intestinale du moustique puis va atteindre les glandes salivaires d'où il pourra être transmis à nouveau lors d'un autre repas sanguin. Cette étape est directement en relation avec les conditions climatiques (température, humidité...) qui vont influencer l'activité des vecteurs et le temps de transmission du virus. En plus du genre *Culex*, des moustiques appartenant aux genres *Aedes* ou *Mansonia* peuvent également être porteurs du WNV (Holick et al., 2002; Khan et al., 2017).

Néanmoins, une espèce porteuse du WNV ne signifie pas pour autant que celle-ci pourra transmettre le virus et le propager. Il est donc pertinent d'étudier la compétence vectorielle, c'est-à-dire la possibilité qu'a un vecteur à être infecté par le virus, à le répliquer et enfin à assurer sa transmission à un nouvel hôte (Beerntsen et al., 2000). Il a été possible de préciser les espèces de moustiques impliqués dans le cycle de transmission du WNV, ce qui a permis une meilleure surveillance de la diffusion du virus. C'est ainsi que l'on a pu mettre en évidence la forte implication des moustiques de l'espèce *Culex pipiens* dans la transmission du WNV en Europe (Ciota and Kramer, 2013). Aux Etats-Unis, ce sont les espèces endémiques et très répandue *Culex quinquefasciatus* et *Culex tarsalis* qui sont les principaux vecteurs du WNV (Ciota and Kramer, 2013).

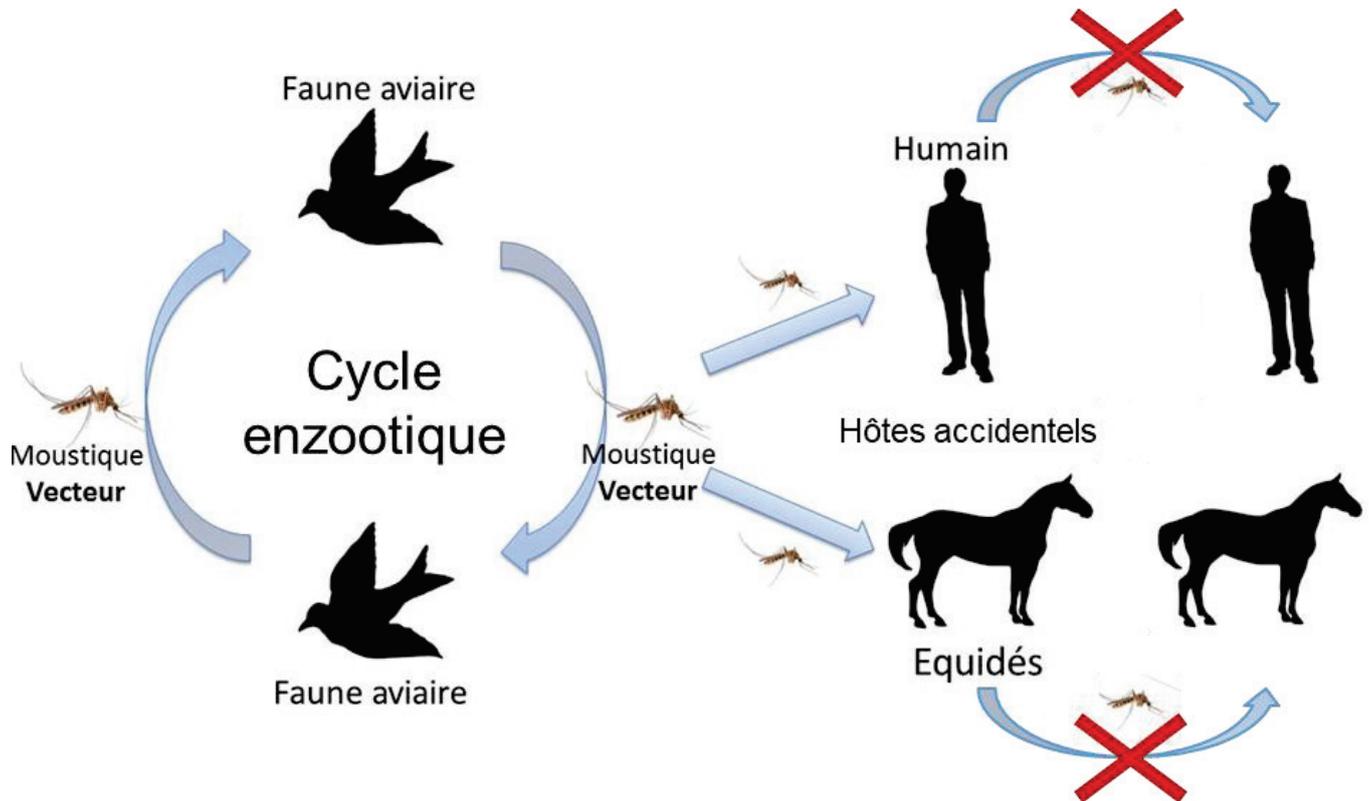


Figure 8 : Représentation schématique du cycle de transmission du WNV.

1.2.2 Virémie et transmission inter-espèces

La virémie désigne la présence de virus dans le sang, non seulement d'un point de vue qualitatif, mais surtout quantitatif, en exprimant la charge virale présente dans le sang. Le niveau de la virémie est le facteur majeur qui permet d'expliquer pourquoi un oiseau (ou une population d'oiseaux), plutôt qu'un(e) autre, va pouvoir contaminer un type de moustique piqueur, lequel sera, par voie de conséquence, plus compétent/efficace qu'un autre pour sa vectorisation. C'est ainsi que l'on a démontré qu'une virémie élevée assure une transmission rapide et facilitée du WNV (Brault, 2009). Une virémie élevée chez certains oiseaux permettra ainsi à des moustiques moyennement sensibles ou compétents de s'infecter de façon efficace lors d'un repas sanguin (Brault, 2009; Komar et al., 2003). On peut donc supposer que, même si le WNV circule dans une région où la population locale de

moustiques a une faible compétence vectorielle, une virémie élevée sera atteinte chez son hôte aviaire afin de s'y maintenir.

De façon réciproque, les vecteurs sensibles au WNV permettront une transmission efficace du virus, même s'ils sont en contact avec une population aviaire développant une faible virémie. Ceci est observé dans les régions endémiques au WNV, comme l'Afrique, l'Europe, les Etats-Unis (Brault, 2009). Une forte circulation du WNV dans la faune aviaire et la présence de moustiques vecteurs capables de s'infecter à partir d'oiseaux virémiques et de piquer ultérieurement un hôte sensible, sont à l'origine de l'apparition de cas d'infection au WNV chez l'homme et le cheval (Brault, 2009; Ciota and Kramer, 2013). Contrairement à ce qui est observé chez les oiseaux, ces espèces hôtes ne présentent pas une virémie suffisamment élevée pour permettre l'infection de vecteurs compétents au cours d'un repas sanguin (Brault, 2009; Chancey et al., 2015). Ainsi, l'homme et le cheval sont considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques du fait de leur incapacité à propager le WNV (Figure 8) (Chancey et al., 2015).

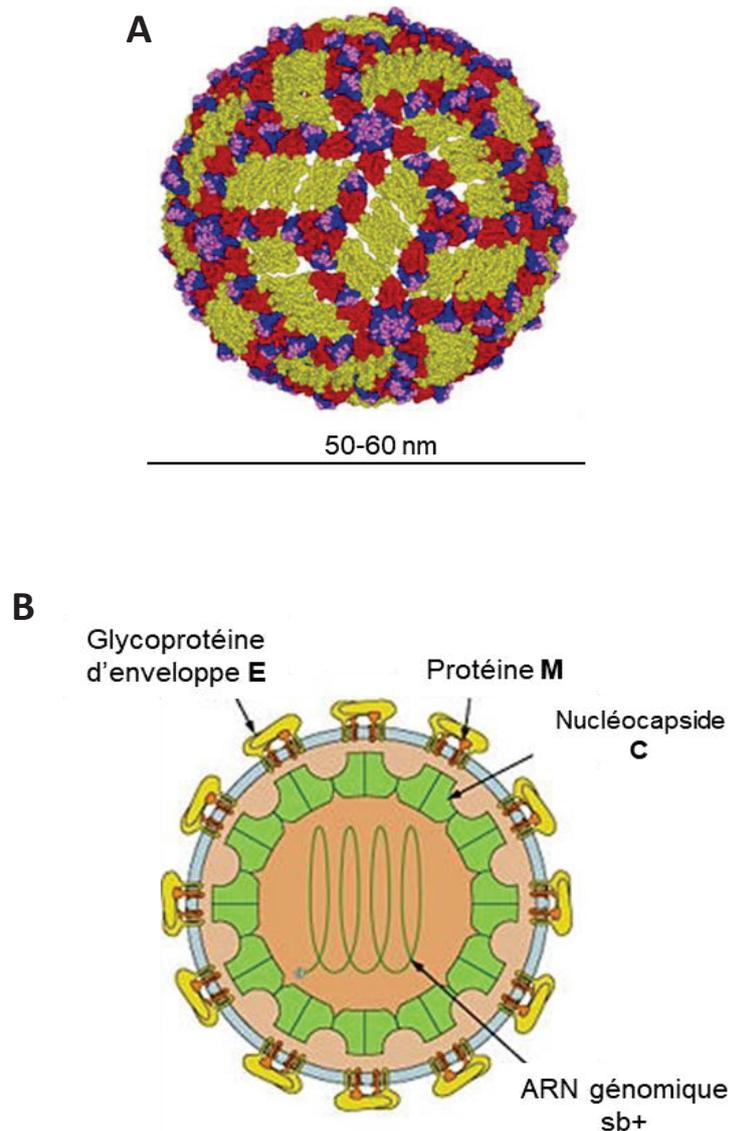
Même si quelques travaux ont pu mettre en avant des hypothèses expliquant la persistance du WNV en dehors de la période d'activité des moustiques vecteurs, les mécanismes associés à cette persistance sont encore assez mal connus (Chancey et al., 2015; Ciota, 2017). Ceci entraînant des difficultés pour modéliser et anticiper ainsi les épidémies d'une année à l'autre.

1.3 Structure et génome du WNV

1.3.1 La Particule Virale

Le virus West Nile, à l'instar de tous les flavivirus, est un virus enveloppé, de forme sphérique, avec une taille variant de 50 à 60nm de diamètre (Figure 9 A). Les analyses structurales par imagerie électronique couplée à de la modélisation révèlent des particules virales « lisses », sans spicules à leur surface (Mukhopadhyay et al., 2003). La surface des virions matures est constituée de deux protéines structurales du virus. La première, la

protéine d'enveloppe E, est agencé en 90 dimères antiparallèles, avec une symétrie de type icosaédrique (Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2007). La protéine de membrane M est le deuxième constituant de l'enveloppe des *Flavivirus*. Le core du virus, qui contient et protège le génome viral, est lui constitué d'une seule protéine structurale, la protéine de capsid C pour former la nucléocapside (Figure 9 B).



Source : Swiss Institute on Bioinformatics, ViralZone

Figure 9 : Structure de la particule virale WNV. A, modélisation structurale de la surface des particules virales WNV. B, représentation schématique d'une coupe transversale de la particule virale WNV. D'après (Diamond et al., 2008) et ViralZone.

I.3.2 Organisation génomique du WNV

Le génome du WNV, commun à tous les *Flavivirus*, est un ARN simple brin de polarité positive. D'une taille d'environ 11kb, la molécule porte une coiffe (7mGpppN) à son extrémité 5' et n'est pas polyadénylée en 3' (**Figure 10 A**). Les régions non codantes (UTR) aux extrémités 5' et 3' sont conservées et forment des structures secondaires en épingle à cheveux, nécessaires pour les étapes de la réplication, à savoir la transcription, la traduction et l'empaquetage de l'ARN viral (**Figure 10 A**) (Brinton and Dispoto, 1988; Khromykh et al., 2001a). La région codante est constituée d'un seul cadre ouvert de lecture (ORF) d'une taille de 3300 acides aminés (aa) (**Figure 10 A**). L'intégralité du génome est traduite en une polyprotéine qui est clivée co- et post-traductionnellement à la fois par des protéases virale et cellulaires (**Figure 10 B-C**). L'extrémité 5' de la polyprotéine code les 3 protéines structurales (C, prM/M et E), tandis que l'extrémité 3' code les 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (**Figure 10 B-C**).

Les protéines structurales sont nécessaires pour l'encapsidation du génome viral (par la protéine C), mais aussi pour les interactions et la fusion avec la cellule cible (protéines E et M) (Kimura and Ohyama, 1988; Suthar et al., 2013a). Les protéines de surfaces sont immunogènes et sont donc également capables de stimuler la réponse immunitaire via les lymphocytes B et T, induisant la production d'anticorps neutralisants (Sánchez et al., 2005; Suthar et al., 2013a).

Les protéines non-structurales sont impliquées dans la réplication virale, l'assemblage des particules et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte (Brinton, 2013; Suthar et al., 2013a).

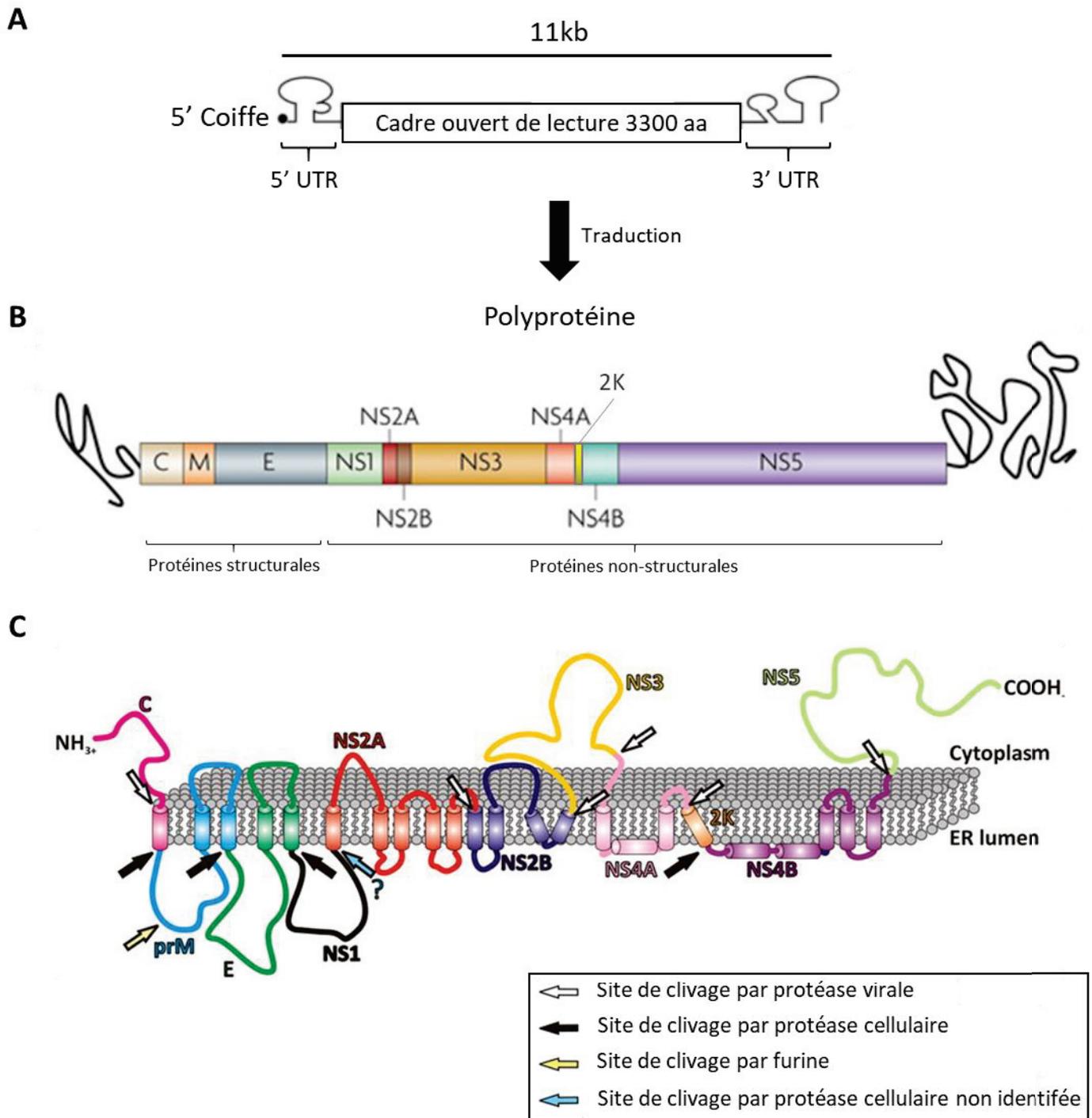


Figure 10 : Organisation génomique du WNV. A, Représentation schématique du génome de WNV. B, représentation schématique de la polyprotéine obtenue après traduction de l'ARN viral. C, Représentation schématique de la topologie membranaire prédictive de la polyprotéine virale à partir d'analyses biochimiques et cellulaire. La polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales et cellulaires afin de former l'ensemble des protéines virales. Synthèse personnelle inspirée de (Assenberg et al., 2009; Guzman et al., 2010; Liu et al., 2010)

I.3.2.1 Les régions non codantes

a. **L'extrémité 5'**

La région 5' non traduite (UTR) possède une coiffe (m⁷GpppA) qui est reconnue par la protéine cellulaire cytoplasmique eIF4B (facteur eucaryotique d'initiation de la traduction) et par le facteur eIF4F du complexe d'initiation (Chiu et al., 2005; Clyde and Harris, 2006). Ce complexe permet le recrutement de la petite sous-unité ribosomale afin d'initier la traduction de l'ARN viral en polyprotéine.

b. **L'extrémité 3'**

L'extrémité 3' UTR est caractérisée par une structure en épingle à cheveux, hautement conservée chez les *Flavivirus*, qui sert de promoteur à la synthèse du brin ARN(+) (Shi et al., 1996a, 1996b; Thurner et al., 2004). Cette région possède aussi une séquence de cyclisation qui induit l'interaction entre les extrémité 5' et 3' du génome viral, essentielle pour la réplication (Khromykh et al., 2001a; Polacek et al., 2009).

c. **ARN sub-génomique de *Flavivirus***

Chez l'ensemble des *Flavivirus*, et de manière spécifique à ce genre viral, est produit un ARN sub-génomique (sfRNA) qui dérive de l'extrémité 3' UTR (Pijlman et al., 2008; Roby et al., 2014). Le sfRNA est un produit de la dégradation incomplète de l'ARN génomique viral par la 5'-3' exoribonucléase cellulaire XRN1 qui stagne au niveau des structures secondaires hautement ordonnées au début de l'extrémité 3' UTR de l'ARN viral (Funk et al., 2010; Pijlman et al., 2008; Roby et al., 2014). La génération de sfRNA entraîne l'inhibition de l'activité de XRN1 permettant d'augmenter la stabilité de nombreux ARN messagers (Pijlman et al., 2008). Les sfRNA sont impliqués dans la pathogénicité, en inhibant notamment les activités antivirales de l'interféron de type I et de la voie de l'ARN interférence (Schnetzler et al., 2012; Schuessler et al., 2012). Cependant, les mécanismes impliqués dans ces fonctions restent assez peu connus.

1.3.2.2 Les protéines Structurales

a. La protéine C de capsid

La protéine C de capsid, d'un poids moléculaire de 11kDa, est hautement basique. Elle est associée au génome viral pour former la nucléocapsid, protégée par l'enveloppe du virus. L'organisation structurale de la capsid confère la forme sphérique à la particule. La protéine C forme des dimères, similaires à la protéine C de DENV, qui sont organisés en tétramères avec des charges de surfaces hautement positives (Dokland et al., 2004). Au sein de la polyprotéine, le précurseur C de 123 aa est adressé à la membrane du Réticulum Endoplasmique (RE) par une séquence hydrophobe située à l'extrémité C-terminale. Celle-ci est ensuite clivée par la protéase virale NS2B-NS3 pour donner la forme mature de C, d'une taille de 105aa (Nowak et al., 1989; Speight and Westaway, 1989). Les régions N- et C-terminales, possédant des résidus chargés, sont impliqués dans la fixation à l'ARN viral (Khromykh and Westaway, 1996). La phosphorylation de la protéine C par la protéine Kinase C (PKC) est essentielle pour exercer ses fonctions dans la cellule lors de l'infection (Bhuvanankantham et al., 2010). Des rôles au niveau de l'apoptose lui sont décrits, avec à la fois une fonction pro-apoptotique mais aussi anti-apoptotique (Bhuvanankantham et al., 2010; Urbanowski and Hobman, 2013; Yang and al, 2002). Ceci suggérant que la protéine C du WNV est un facteur important dans la modulation des mécanismes cellulaires au cours de l'infection virale.

b. La protéine M de membrane

La glycoprotéine M est un des deux déterminants viraux de surface, avec la protéine E d'enveloppe. Elle est produite au cours de la maturation des particules virales néo-formées transitant par la voie sécrétoire (Golgi). La protéine M, ancrée dans la membrane virale, est un fragment protéolytique de la protéine précurseur prM (**Figure 11 A**). Ces deux formes sont essentiellement impliquées dans le changement et le maintien de la conformation de la protéine d'enveloppe. Le précurseur prM de 26kDa de la protéine M est adressé au RE via le domaine C-terminal hydrophobe de la protéine C. L'extrémité N-terminale de prM porte des sites de glycosylation (1 à 3) et 6 résidus cystéine conservés chez l'ensemble des *Flavivirus* (Lindenbach et al., 2007).

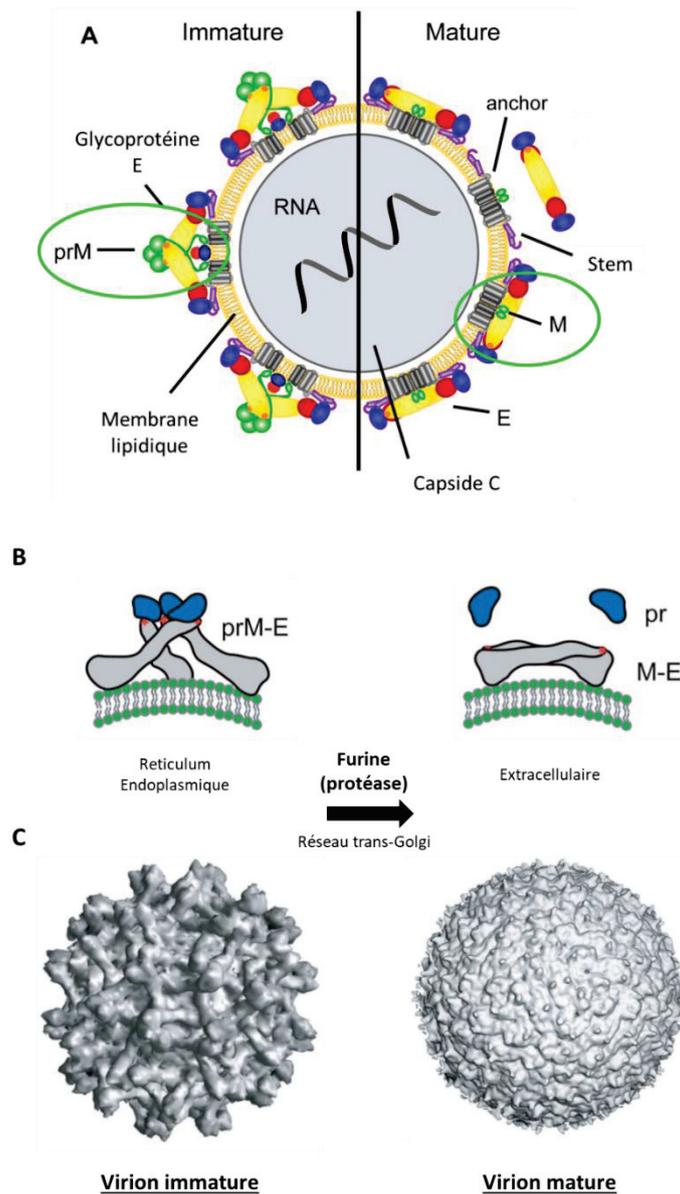


Figure 11 : Maturation des virions par clivage protéasique Furine-dépendant de prM/M. A, représentation schématique d'une particule de *Flavivirus* avant et après maturation. B, représentation schématique du clivage de prM par la protéase cellulaire furine. Le peptide de fusion (point rouge) porté par la protéine E est exposé après clivage. C, reconstruction par Cryo-EM des particules de *Flavivirus* immatures (avant clivage de prM) et matures (après clivage de prM). Synthèse personnelle adaptée de (Perera and Kuhn, 2008; Vratskikh et al., 2013).

La forme prM, en interagissant avec la protéine E, participe au repliement correct de celle-ci (Konishi and Mason, 1993; Lorenz et al., 2002). Parce que prM camoufle le peptide de fusion porté par la protéine E, sa principale fonction est de prévenir le réarrangement pH-

dépendant de E lors du transport des particules immatures dans la voie sécrétoire. Un clivage protéasique furine-dépendant de prM en deux fragments, pr et M, dans le réseau trans-Golgi, induit la conversion des particules immatures en particules matures infectieuses (Mukhopadhyay et al., 2003; Stadler et al., 1997). Suite au clivage, les hétérodimères prM-E se dissocient, relarguant le fragment pr, et les homodimères de protéines E se forment, conférant une apparence « lisse » à la surface du virion (**Figure 11 A-C**). Le peptide de fusion est ainsi exposé.

c. La protéine E d'enveloppe

La glycoprotéine E (50-55kDa) du WNV, codée par le gène viral de l'enveloppe (E) est la principale protéine de surface du virion (Mukhopadhyay et al., 2005; Pierson and Kielian, 2013). Comme évoqué précédemment, elle est fortement impliquée dans la reconnaissance et la fixation aux récepteurs ainsi que dans la fusion à la membrane plasmique dans l'endosome (Mukhopadhyay et al., 2005; Pierson and Kielian, 2013; Smit et al., 2011). Sous sa forme native, E se replie en une structure allongée, riche en feuilletts β et s'assemble en homodimères disposés de manière antiparallèle (**Figure 12**) (Pierson and Kielian, 2013). La protéine possède 12 résidus de cystéine qui forment six ponts disulfures (Nybakken et al., 2006). Ces six ponts disulfures sont hautement conservés chez tous les *Flavivirus* mettant en avant leur importance dans la structure et la conformation correcte de E (Pierson and Kielian, 2013). L'ectodomaine de la protéine E est ancrée dans la membrane virale par une région hélicoïdale nommée "tige d'ancrage" (ou "stem-anchor ") (Nybakken et al., 2006; Pierson and Kielian, 2013).

La protéine E est glycosylée et organisée en domaines structuraux indépendants séparés par des boucles flexibles (Kanai et al., 2006; Nybakken et al., 2006). Chaque sous-unité de E est organisée en 3 domaines structuraux et fonctionnels : le domaine I (E-DI), le domaine II (E-DII) et enfin le domaine III (E-DIII) (**Figure 12**) (Nybakken et al., 2006). Le E-DI, composé de 8 feuilletts β , contient deux grandes boucles d'insertion qui sont responsables de la forme allongée du domaine DII. Le E-DII est impliqué dans la formation et la stabilisation du dimère. De plus, il contient le peptide de fusion impliqué dans la fusion membranaire entre le virus et l'endosome de la cellule hôte (**Figure 12**) (Heinz and Allison, 2001; Nybakken et al., 2006). Le E-DIII forme, quant à lui, une structure compacte de 10 feuilletts β présentant

un repliement similaire aux immunoglobulines et contient les motifs de fixation aux récepteurs cellulaires (Nybakken et al., 2006; Pierson and Kielian, 2013). Le E-DIII joue un rôle dans les étapes de reconnaissance et d'adhésion du WNV à la surface de la cellule hôte, puisqu'il porte des épitopes de neutralisation virale (Choi et al., 2007; Chua et al., 2013; Pierson and Kielian, 2013). Au moment de la fusion pH-dépendante dans l'endosome, la protéine E change de conformation pour s'organiser en trimère et présenter ainsi le peptide de fusion vers la membrane endosomale (Figure 13).

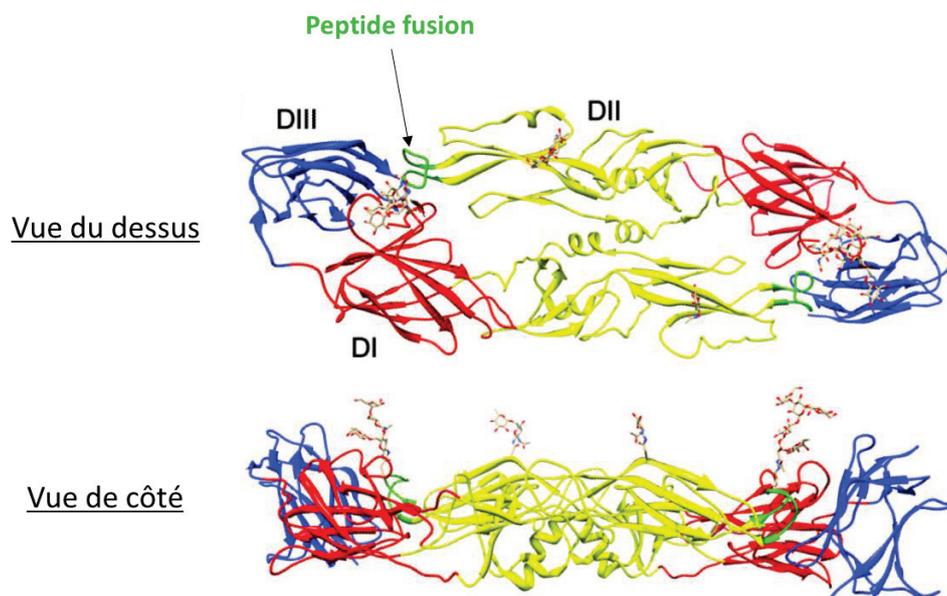


Figure 12 : Représentation structurale de la glycoprotéine d'enveloppe E. (sous sa forme homodimérique). La protéine E est présente sous forme de dimères antiparallèles à la surface des particules matures. Adaptée de (Pierson and Kielian, 2013).

Le domaine E-DII porte les épitopes de groupe et sous-groupe des principaux *Flavivirus*, entraînant des réactions immunitaires croisées (Oliphant et al., 2006). Les domaines DI et DIII contiennent des épitopes majoritairement spécifiques aux types et aux sous-types de virus. Cependant, les épitopes des domaines DI et DII présentent de faibles propriétés immunogènes contrairement au domaine DIII (Oliphant et al., 2006). En effet, la plupart des épitopes ciblés par les anticorps neutralisants ont été localisés au niveau du domaine DIII (Figure 14) (Choi et al., 2007; Chua et al., 2013; Pierson and Kielian, 2013). De plus, lorsqu'il est exprimé comme une protéine recombinante, le domaine E-DIII du WNV est

capable de se replier de façon autonome et d'agir comme un domaine fonctionnel susceptible de générer des anticorps neutralisants dirigés contre le WNV (Chua et al., 2013).

La glycosylation de E est déterminante à la fois dans la capacité de neuro-invasion du WNV, dans l'assemblage et dans l'infectiosité des particules (Hanna et al., 2005; Shirato et al., 2004).

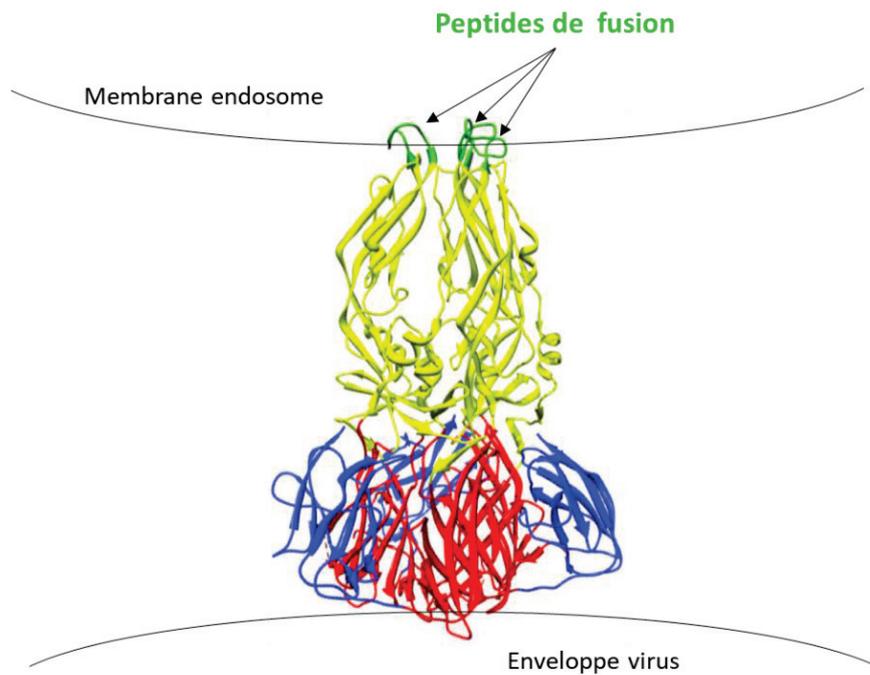


Figure 13 : Représentation structurale de la protéine E sous forme trimérique après la fusion. Adaptée de (Pierson and Kielian, 2013).

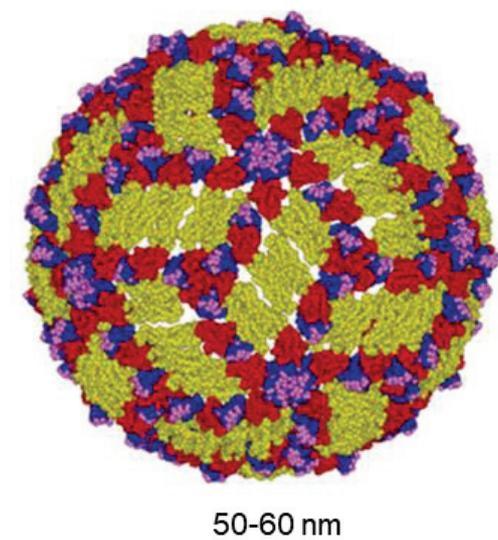


Figure 14 : Modélisation structurale de l'organisation de la protéine E à la surface des virions. Une particule de *Flavivirus* mature contient 90 dimères de protéines E organisés avec une symétrie icosahédrale T=3. Domaine DI = rouge, domaine DII = jaune, domaine DIII = bleu. Les principaux épitopes du domaine DIII inducteurs d'anticorps neutralisant sont représentés en violet. D'après (Diamond et al., 2008).

1.3.2.3 Les protéines Non-Structurales

a. La protéine NS1

NS1 est une glycoprotéine non-structurale multifonctionnelle d'un poids moléculaire de 46-55kDa suivant le statut de glycosylation (Lee et al., 1991; Post et al., 1991; Smith and Wright, 1985). Au cours de la synthèse de la polyprotéine, la région peptidique correspondant à NS1 est située dans le lumen du RE où des peptidases de la cellule hôte clivent les jonctions E/NS1 et NS1/NS2A (Falgout and Markoff, 1995). Après clivage, NS1, alors sous forme monomérique, subit des glycosylations dans le RE avant de former des homodimères (Fan and Mason, 1990).

La protéine NS1 existe sous de multiples formes oligomériques et est retrouvée à différentes localisations cellulaires : associée aux membranes internes de la cellule (mNS1) ou à la surface cellulaire (formes dimériques) (Fan and Mason, 1990; Schlesinger et al., 1990). La protéine NS1 présente également une forme hexamérique, riche en lipide, qui est sécrétée de la cellule infectée (sNS1) (Akey et al., 2014; Crooks et al., 1994; Gutsche et al., 2011; Post et al., 1991; Smith et al., 1970).

Au cours de l'infection par le WNV mais aussi chez l'ensemble du genre *Flavivirus*, la protéine non-structurale NS1 intracellulaire est requise pour la réplication de l'ARN viral (Youn et al., 2013). Elle permet de stabiliser le complexe de réplication, situé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et constitué de l'ensemble des protéines non-structurales des *Flavivirus* et de l'ARN viral (Mackenzie et al., 1996; Westaway et al., 1997). La protéine NS1 associée à la surface cellulaire ainsi que la forme sécrétée sont hautement immunogènes, induisant une importante production d'anticorps dirigés contre cet antigène (Akey et al., 2014; Avirutnan et al., 2007; Schlesinger et al., 1990; Sun et al., 2011). sNS1, est fortement impliquée à la fois dans l'évasion à la réponse immune de l'hôte mais aussi, paradoxalement,

dans la dérégulation/sur-activation de celle-ci (Akey et al., 2015; Beatty et al., 2015; Crook et al., 2014; Macdonald et al., 2005; Mackenzie et al., 1996; Muller and Young, 2013; Watterson et al., 2016). Ainsi, sNS1 joue un rôle important dans la pathogenèse et la pathophysiologie lors d'une infection par le WNV ou d'autres *Flavivirus*.

Une forme plus longue de NS1, NS1', est souvent détectée lors d'infections par les membres du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise (Melian et al., 2009). 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 réplication (peut substituer la fonction de NS1) et la neuroinvasion du WNV (Young et al., 2013).

La structure, les rôles et principales fonctions de NS1 et de sa forme sécrétée (sNS1) seront développés de manière plus exhaustive dans la partie II de cette synthèse.

b. Les protéines NS2A et NS2B

NS2A, une protéine hydrophobe membranaire de 22kDa, est impliquée dans l'assemblage des particules virales (Leung et al., 2008; Liu et al., 2003). Elle est aussi intégrée dans les complexes de réplication par interaction avec les protéines virales NS3 et NS5, ainsi qu'avec la région 3' UTR de l'ARN viral (Mackenzie et al., 1998). Cette localisation met en avant une participation de NS2A dans la coordination entre la réplication de l'ARN viral et son incorporation dans la nucléocapside (Khromykh et al., 2001b). La protéine est formée suite au clivage cytosolique de NS2A/NS2B par le couple protéolytique NS2B/NS3. D'autres travaux ont pu mettre en évidence un rôle inhibiteur de la réponse interféron de type I par NS2A, ainsi qu'une participation dans l'apoptose induite au cours de l'infection virale (Liu et al., 2006; Melian et al., 2013).

NS2B est une petite protéine de 14kDa associée aux membranes du RE, au niveau des complexes de réplication, et est impliquée dans le recrutement des autres protéines virales (Yu et al., 2013). Elle forme le précurseur sérine protéinase NS2B/NS3 et permet l'activation de la protéase virale NS3 entraînant le clivage au niveau de la polyprotéine entre ces deux partenaires (Clum et al., 1997; Condotta et al., 2010). NS2B agit donc comme un co-facteur de NS3 et de sa fonction protéasique.

c. La protéine NS3

NS3 est une protéine multifonctionnelle de 70kDa impliquée dans la réplication et le clivage de la polyprotéine flavivirale. Au niveau de sa région N-terminale, NS3 porte un domaine d'activité sérine protéase. En région C-terminale, on retrouve des activités hélicase, NTPase et ATPase (Feito et al., 2008; Gorbalenya et al., 1989; Mastrangelo et al., 2007). NS3 est responsable du clivage protéolytique des jonctions NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4B/NS5 (Lindenbach et al., 2007). Cette fonction de NS3 est également impliquée dans la maturation des protéines C de capsid et NS4A (Lin et al., 1993; Yamshchikov and Compans, 1994). La protéine NS3 possède également une activité RTPase (ARN triphosphatase) qui permet la déphosphorylation de la partie 5' de l'ARN viral lors de la transcription, avant l'ajout de la coiffe (Wengler and Wengler, 1993). Enfin, la NS3 du WNV contribue à l'induction d'une mort cellulaire par apoptose via l'activation de la caspase 8 (Ramanathan et al., 2006). Ceci influe alors sur les effets cytopathiques produits au cours de l'infection par le virus.

d. Les protéines NS4A, 2K et NS4B

NS4A et NS4B sont des protéines hydrophobes de 16 et 27 kDa, séparées par le peptide 2K. NS4A est localisée au sein des complexes de réplication (Mackenzie et al., 1998), ce qui suppose un rôle dans la réplication de l'ARN. Le peptide 2K sert de séquence signal pour la translocation de NS4B dans la lumière du RE (Lin et al., 1993). Le clivage NS4A/2K/NS4B est nécessaire pour l'induction des réarrangements des membranes cytoplasmiques (formation de vésicules pour la réplication) par NS4A (Miller et al., 2007; 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. En effet, une mutation au sein de ce peptide a démontré une résistance à un anti-viral (la lycorine) via l'augmentation de la vitesse de réplication (Zou et al., 2009). NS4B fait également partie du complexe de réplication viral (Miller et al., 2006). Elle co-localise 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 réduisant la vitesse de réplication et la quantité d'ARN synthétisé, 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 de type I (Muñoz-Jordán et al., 2005; Wicker et al., 2012).

e. La protéine NS5

NS5, la plus grosse protéine du WNV d'un poids moléculaire de 103 kDa, est une protéine multifonctionnelle hautement conservée chez le genre *Flavivirus* (Zhou et al., 2007). NS5 est l'ARN polymérase-ARN-dépendante, nécessaire pour la réplication du génome viral au sein de complexes faisant intervenir des protéines d'origine à la fois virale et cellulaire (Chu and Westaway, 1987; Guyatt et al., 2001; Steffens et al., 1999; TAN et al., 1996). En interagissant avec NS3, la protéine NS5 a été identifiée comme étant un composant majeur des complexes de réplication de l'ARN viral. En plus de son rôle de polymérase, elle possède une activité méthyltransférase (Zhao et al., 2015; Zhou et al., 2007). NS5 participe à l'évasion à la réponse innée de l'hôte en empêchant l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 (pY-STAT1) et réprimant l'expression des gènes sous contrôle des interférons de type I (Laurent-Rolle et al., 2010; Lubick et al., 2015).

I.4 Le cycle de réplication du virus

I.4.1 Entrée du virus

L'entrée dans la cellule hôte requiert une liaison avec un récepteur à la surface de celle-ci afin de déclencher l'internalisation de la particule. L'attachement cellulaire du virus a lieu grâce à la reconnaissance de récepteurs membranaires par la glycoprotéine d'enveloppe du virus. Un certain nombre de molécules de surface ont été identifiées comme récepteurs du WNV : les héparane sulfate (HS), le Toll-like receptor TLR3, DC-SIGN (récepteur à lectine de type C), les TIM et TAM ou encore les intégrines de type $\alpha v\beta 3$ (Chen et al., 1997; Chu, 2004; Davis et al., 2006; Fernandez-Garcia et al., 2009; Navarro-Sanchez et al., 2003; Schmidt et al., 2013; Wang et al., 2004). Cependant, des mécanismes moins spécifiques sont utilisés par le WNV et les *Flavivirus* pour entrer dans les cellules cibles.

En effet, des phosphatidylsérine (PS) ainsi que des phosphatidyléthanolamine (PE) incorporées dans l'enveloppe virale, au moment du bourgeonnement à partir de la membrane du RE, peuvent interagir avec des récepteurs aux PS. Parmi eux, les récepteurs de la famille TIM (« T-cell Ig mucin domain »), en particulier les récepteurs humains TIM1 et TIM4, ont été identifiés comme d'important contributeurs de l'entrée du WNV et d'autres virus enveloppés (Jemielity et al., 2013; Meertens et al., 2012; Richard et al., 2015). Après sa liaison à la surface cellulaire, le WNV entre par un mécanisme d'endocytose médié par la clathrine (**Figure 15**) (Chu and Ng, 2004). Le WNV se retrouve ainsi dans l'endosome, dont le contenu va subir un processus d'acidification dépendant de l'ATP et d'ATPases membranaires. L'abaissement du pH de l'endosome induit le processus de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale, grâce au peptide de fusion porté par E (**Figure 16**). En effet, l'exposition à un pH acide engendre un changement majeur de conformation de la protéine E, notamment sa trimérisation associée un réarrangement de sa surface, exposant ainsi le peptide de fusion à la membrane cible (Pierson and Kielian, 2013). Ce peptide se replie en épingle à cheveux, ce qui permet le rapprochement des deux membranes (virales et endosomale), et entraîne la formation d'un pore permettant la sortie de la nucléocapside virale dans le cytoplasme (**Figure 16**).

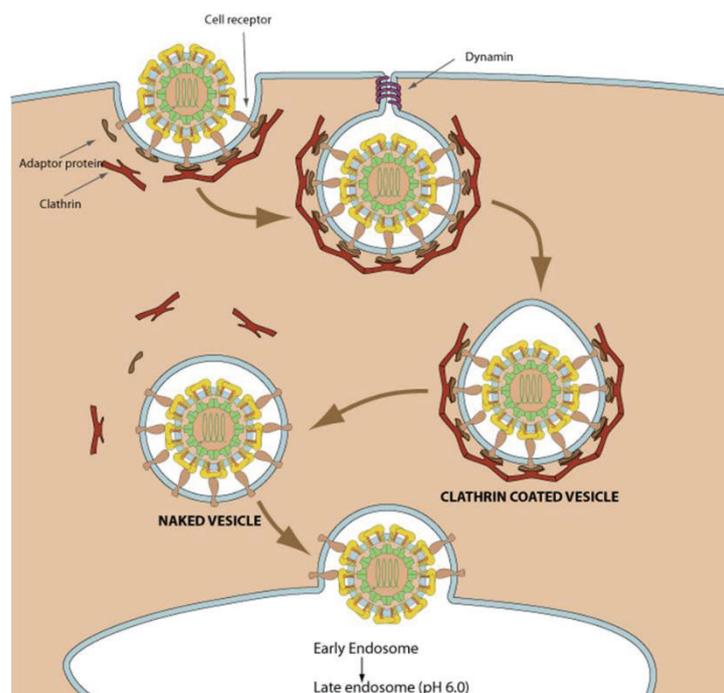


Figure 15 : Entrée du WNV par endocytose médiée par la clathrine. D'après [ViralZone](#), [ExpASy](#).

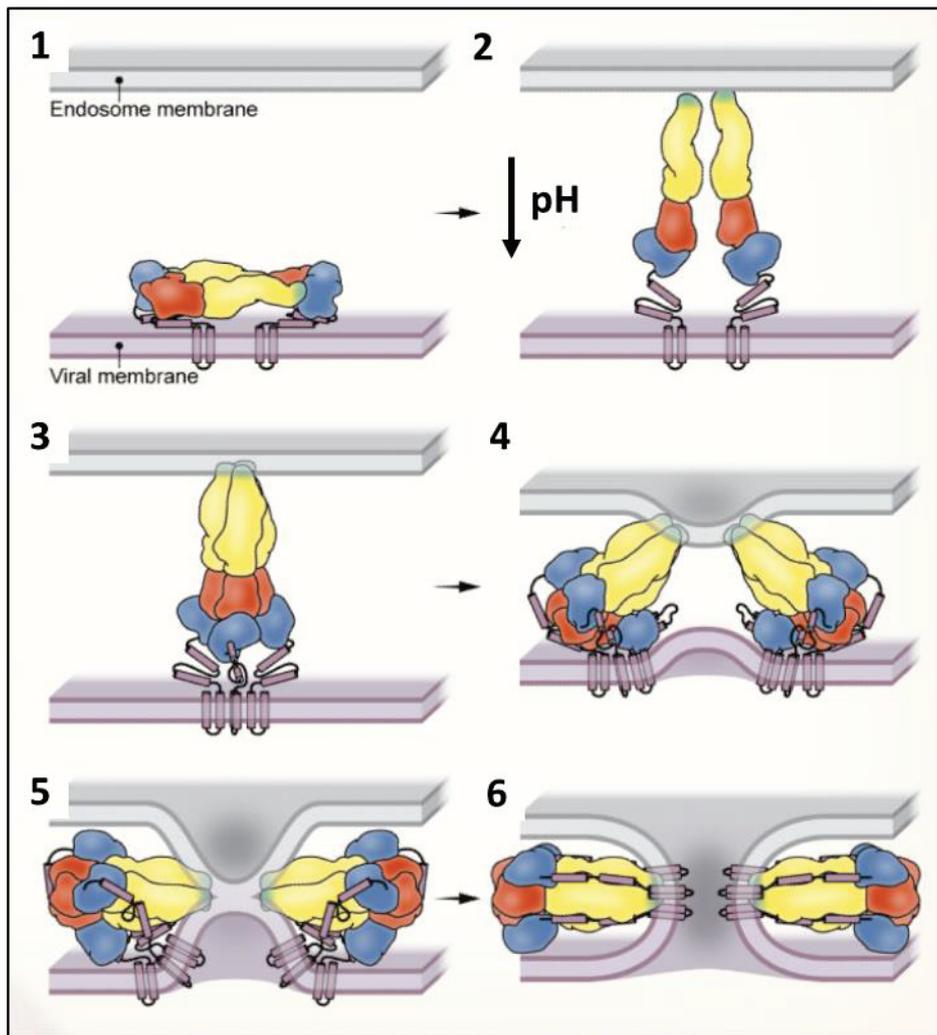


Figure 16 : Mécanisme de fusion pH-dépendante de la membrane virale avec la membrane de l'endosome médié par la protéine E d'enveloppe. Domaine DI = rouge, domaine DII = jaune, domaine DIII = bleu, peptide de fusion = vert. D'après (Pierson and Kielian, 2013).

1.4.2 Etapes cytoplasmiques

Une fois la capsid libérée dans le cytoplasme, celle-ci est dégradée, libérant le génome du virus. L'ARN viral étant de polarité positive (+), il est directement pris en charge par la machinerie cellulaire de traduction afin de synthétiser la polyprotéine, précurseur des différentes protéines virales. De façon co-translationnelle, la polyprotéine donnera les protéines virales matures après clivages par les protéases virale et cellulaires (**Figure 10 B-C**). Ainsi, en parallèle de la traduction, les protéines virales peuvent jouer leurs rôles dans la

transcription/réplication du génome viral. Ces deux étapes du cycle viral sont également couplées à l'assemblage des particules virales (Apte-Sengupta et al., 2014; Khromykh et al., 2001b).

1.4.2.1 Réplication : Transcription/traduction

La réplication asymétrique du génome viral débute par la synthèse d'un brin ARN négatif (-), dit antigénome, qui sert de matrice à la synthèse du nouveau brin d'ARN génomique (+). Elle se déroule au sein d'un complexe de réplication (RC) constitué des protéines virales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 en interactions avec des partenaires protéiques de la cellule hôte (Chu and Westaway, 1992; Grun and Brinton, 1988; Mackenzie et al., 1998; Youn et al., 2013). La formation de ce complexe est induite par un remodelage des membranes du RE médié par les protéines non-structurales, telles que les protéines NS4A et NS4B (Apte-Sengupta et al., 2014; Gillespie et al., 2010; Stern et al., 2013; Welsch et al., 2009; Westaway et al., 1997; Yu et al., 2013). Ceci entraîne la formation d'invaginations, de type vésiculaire (VP), dans lesquelles la machinerie de réplication virale est protégée (Figure 17).

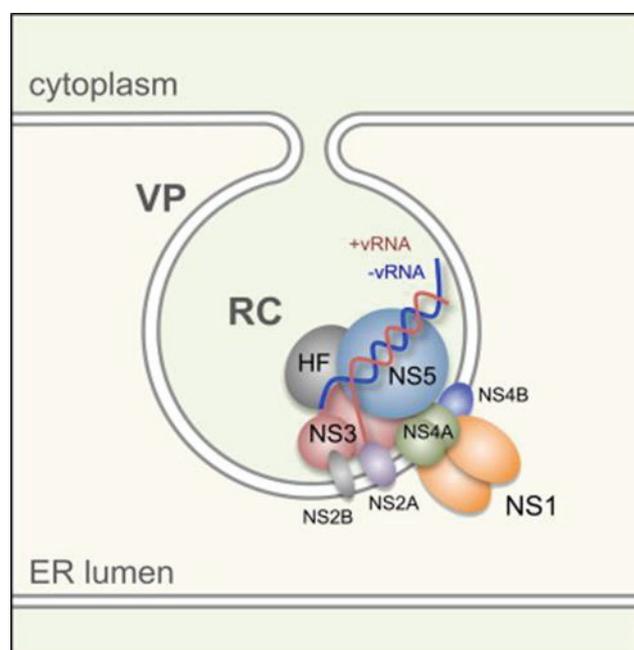


Figure 17 : Représentation schématique du complexe de réplication des *Flavivirus*. HF = Facteur cellulaire. (Muller and Young, 2013).

1.4.2.2 Assemblage des particules virales et sortie des virions

L'assemblage des particules virales se fait par association de l'ARN viral (+) avec les protéines de capsid (Khromykh and Westaway, 1996; Pong et al., 2011). L'acquisition de l'enveloppe se fait par bourgeonnement au niveau du RE, avec l'implication de facteurs de la voie ESCRT dans la formation des particules (Mackenzie and Westaway, 2001; Tabata et al., 2016; Welsch et al., 2009). Les protéines prM et E sont glycosylées, et doivent donc transiter dans le RE et le Golgi (Scherret et al., 2001b). En cours de synthèse, des séquences signal situées au niveau de la région codant les protéines structurales, adressent les régions prM, E et NS1 de la polyprotéine dans le RE grâce à des domaines transmembranaires. Les séquences signal sont ensuite clivées par des signalases cellulaires (Apte-Sengupta et al., 2014). Les protéines prM et E restent alors encrées dans la membrane du RE, ce qui permettra par la suite la formation de l'enveloppe virale lors du bourgeonnement du virus dans le compartiment vésiculaire et sa sortie de la cellule (Hanna et al., 2005).

Concernant la protéine NS1, une partie est libérée dans la lumière du RE, où elle peut jouer son rôle au niveau du complexe de réplication, tandis qu'une autre proportion sera sécrétée en dehors de la cellule infectée (Muller and Young, 2013).

Une fois le bourgeonnement effectué, les particules virales immatures sont formées. La protéine prM a pour rôle le maintien d'une conformation de la protéine E qui évite l'exposition du peptide fusion. Ces particules immatures ont un aspect hérissé qui correspond à l'insertion d'hétérodimères prM-E dans l'enveloppe virale (Pierson and Diamond, 2012). Des analyses en immunofluorescence ont montré que les particules immatures subissent une étape de maturation dans le trans-Golgi, consistant au clivage de prM en protéine de matrice M, ce qui confère à la surface des virions un aspect lisse (Mackenzie and Westaway, 2001). Une fois ce processus terminé, les particules devenues des virions matures infectieux, sortent de la cellule par un mécanisme encore non totalement élucidé à ce jour (**Figure 18**).

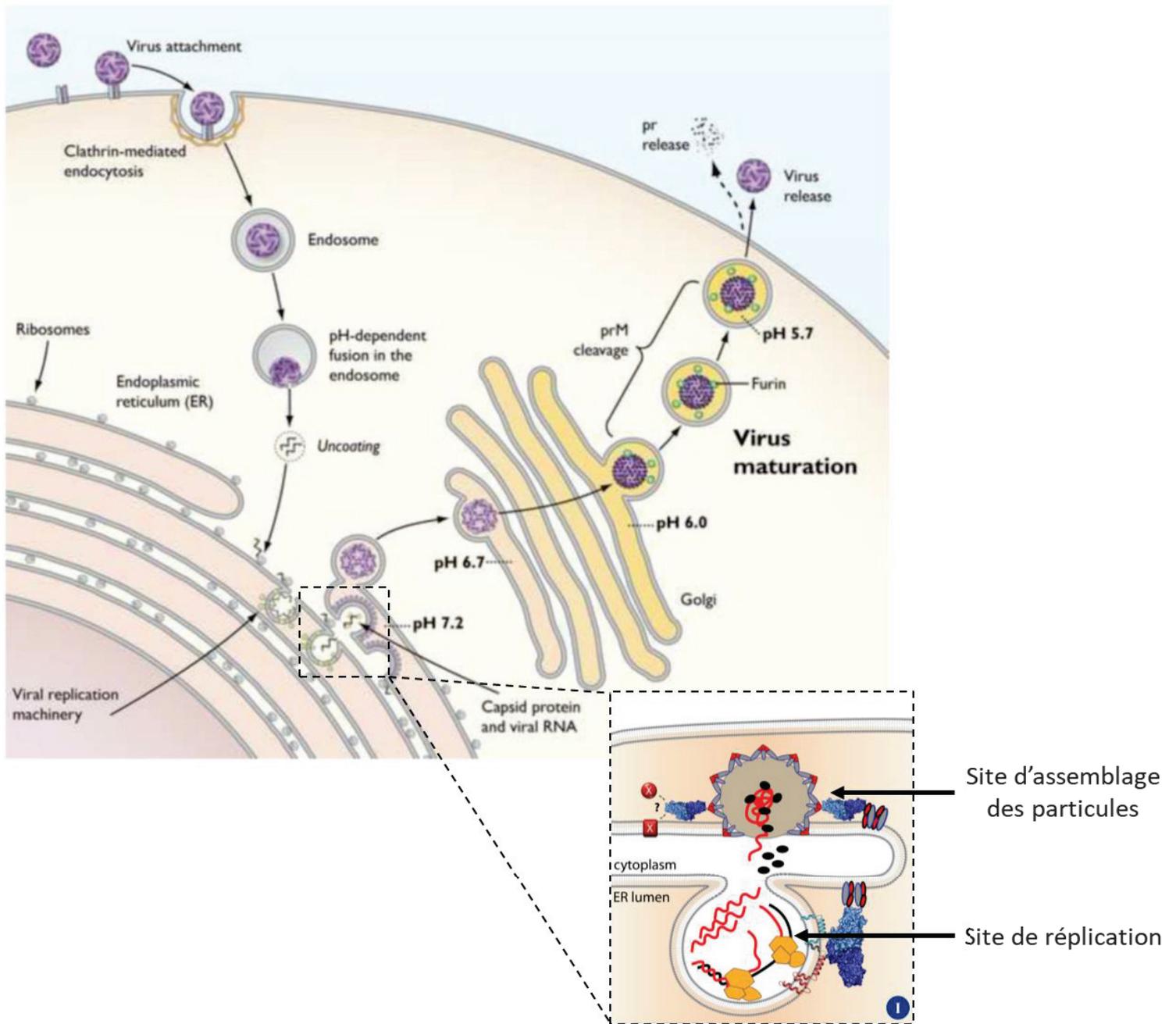


Figure 18 : Représentation schématique récapitulative du cycle de multiplication virale du WNV. Adaptée de (Pierson and Diamond, 2012; Scaturro et al., 2015).

I.5 Pathogenèse et tropisme

I.5.1 Infection, amplification virale et dissémination

La grande majorité des infections par le WNV se contracte suivant la piqûre d'un moustique infecté. Néanmoins, d'autres voies de transmission sont décrites comme, par transfusion sanguine, par transplantation d'organe infecté et par transmission de la mère à l'enfant au cours de la grossesse (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009; O'Leary et al., 2006; Pealer et al., 2003). Même si ces voies de transmission du WNV ne représentent que quelques cas, elles ne sont pas à négliger. En effet, en tenant compte de la grande proportion de cas asymptomatiques, le WNV peut être présent dans du sang et/ou des organes, destinés à la transfusion ou à la transplantation, avec une probabilité importante. Les tests de détection du WNV dans ces échantillons ne peuvent être constamment effectués en routine dans les services hospitaliers, ce qui engendre un risque de transmission (Nett et al., 2012). De même, des infections à la suite d'accidents en laboratoires ont été décrites (Venter et al., 2009).

Le WNV étant principalement transmis par les moustiques, lors de la piqûre, le virus est inoculé par la salive de l'insecte par voie sous-cutanée. Le virus infecte alors les cellules localisées au site d'injection et se réplique tout d'abord localement. Les kératinocytes ainsi que les cellules dendritiques résidentes du derme (cellules de Langerhans) sont proposés comme siège initial de l'amplification locale (**Figure 19**) (Lim et al., 2011). Après infection, ces cellules dendritiques s'activent et sont alors capables de migrer vers les nœuds lymphatiques (Johnston et al., 2000). Dans ces structures, le WNV infecte alors des neutrophiles et des macrophages, circulant eux aussi, favorisant l'apparition d'une virémie et la dissémination du virus à des organes viscéraux (rates) et autres tissus périphériques (**Figure 19**) (Suthar et al., 2013a). L'infection de ces différents types cellulaires induit l'expression de molécules pro-inflammatoires, à l'origine de l'inflammation, qui permettent le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires (**Figure 19**). Ces étapes caractérisent les formes modérées de la maladie causée par le WNV, telles que les infections asymptomatiques (environ 80% des cas) et la fièvre West Nile (environ 20% des cas).

Une phase plus tardive, implique une atteinte neurologique suite à l'infection de tissus du système nerveux central (SNC) tels que le cerveau et la moëlle épinière (**Figure 19**). En effet, le WNV est à la fois un virus neurotrophe et neuroinvasif.

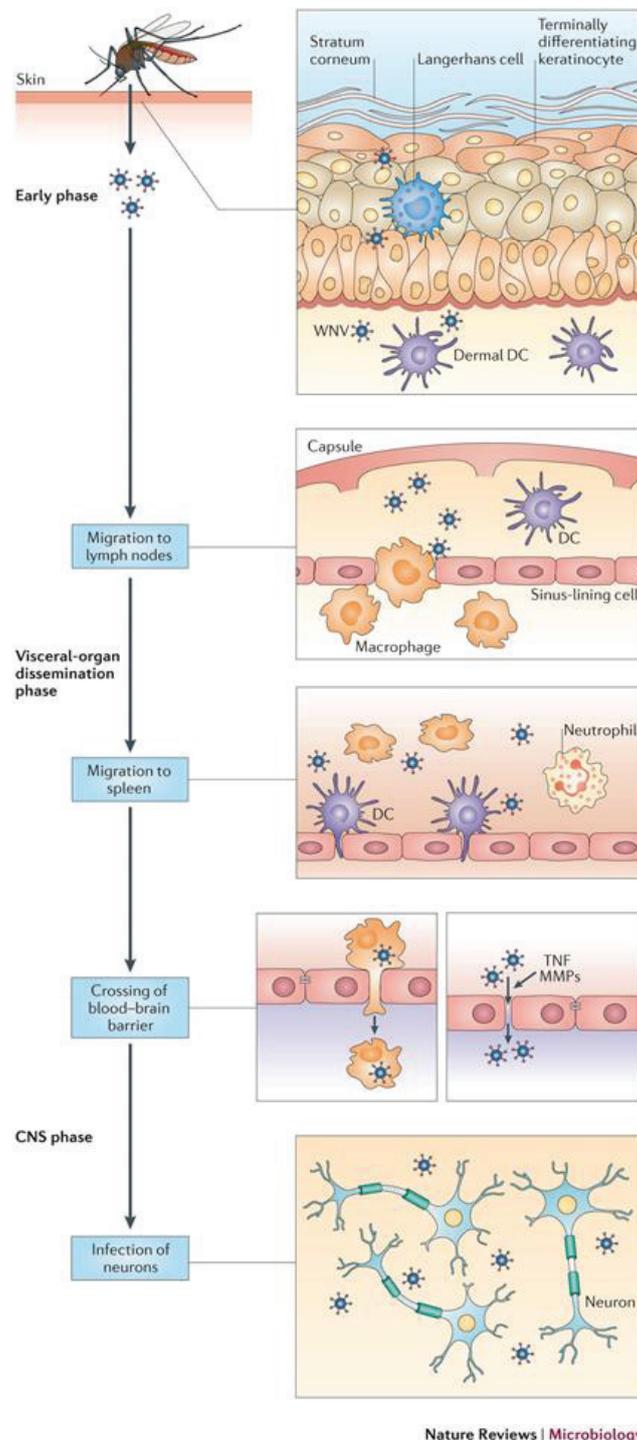


Figure 19 : Représentation schématique des étapes d'infection, d'amplification et de dissémination du WNV dans l'hôte infecté. (Suthar et al., 2013a).

I.5.2 Infection du SNC

I.5.2.1 Les différentes voies d'entrée dans le SNC

Le contrôle de la charge virale dans le sang est primordial pour prévenir la dissémination dans le SNC (Klein and Diamond, 2008). De plus, la neuropathogénèse du WNV dépend de la capacité du virus à entrer dans le SNC et à se propager efficacement dans les cellules cibles (neurones, cellules gliales, cellules myéloïdes) (Diamond et al., 2003; Samuel and Diamond, 2006; Shrestha et al., 2003; Suthar et al., 2013a). En effet, les propriétés neuroinvasives sont en partie dictées par les protéines structurales du WNV, en particulier les N-glycosylations portées par la protéine E d'enveloppe (Beasley et al., 2002, 2005; Shirato et al., 2004; Zhang et al., 2006). Cependant, les mécanismes de neuroinvasion liés aux protéines de surface sont mal connus. Plusieurs hypothèses concernant les voies d'entrée du WNV dans le SNC sont avancées (Fredericksen, 2014; Petersen et al., 2013; Winkelmann et al., 2016).

La première, suggère une amélioration de l'attachement et de l'internalisation du virus dans certaines cellules cibles (cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, BHE), augmentant ainsi l'efficacité d'infection et l'entrée du WNV dans le SNC (**Tableau 4, Figure 21**) (Verma et al., 2009). Une autre possibilité est que le WNV gagne le SNC suite à la rupture de l'intégrité de la BHE. En effet, la BHE permet le maintien de l'homéostasie dans le cerveau, en le séparant du sang circulant (**Figure 20**). Elle protège ainsi le cerveau d'une mise en contact avec des éléments étrangers, contenus dans le sang circulant, potentiellement néfastes tels que des toxines et/ou des agents pathogènes (Abbott et al., 2010). La perturbation de l'intégrité de la BHE serait provoquée par une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales qui la composent (**Tableau 4**) (Winkelmann et al., 2016). Ce phénotype est régulé par la sécrétion de cytokines vasoactives par les cellules endothéliales et l'activation de métalloprotéases matricielles (telles que MMP-9) qui sont à l'origine de la dégradation de protéines impliquées dans les jonctions serrées (ex : Claudin-1, ZO-1) et la dérégulation de l'expression de molécules d'adhésion (ex : ICAM-1, sélectine-E) (**Tableau 4**) (Daniels et al., 2014; Spindler and Hsu, 2012; Verma et al., 2010; Wang et al., 2008, 2004). Le WNV est capable d'induire l'expression de ces molécules d'adhésion cellulaire à la surface des cellules endothéliales de la BHE augmentant ainsi la

fixation des leucocytes sur celles-ci. Ceci peut contribuer à l'infiltration des leucocytes et à la perturbation de la perméabilité de la BHE (**Tableau 4**) (Roe et al., 2014).

D'autres mécanismes d'entrée du WNV dans le SNC sont proposés. Ceux-ci incluent l'infection de neurones olfactifs avec une dissémination à partir du bulbe olfactif et/ou un transport axonal rétrograde direct depuis les neurones périphériques infectés (Samuel et al., 2007a; Wang et al., 2009).

Enfin, la voie circulatoire est envisagée, grâce à un mécanisme dit « cheval de Troie » par lequel le virus est transporté au SNC par les cellules immunitaires infectées (monocytes et/ou macrophages) circulantes qui sont recrutées dans cette région de l'organisme lors d'une infection et qui sont capables de franchir naturellement la BHE (**Figure 21**) (Getts et al., 2008; Verma et al., 2009). De plus, en réponse à l'infection et aux cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules locales infectées, les leucocytes recrutés sécrètent à leur tour des cytokines (TNF- α , IL-6, MIF) via la voie TLR3 et activent les MMPs (Wang et al., 2008, 2004). Cela altère ainsi la fonction de la BHE, qui se traduit par une augmentation de sa perméabilité et ainsi de l'entrée de particules virales (**Figure 21**).

Une fois dans le SNC, d'autres déterminants viraux et de réponse de l'hôte sont à l'origine de la formation de lésions dans les tissus nerveux et donc des formes sévères de la maladie à WNV (encéphalites, méningites, paralysie flasque aiguë) (Winkelmann et al., 2016).

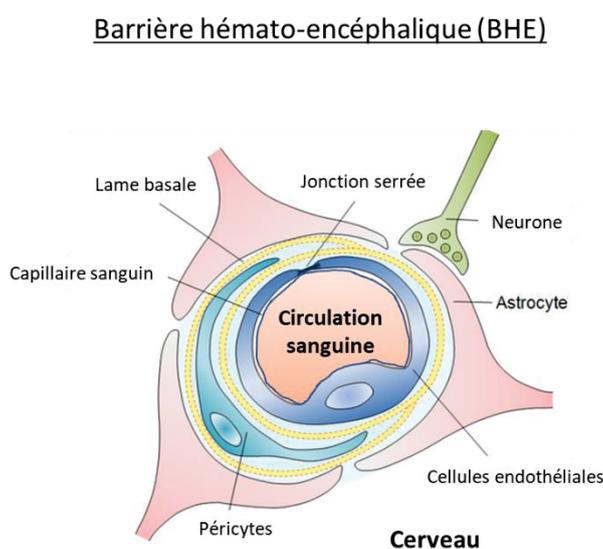


Figure 20 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.

Facteurs de l'hôte	Effets sur intégrité de la BHE
Cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIF)	Déstabilisation BHE
Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)	Augmentation perméabilité BHE
Semaphorine 7A	Augmentation perméabilité BHE en favorisant la production de TNF- α
IFNs de type I (IFN- α et IFN- β)	Favorise intégrité BHE via activation des interactions de Rac1 et RhoA entraînant l'inhibition indirecte des effets de TNF- α et IL-1 β
IFN- λ	Modulation de la localisation des protéines de jonctions serrées des cellules endothéliales => augmentation intégrité et diminution du passage de virus à travers la BHE
Récepteurs de type TAM (Tyro3, Axl et Merck)	Augmentation intégrité BHE
Molécules d'adhésion cellulaire, CAMs (ICAM-1, VCAM-1 et Sélectine-E)	Augmentation de l'expression des CAMs qui induit l'adhésion et la migration transendothéliale des leucocytes

Tableau 4 : Facteurs de l'hôte qui modulent l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.
Adapté de (Winkelmann et al., 2016).

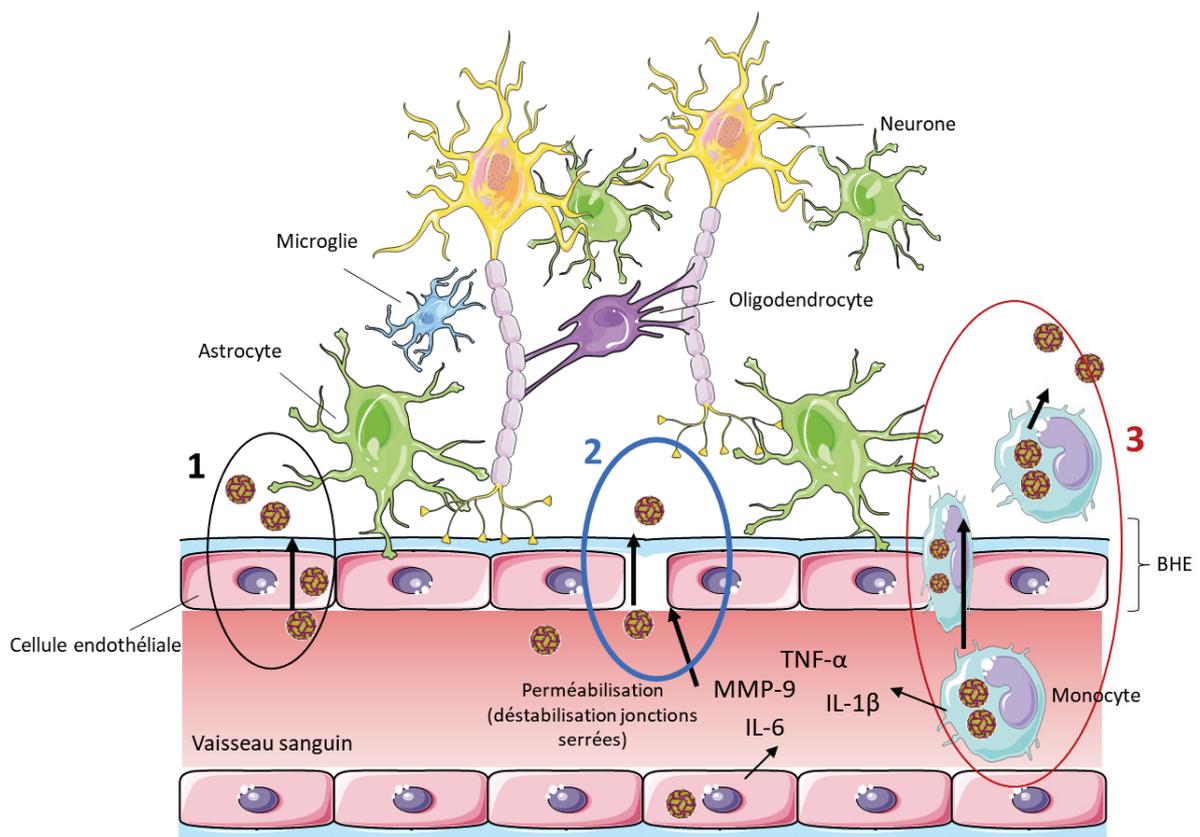


Figure 21 : Représentation schématique des différentes voies d'entrée du WNV dans le SNC. 1, Attachement/infection des cellules endothéliales de la BHE puis entrée dans le SNC. 2, Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules locales infectées (cellules endothéliales, monocytes, ...) déstabilisent l'intégrité de la BHE. Ceci permet au virus de rentrer plus facilement dans le SNC. 3, entrée du WNV dans le SNC par le mécanisme de « cheval de Troie » via l'infection de monocytes ou macrophages qui sont capables de traverser la BHE. Synthèse personnelle.

I.5.2.2 Physiopathologie de l'infection du SNC

Dans le SNC, le WNV cible les neurones du cortex, du tronc cérébral, du cervelet et de la moelle épinière, conduisant à leur altération voire leur mort (Samuel and Diamond, 2006; Samuel et al., 2007b; Shrestha et al., 2003). L'infection de ces cellules est en partie à l'origine de lésions associées aux formes sévères de la maladie (encéphalite et méningite) (Figure 22) (Donadieu et al., 2013a; Shrestha et al., 2003). L'infection et la destruction des neurones moteurs dans la corne antérieure de la moelle épinière coïncide avec des paralysies flasques.

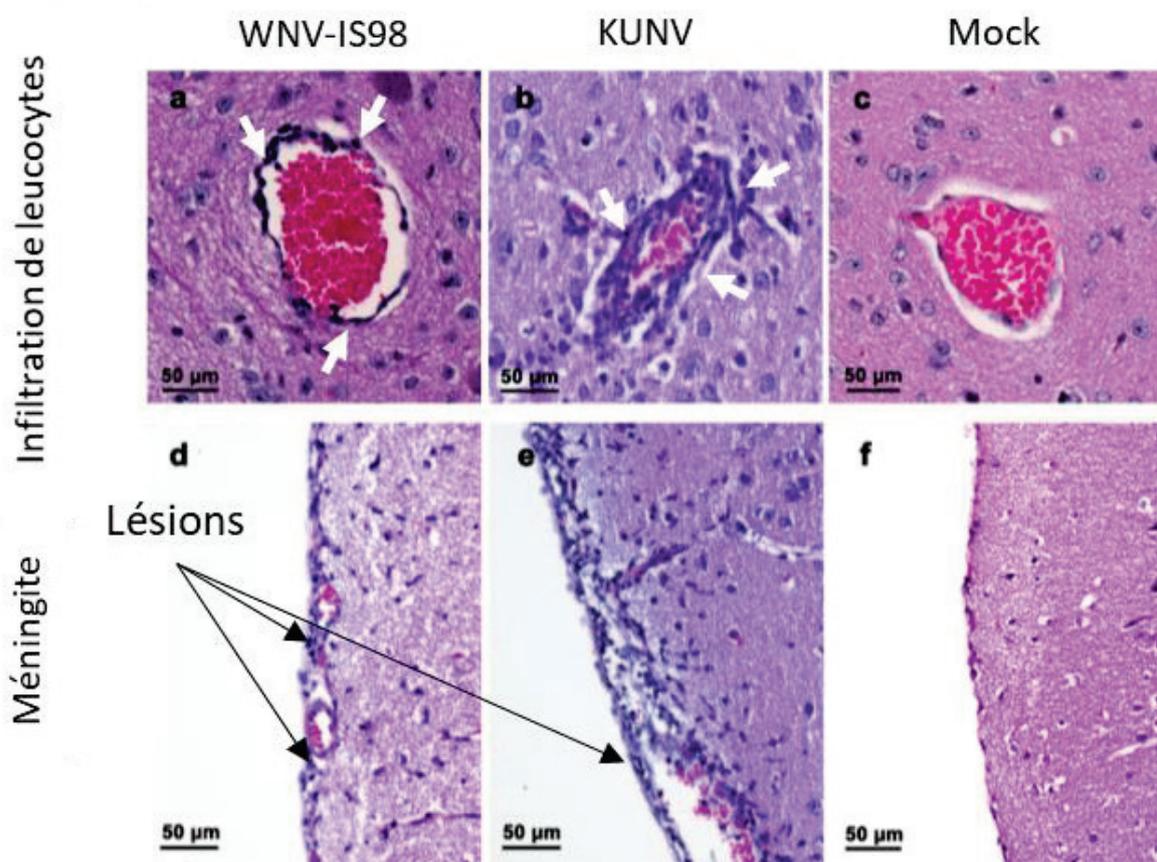


Figure 22 : Coupes histologiques de cerveau de souris infectées par WNV (lignage 1a) ou KUNV (lignage 1b). a-c, Infiltrations périvasculaires de leucocytes (flèches blanches). d-f, Lésions méningitiques. D'après (Donadieu et al., 2013a).

a. Rôle neuro-toxique de la réaction immunitaire

L'équilibre entre l'élimination du virus et l'immunopathologie dans le SNC est probablement modulé par la réponse immunitaire antivirale qui nécessite une mobilisation efficace des cellules immunitaires (Winkelmann et al., 2016). Lors d'une infection du SNC par WNV, on observe une importante infiltration de leucocytes dans le cerveau (Figure 22) (Donadieu et al., 2013a; Shrestha et al., 2003). Ces leucocytes mais aussi les cellules gliales (astrocytes, microglie) impliqués produisent des molécules pro-inflammatoires qui induisent une pathologie suite à la présence de protéases, de cytokines neurotoxiques et de dérivés réactifs de l'oxygène sécrétées par les cellules gliales (Figure 23) (Das et al., 2008, 2015; Ghoshal et al., 2007). Cependant, l'altération des neurones peut aussi être dû à l'effet cytopathique du virus (Ceccaldi et al., 2004; Shrestha et al., 2003).

L'autopsie de cerveaux humains infectés par la souche NY99 du WNV et présentant des encéphalites, a révélé qu'à la fois les neurones et les cellules gliales étaient infectés. Une augmentation de l'expression de gènes de la réponse proinflammatoire (réactivité des astrocytes), simultanément avec une diminution de l'expression de la protéine protectrice OASIS, spécifique des astrocytes, a été observée chez les individus atteints d'encéphalite par rapport aux témoins non encéphalitiques (Figure 24). Les cellules astrocytaires sécrètent alors des facteurs cytotoxiques, qui sont la cause d'apoptose neuronale (Figure 23) (van Marle et al., 2007). De même l'expression de la protéine de capsid du WNV, dans les neurones et la microglie 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 et al., 2007).

A la fois une mort cellulaire nécrotique et apoptotique sont décrits dans la littérature lors d'une encéphalite à WNV (Solomon and Vaughn, 2002). Ce mécanisme de mort cellulaire titre-dépendant joue un rôle important dans la pathologie du WNV (Chu and Ng, 2003). Ainsi, les charges virales dans le SNC et systémique peuvent en partie déterminer les conséquences pathologiques et expliquer la variété des tableaux cliniques observés (van Marle et al., 2007).

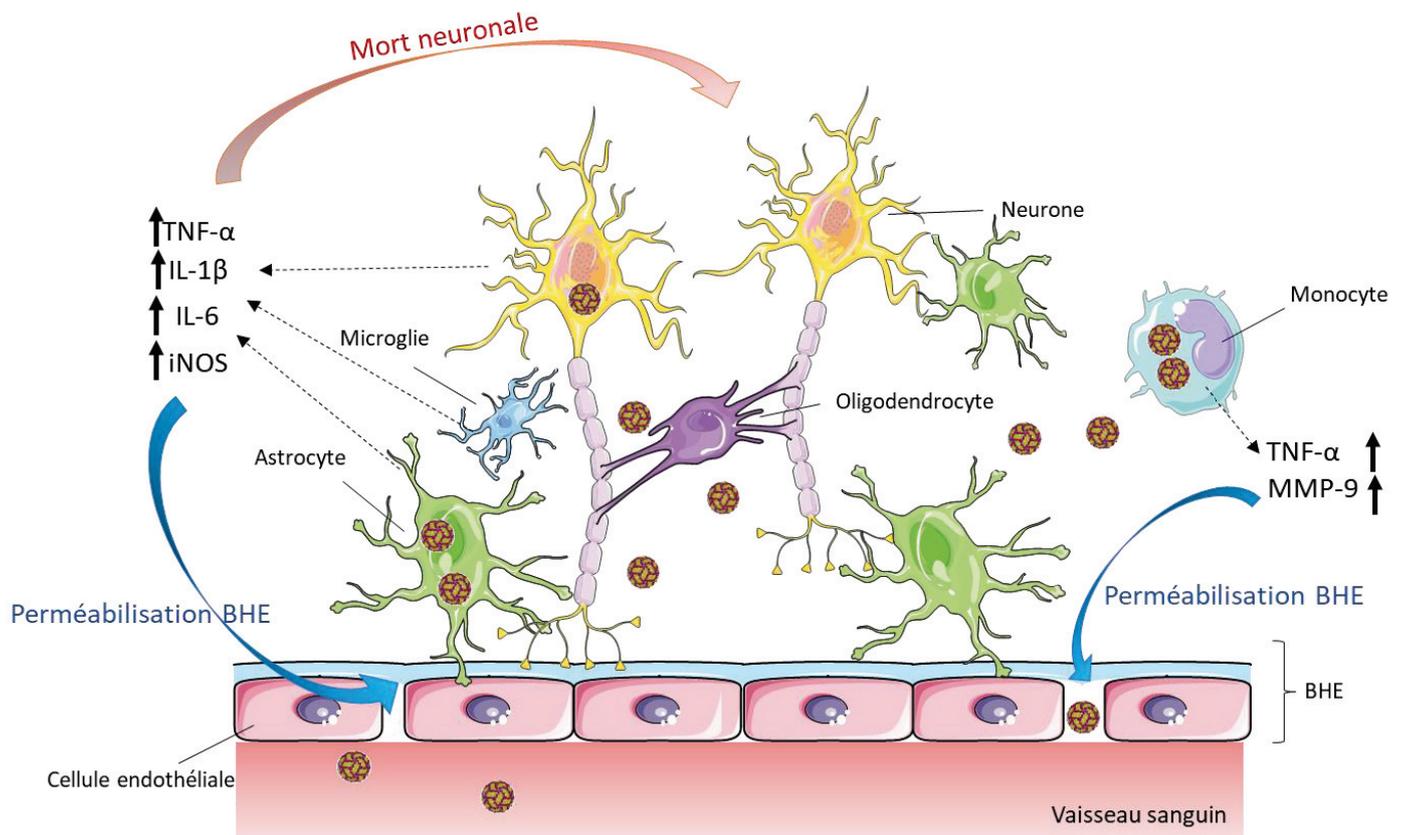


Figure 23 : Représentation schématique simplifiée de la neuropathogénèse induite par l'infection du SNC avec WNV. Synthèse personnelle adaptée de (Donadieu et al., 2013b).

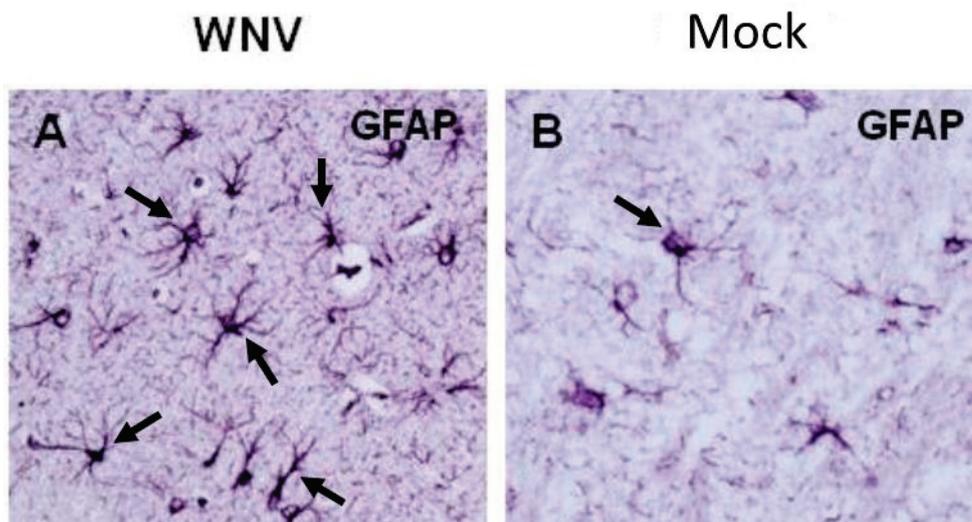


Figure 24 : Réactivité des astrocytes dans le SNC lors de l'infection par WNV (inflammation). On observe un niveau important de réactivité astrocytaire dans le cerveau de souris infectées avec WNV par rapport au contrôle non infecté (marquage GFAP). Les astrocytes présentent un changement de morphologie caractérisé par une hypertrophie des corps cellulaires. D'après (Donadieu et al., 2013b).

b. Rôle direct du virus

L'infection de cellules neuronales par le WNV déclenche la mort cellulaire par apoptose (**Figure 25**) (Shrestha et al., 2003). Notamment, la protéine de capsid C du virus est impliquée dans la condensation nucléaire rapide et l'induction de la mort cellulaire sur des cultures de cellules HeLa, 293-T, RD ou SH-SY5Y (Yang and al, 2002). Ce mécanisme apoptotique est induit par la voie mitochondriale suite à l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3 (Donadieu et al., 2013a; Samuel et al., 2007b).

Les protéines non-structurales du WNV sont également impliquées dans la neuro-pathogénèse. Ces protéines virales induisent une réponse pro-apoptotique via la phosphorylation transitoire d'eIF2 (kinase-dependant eukaryotic initiation factor 2) (Medigeschi et al., 2007). Les cellules infectées par le WNV présentent les caractéristiques de cellules en apoptose (i) arrêt de la multiplication cellulaire et induction de l'expression de gènes induisant des dommages à l'ADN (ii) activation de la caspase-3 (forme clivée) (**Figure 25**).

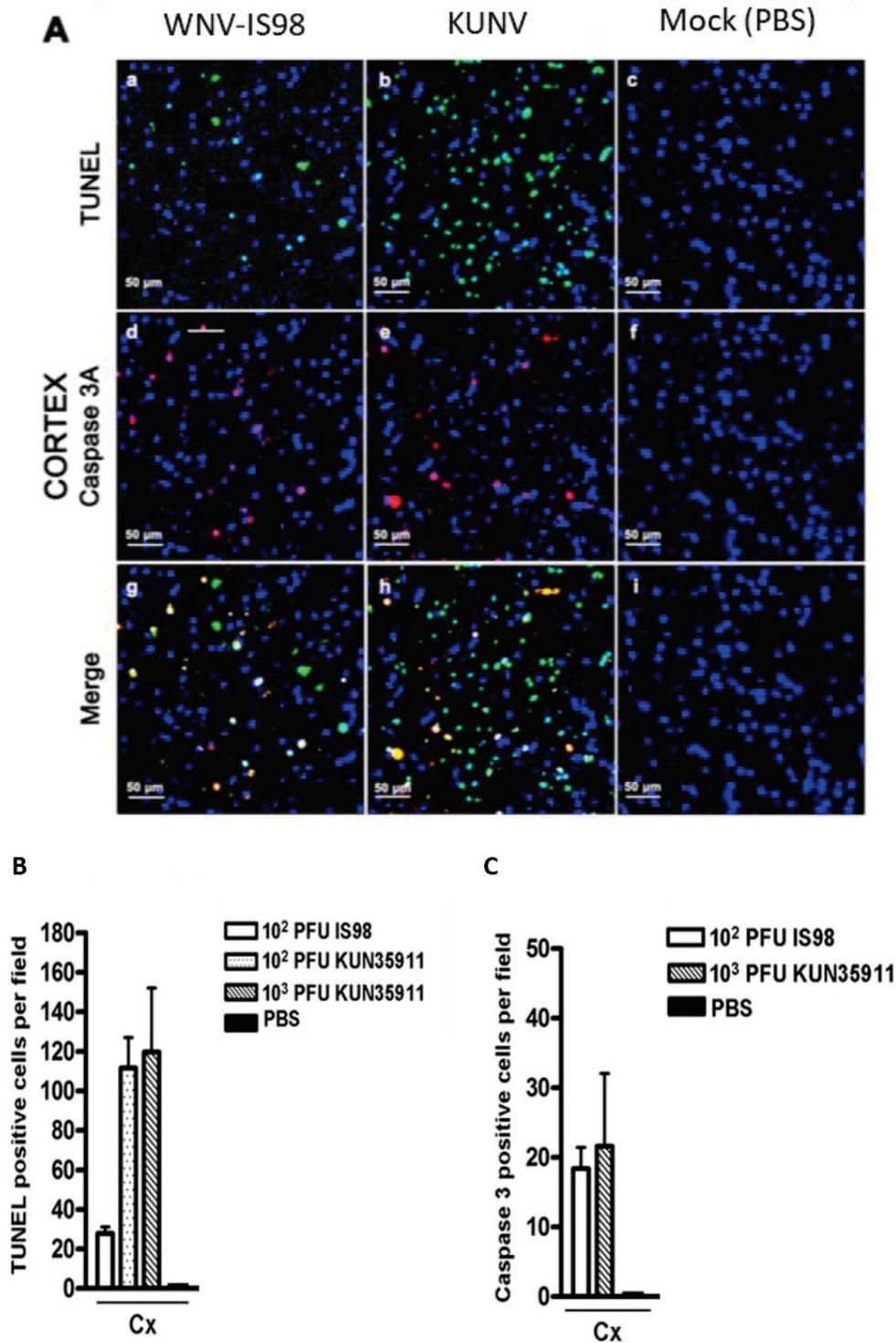


Figure 25 : Induction de l'apoptose dans le cortex cérébral de souris lors de l'infection par WNV. A (a-c), Marquage des cellules apoptotiques (TUNEL, vert). (d-f), Marquage de la caspase-3 active (clivée, rouge). (g-i), superpositions. B, Nombre total de cellules positive au TUNEL par champs. C, Nombre total de cellules positive pour la caspase3 clivée par champs. D'après (Donadieu et al., 2013a).

1.5.3 La réponse antivirale

1.5.3.1 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, grâce à l'inflammation, la réponse immunitaire adaptative.

a. Interaction du WNV avec le système TLR

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 (Takeda and Akira, 2005). Le système TLR est impliqué dans la reconnaissance de motifs spécifiques du pathogène (PAMP) visant à déclencher une réponse antivirale par la cellule.

Chaque TLR possède un domaine reconnaissant les PAMPs, 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 (Interferon Regulatory Factor 3), et la production de molécules proinflammatoires dont les IFNs de type I (Kawai and Akira, 2007; Kawasaki and Kawai, 2014) (**Figure 26**). L'interferon de type I comprend 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).

Parmi les TLRs reconnaissant des motifs viraux, TLR3 est celui qui reconnaît les ARNdb, molécules présentes lors de la phase répliquative du WNV (**Figure 26**) (Alexopoulou et al., 2001; Gilfoy and Mason, 2007). Une étude a 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 WNV. L'hypothèse soutenue 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 de la concentration en TNF- α rend les souris plus résistantes à la neuro-invasion par le WNV (Wang et al., 2004). Néanmoins, la

quantité de TNF- α détectée dans le sérum de souris infectées est trop faible pour être corrélée avec une augmentation de la perméabilité de la BHE et de l'entrée du WNV dans le SNC (Fredericksen, 2014; Shrestha et al., 2008).

Le TLR7 reconnaît les ARN simples brins (Kawai and Akira, 2007). TLR7 et la voie IL-23 dépendante modulent la migration des cellules immunitaires, dont les cellules de Langerhans (cellules dendritiques), vers les cellules infectées (Town et al., 2009; Welte et al., 2009).

Des facteurs cellulaires interagissent avec la voie TLR3 et peuvent moduler la réponse induite lors de l'infection par WNV. DC-SIGN et DC-SIGNR sont les récepteurs à lectines de type C 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 E glycosylée du WNV par DC-SIGN entraîne une réduction de l'expression de TLR3 chez les macrophages via la voie STAT-1 (Kong et al., 2008). Ce mécanisme est déficient chez les personnes âgées, induisant un niveau d'expression élevé de TLR3, chez les macrophages, associée à un niveau élevé de cytokines qui pourraient contribuer à une augmentation de la perméabilité de la BHE.

b. Interaction du WNV avec le système RLR

Les récepteurs de type « RIG-I Like Receptors » (RLRs) sont une autre importante famille de récepteurs reconnaissant des PAMPs viraux (Loo and Gale, 2011). La famille est représentée par les protéines RIG-I, MDA5 et LGP2, exprimés au niveau intracellulaire. Ce sont des hélicases capables de reconnaître des ARN viraux simple ou double brin synthétisés au cours de la réplication du virus dans la cellule hôte (Figure 27). Les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent un domaine hélicase qui reconnaît les ARN viraux ainsi que deux domaines permettent l'activation de caspases et le recrutement du facteur protéique MAVS (mitochondria antiviral-signaling protein) (Figure 27) (Loo et al., 2008; Saito et al., 2008; Seth et al., 2005). Cette interaction des RLRs avec la protéine MAVS entraîne alors l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B conduisant à la mise en place d'une réponse antivirale (Figure 27) (Seth et al., 2005). Cette voie de signalisation joue un rôle important dans le contrôle de l'infection par WNV. En effet, *in vivo*, lorsque le gène codant MAVS est délété, la réponse inflammatoire est dérégulée. On observe alors un défaut de la réponse

des cellules immunitaires, ce qui augmente la sensibilité des individus vis-à-vis de l'infection par WNV (Suthar et al., 2010).

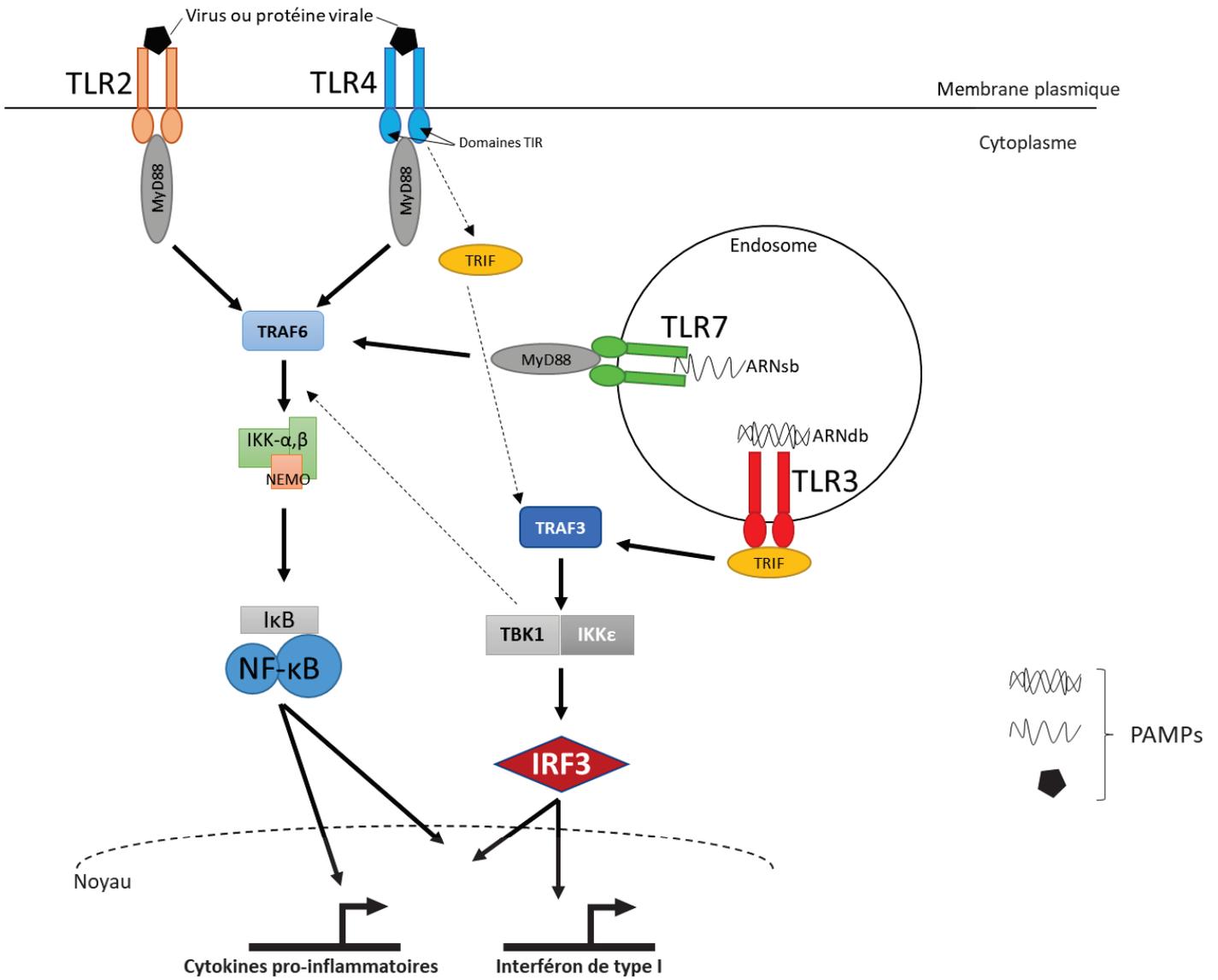


Figure 26 : Représentation schématique simplifiée de la réponse innée médiée par le système TLR. Synthèse personnelle.

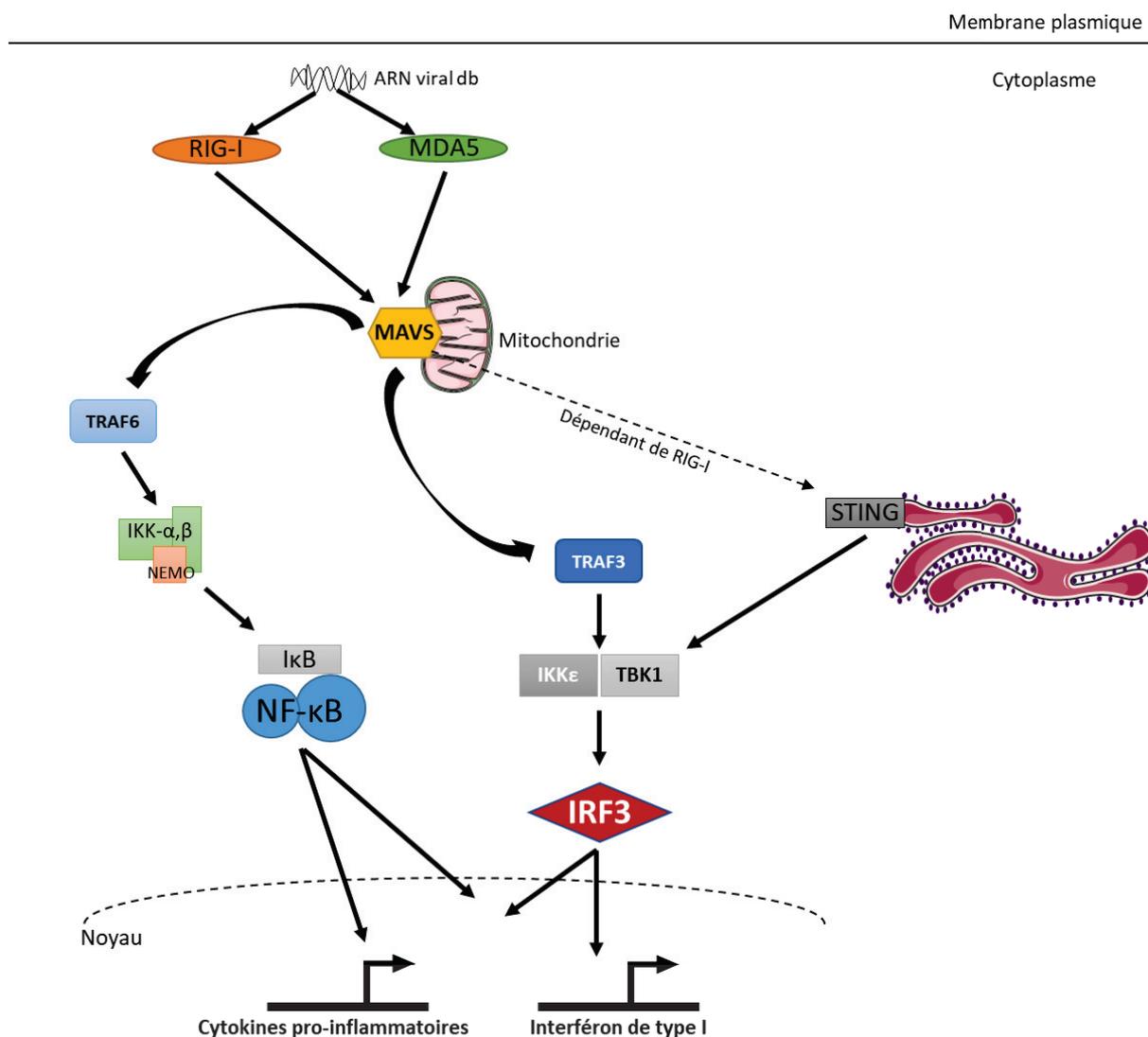


Figure 27 : Représentation schématique simplifiée de la réponse innée médiée par le système RLR lors d'une infection par WNV. Synthèse personnelle.

c. La réponse anti-WNV médiée par l'IFN de type I

Après sa mise en place, le maintien et l'amplification d'une réponse antivirale sont essentiellement médiés par l'IFN de type I en interaction avec la voie JAK-STAT (Diamond and Gale, 2012; Ivashkiv and Donlin, 2014). Les molécules d'IFNs sécrétées après l'activation des gènes correspondant se fixent sur les récepteurs de type IFNAR (IFNAR 1 et 2) situés à la surface cellulaire. Les récepteurs IFNAR 1 et IFNAR 2 sont associés avec les tyrosines kinases TYK2 et JAK1, respectivement. L'interaction de la molécule d'IFN de type I avec les récepteurs entraîne leur dimérisation à l'origine de l'activation de JAK1 par

phosphorylation (**Figure 28**) (Ivashkiv and Donlin, 2014). Les protéines STAT (facteurs de transcription) sont ensuite phosphorylées (activation) entraînant la formation de dimères. Ceux-ci recrutent alors la protéine IRF9 afin de former un complexe capable de migrer dans le noyau. Après migration, le complexe interagit avec l'ADN cellulaire et induit l'expression de gènes, les ISGs (interferon-stimulated genes) et les ISRE (interferon-stimulated response elements), impliqués dans la résistance à la réplication de virus, tels que le WNV (**Figure 28**) (Daffis et al., 2009a; Der et al., 1998; Diamond and Gale, 2012; Samuel, 2001). La plupart codent des récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) ou des facteurs de transcription régulant des cascades enzymatiques antivirales (Der et al., 1998).

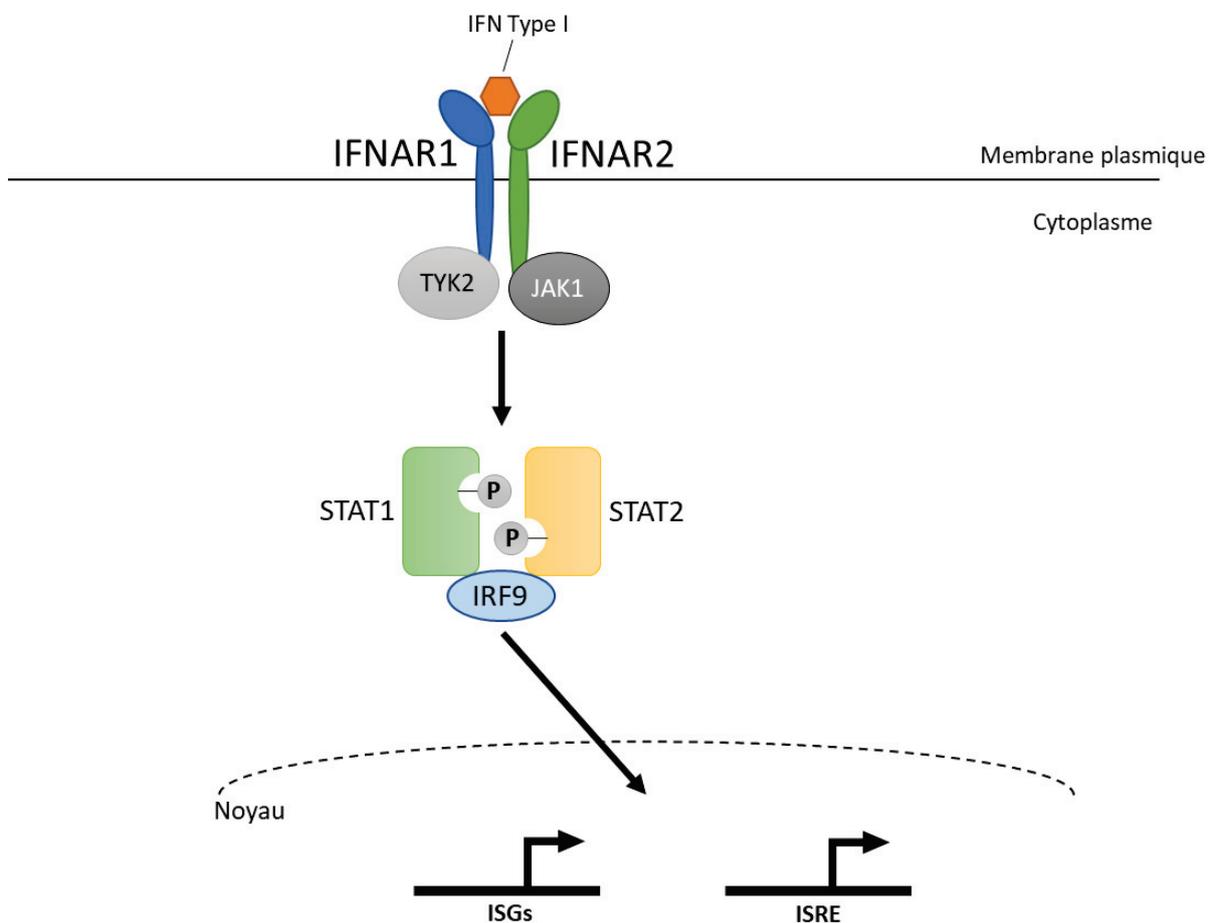


Figure 28 : Réponse antivirale dépendante de l'IFN de type I et de la voie JAK-STAT. Synthèse personnelle.

Parmi les protéines cellulaires dont la régulation dépend des IFN, la famille des 2'-5' oligoadénylate synthétases est fortement représentée (Rebouillat and Hovanessian, 1999; Samuel, 2001). Cette famille de gènes code plusieurs enzymes dont la 2'-5'-oligoadénylate synthétase 1b (OAS 1b) chez la souris ou OAS1 chez l'homme qui sont des candidats pour la résistance au WNV (Deo et al., 2014; Mashimo et al., 2008; Pereygin et al., 2002; Simon-Chazottes et al., 2011). OAS 1b a été identifiée comme une enzyme ayant une activité d'inhibition de l'expression protéique en réponse à la présence d'ARNdb d'origine virale. OAS 1b activée induit l'activation de la RNaseL conduisant à une dégradation de l'ARN viral ainsi qu'à l'apoptose de la cellule infectée (Figure 29). Le polymorphisme du gène *OAS1* détermine la capacité de l'hôte à résister aux manifestations cliniques associées à l'infection à WNV (Rios et al., 2010).

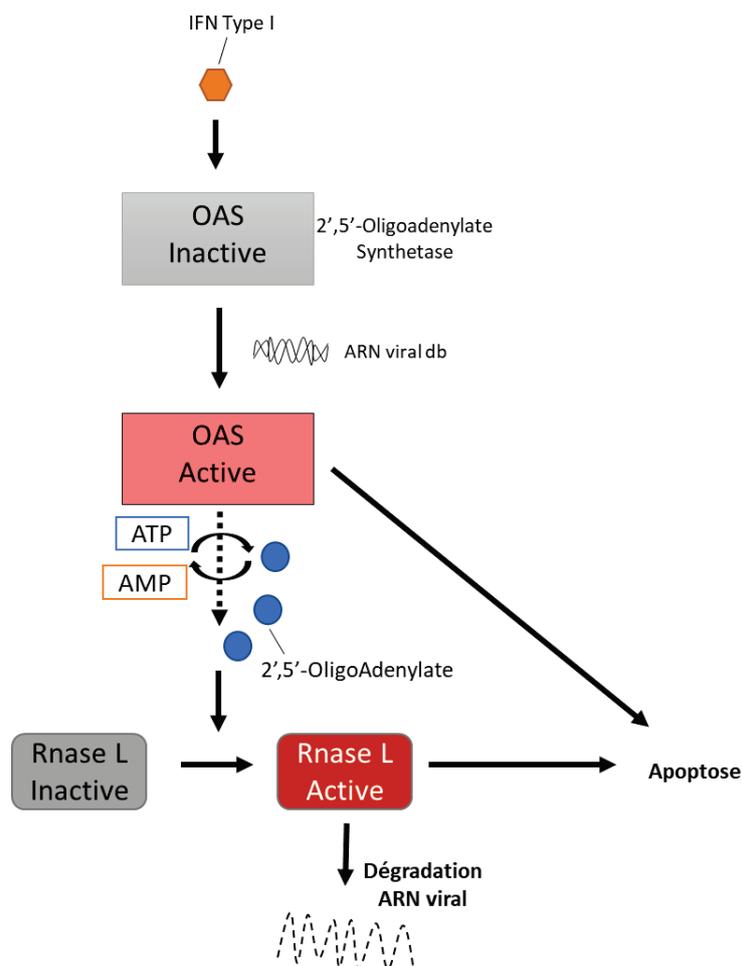


Figure 29 : Représentation schématique de la voie anti-WNV des 2',5'-Oligoadénylate synthétases. Synthèse personnelle.

Une autre famille de protéines cellulaires est impliquée dans la résistance à l'infection virale, les sérines/thréonines protéines kinases (PKR). Les PKR exercent leur activité antivirale en agissant sur la traduction (Hovanessian, 2007; Sadler and Williams, 2008; Samuel, 2001). Les IFN de type I et III induisent l'expression de PKR sous forme d'un monomère qui est ensuite activé par un certain nombre de ligands dont les ARNdb viraux (Ank et al., 2006; 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., 2005). La PKR activée phosphoryle le facteur eucaryotique d'initiation de la traduction, eIF2 α , empêchant ainsi la synthèse des protéines virales (Dey et al., 2005; Taylor et al., 2005). L'action des PKR sur le WNV participe efficacement à la résistance vis-à-vis de l'infection (Samuel et al., 2006). Néanmoins, les différents membres de la famille des *Flaviviridae* ne sont pas tous sensibles à l'action des PKR.

d. Autres réponses cytokines

Les cytokines, petites protéines sécrétées par les cellules, jouent notamment un rôle clé dans la modulation des réponses immune et inflammatoire. Ce groupe de molécules est constitué par les interférons (IFNs), les interleukines, les chimiokines, la famille du facteur de nécrose tumorale (ex : TNF- α) et la famille des CSFs (colony-stimulating factors) (Tisoncik et al., 2012; Turner et al., 2014).

L'IFN- γ , un interféron de type II, est impliqué dans la protection de l'hôte lors de l'infection par le WNV (Shrestha et al., 2006). L'activation de lymphocytes médiée par l'IFN- γ permet de limiter la dissémination du WNV dans l'organisme infecté (Brien et al., 2011; Fang et al., 2010). De plus, un traitement des cellules dendritiques primaires (DCs) avec de l'IFN- γ réduit significativement la réplication virale (Fang et al., 2010; Shrestha et al., 2006).

L'IFN- λ , interféron de type III, est décrit pour inhiber l'infection par un large panel de virus, notamment le WNV (Lazear et al., 2015a; Ma et al., 2009; Mordstein et al., 2010; Nice et al., 2015). Suite à l'interaction avec son récepteur IFNLR, l'IFN- λ déclenche une cascade de signalisation, médiée par JAK-STAT, qui induit l'expression de gènes possédant des activités antivirales et immunomodulatrices (Donnelly and Kotenko, 2010). De plus, l'interaction de l'IFN- λ avec son récepteur IFNLR1 résulte en une rapide modulation des jonctions cellulaires endothéliales permettant l'augmentation de l'intégrité de la BHE (Lazear et al., 2015b). Ceci limitant l'entrée du virus dans le SNC.

L'expression d'interleukines à la fois pro- (ex : IL-1 β , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) mais aussi de chimiokines permet la migration et le recrutement de cellules immunitaires au niveau des tissus infectés (Daniels et al., 2017). Ce mécanisme de défense est en particulier important dans le SNC lorsque celui-ci est infecté par le WNV (Suthar et al., 2010; Szretter et al., 2010). De plus, la production de ces molécules par les cellules résidentes du SNC (astrocytes, microglie, oligodendrocytes, neurones) induit, de manière indépendante de l'infiltration de cellules immunitaires, une réponse immune innée robuste contre l'infection à WNV (Clarke et al., 2014; Quick et al., 2014).

De manière paradoxale, le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF) favorise la neuroinvasion, en augmentant la perméabilité de la BHE via l'induction de cytokines proinflammatoires (Arjona et al., 2007, 2011). Chez l'homme et le modèle murin, l'infection à WNV provoque l'augmentation du MIF durant l'infection, avec une quantité importante détectée dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (Arjona et al., 2007). De plus, MIF semble induire l'expression de métalloprotéases de matrice (MMPs). Ces métalloprotéases, notamment MMP-1 et MMP-9, facilitent l'entrée du WNV dans le cerveau (Roe et al., 2012; Wang et al., 2008).

e. Rôle des cellules immunitaires dans la réponse innée

Outre leur implication dans la réponse adaptative, les cellules immunitaires jouent également un rôle dans la réponse innée.

En particulier, les cellules myéloïdes participent au contrôle de l'infection à WNV grâce à l'induction d'une réponse inflammatoire (production de cytokines) visant à éliminer le virus. Les monocytes, les macrophages mais aussi les DCs représentent une proportion importante de cette population et sont capables de déclencher une réponse innée antivirale lors de l'infection par le WNV (Ashhurst et al., 2013; Xie et al., 2015). Les facteurs tels que RIG-I et MAVS sont essentiels à la régulation fine de cette réponse innée (Daffis et al., 2009b; Suthar et al., 2010; Zhao et al., 2016). En effet, ces protéines cellulaires jouent un rôle critique dans la prévention d'une réponse immunitaire dérégulée et cytotoxique.

Enfin, les polynucléaires neutrophiles ont un rôle paradoxal dans la pathogenèse du WNV. En effet, ils servent de site d'amplification du virus au stade précoce d'infection mais sont aussi, de manière plus tardive, des éléments clés dans l'immunité innée en contribuant

à l'élimination virale suite la détection de chimiokines sécrétées par les macrophages (Bai et al., 2010).

1.5.3.2 La réponse adaptative

a. **Le rôle des lymphocytes T dans l'infection à WNV**

Les lymphocytes T cytotoxiques prolifèrent suite à la détection de cellules infectées (notamment par WNV) qui expriment à leur surface des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH de classe I) et sécrètent des cytokines proinflammatoires (Douglas et al., 1994; Kesson et al., 1987; Luo et al., 2017; Netland and Bevan, 2013).

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 (Luo et al., 2017; Netland and Bevan, 2013).

De même, ces deux populations étant en étroite interaction, les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle important dans l'élimination du WNV au sein de l'hôte. Ainsi, ils participent au contrôle de la sévérité de la maladie, en particulier au niveau du SNC (Lazear et al., 2013a). En effet, chez le modèle murin, une délétion en lymphocytes T CD8+ ou un défaut de CMH de classe I sont associés à une plus grande mortalité par rapport à des souris sauvages (Lazear et al., 2013a; Netland and Bevan, 2013; Shrestha and Diamond, 2004).

b. **La réponse humorale**

La réponse humorale est importante dans le contrôle de l'infection virale et de la dissémination. Dans le cadre du WNV, les signes cliniques de la maladie sont accentués chez des souris déficientes en lymphocytes B fonctionnels, cellules productrices d'anticorps. En effet, on observe une augmentation du titre viral dans le SNC avec 100% de mortalité associée (Diamond et al., 2003). Néanmoins, l'injection d'anticorps provenant de souris sauvages immunisées est capable de protéger des individus vis-à-vis d'une dose létale de WNV (Diamond et al., 2003).

Les anticorps neutralisants, tels que les IgM et IgG, limitent la dissémination du virus et sont donc essentiels au contrôle de l'infection par WNV. Les IgM sont les premiers anticorps produits suite à l'infection, puisqu'ils sont détectés à partir de 3 à 7 jours après l'apparition des premiers symptômes (**Figure 30**) (Zeller and Schuffenecker, 2004). Ils sont ainsi déterminants dans la limitation de la virémie et de la dissémination, notamment vers le SNC. Néanmoins, leur taux circulant diminue ensuite rapidement dans les semaines qui suivent (Austin and Dowd, 2014; Tardei et al., 2000). De plus, les IgM ne passent pas la BHE (Tardei et al., 2000).

Les IgG sont ensuite produits, entre 6 et 10 jours après l'apparition des symptômes (**Figure 30**) (Austin and Dowd, 2014; Tardei et al., 2000). Ceux-ci, responsables de la mémoire immunitaire, confèrent une protection à long terme vis-à-vis du WNV (Austin and Dowd, 2014; Diamond et al., 2008; Tardei et al., 2000).

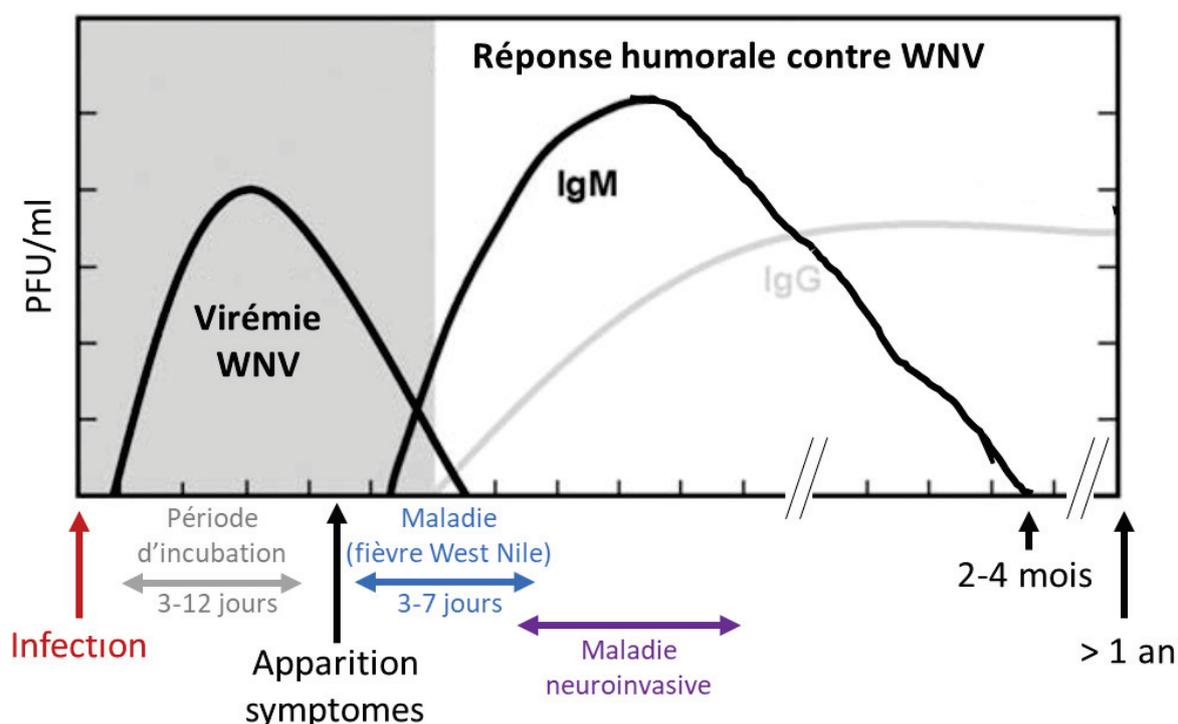


Figure 30 : Cinétique des différentes phases de l'infection par WNV. D'après (Bahuon, 2012; Zhang et al., 2009).

La plupart de ces anticorps neutralisants sont dirigés contre la protéine E, mais aussi la protéine prM (Austin and Dowd, 2014; Colombage et al., 1998). Les trois domaines de la

protéine E du WNV induisent la production d'anticorps neutralisants (Austin and Dowd, 2014; Oliphant et al., 2006). Cependant, le domaine DIII porte les épitopes les plus immunogènes à l'origine des anticorps avec la plus grande capacité de neutralisation (Beasley and Barrett, 2002; Choi et al., 2007; Chua et al., 2013; Oliphant et al., 2005). Les anticorps anti-DIII bloquent l'interaction entre la protéine E, à la surface du virion, et les récepteurs cellulaires. Inhibant ainsi l'entrée et la fusion du virus dans la cellule hôte (Austin and Dowd, 2014; Nybakken et al., 2005). La plupart des anticorps produits lors d'une infection par le WNV reconnaissent les protéines structurales, mais certains sont dirigés contre la forme sécrétée de la protéine NS1 circulant dans le sang ainsi que contre la NS1 fixée à la surface des cellules (Chung et al., 2006a; Edeling et al., 2014; Hua et al., 2014; Sun et al., 2012). En effet, sNS1 est détectable dans le plasma avant l'apparition des symptômes (Chung and Diamond, 2008). De plus, certains de ces anticorps anti-NS1 sont capables de protéger l'individu contre une dose létale de WNV (Chung et al., 2006a).

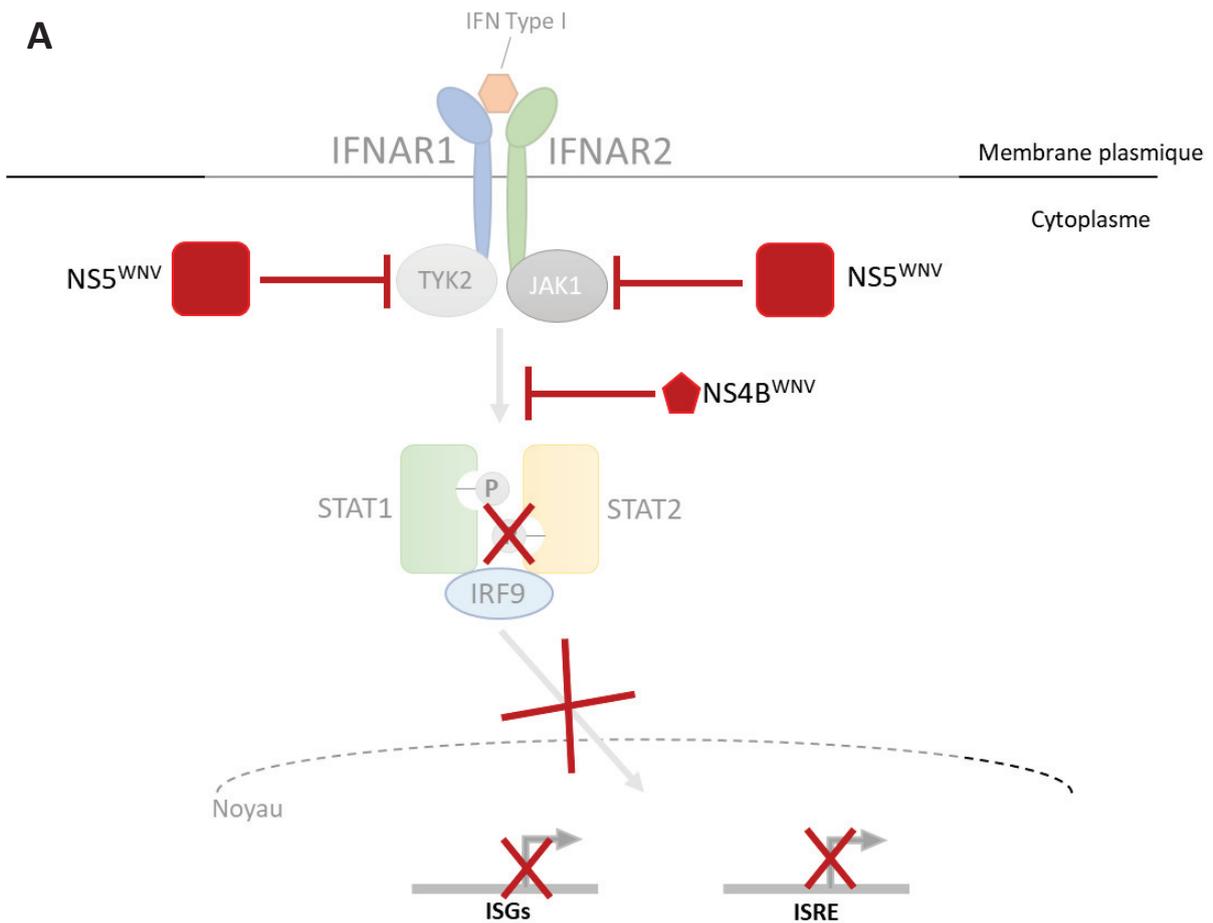
1.5.3.3 Mécanismes d'évasion du WNV au système immunitaire de l'hôte

Les protéines non structurales du WNV inhibent la phosphorylation de JAK1 et TYK2 ainsi que l'activation des facteurs de transcriptions STAT1 et STAT2, conduisant à la synthèse d'IFN- α (Evans and Seeger, 2007; Guo et al., 2005). NS4B empêche la phosphorylation de STAT1 et STAT2, et leur translocation vers le noyau (**Figure 31 A**) (Evans and Seeger, 2007; Liu et al., 2005; Muñoz-Jordán et al., 2005). NS2A inhibe la transcription des gènes sous contrôle de l'IFN- β (**Figure 31 B**) (Liu et al., 2004, 2006). NS5 inhibe la phosphorylation de JAK1 et TYK2, bloquant le signal IFN (**Figure 31 A**) (Laurent-Rolle et al., 2010). La forme intracellulaire mais aussi sécrétée de la protéine NS1 participent activement à l'évasion à la réponse immune de l'hôte. Notamment en bloquant la réponse IFN de type I, en inhibant l'activation du complément ainsi que la transduction du signal et la sécrétion de cytokines induites par TLR3 (**Figure 31 C**) (Diamond, 2009a; Wilson et al., 2008). Mais aussi en antagonisant la voie dépendante des RIG-I-like-receptors (RLRs) (**Figure 31 B**) (Zhang et al., 2017).

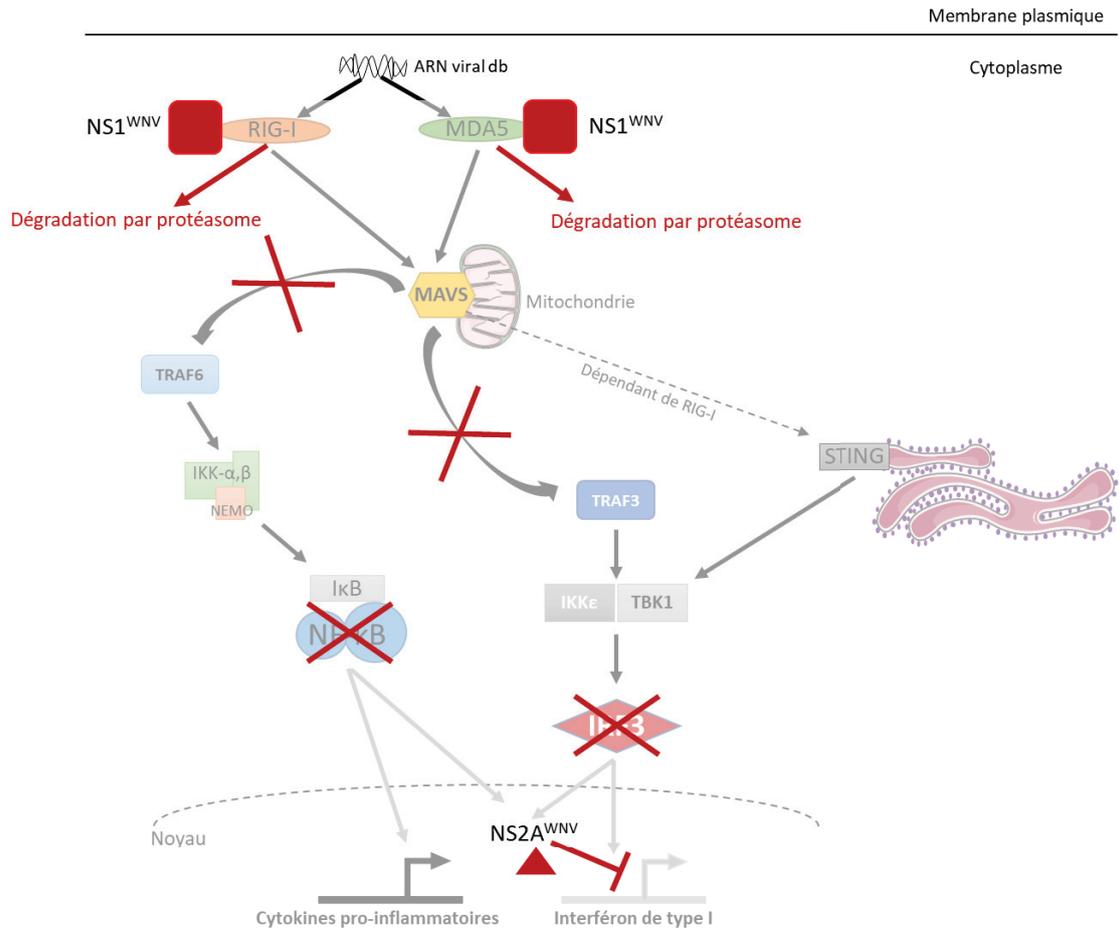
Ces facteurs jouent un rôle dans la défense anti-WNV mais le WNV est capable de retarder l'activation d'IRF3 jusqu'à ce que la production virale soit bien établie, permettant

ainsi au virus de se multiplier dans la cellule avant que la réponse IFN ne limite sa diffusion (Diamond, 2009a; Fredericksen and Gale, 2006; Zhang et al., 2017).

L'infection de cultures primaires de macrophages humains avec le WNV 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., 2008). Cependant, ce mécanisme est dépendant de l'âge et donc de l'état du système immunitaire, avec une inhibition plus importante chez un hôte jeune (Kong et al., 2008).



B



C

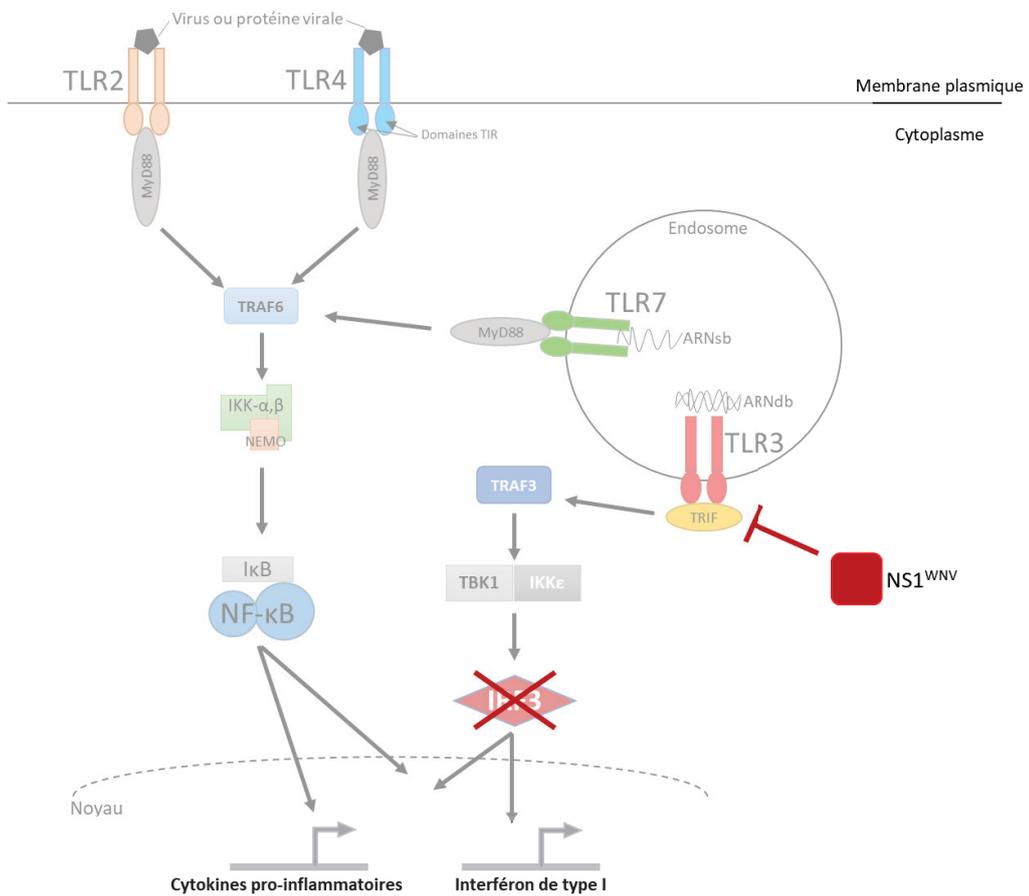


Figure 31 : Représentations schématiques des mécanismes d'évasion à la réponse immunitaire du WNV. Synthèse personnelle.

I.6 Traitements, vaccins et diagnostic

I.6.1 Approches antivirales

A ce jour, il n'existe aucun traitement spécifique contre une infection par le WNV. Seules des approches traitant les symptômes tels les maux de têtes, les nausées et vomissements ainsi que le suivi de la pression intracrânienne sont mises en place ([David and Abraham, 2016](#)).

Différentes approches impliquant des modèles *in vitro* ainsi que des modèles animaux ont été investiguées dans le but de développer une prophylaxie et un traitement efficaces contre WNV. La Ribavirine, notamment, une molécule antivirale couramment utilisée contre le virus de l'hépatite C (HCV) ou contre des virus responsables de fièvres hémorragiques (LASV, CCHFV), a été proposée contre le WNV ([Jordan et al., 2000](#); [Leyssen et al., 2005](#)). Cette molécule Ribavirine agit comme un inhibiteur de la synthèse d'ARN viral et de sa coiffe. Après avoir été métabolisée, la Ribavirine est un analogue de la guanosine ou de l'adénosine, des nucléosides de type purine, et peut alors être incorporée dans l'ARN viral au cours de la réplication. Cette incorporation engendre alors un important taux de mutations par l'ARN polymérase ARN dépendante du virus, conduisant à des molécules ARN non viables ([Day et al., 2005](#)). Si la Ribavirine a démontré une action inhibitrice, à forte dose, contre le WNV *in vitro*, elle est associée à une augmentation de la mortalité due à WNV en modèle hamster ainsi que chez l'homme ([Chowers et al., 2001](#); [Morrey et al., 2004](#)). Cette molécule ne représente donc pas un candidat idéal en vue d'une utilisation en thérapeutique dans les cas de maladies neuroinvasives à WNV. Des immunothérapies basées sur l'interféron ou les immunoglobulines (fragments d'anticorps) ont également été testées contre une infection neuroinvasive à WNV ([Diamond, 2009b](#); [Gould et al., 2005](#); [Haley et al., 2003](#); [Kalil et al., 2005](#)). Cependant, à ce jour, aucune de ces approches n'ont aboutit à une autorisation de mise sur le marché. De fait, un grand nombre d'études visant à réaliser des

criblages à haut débit de molécules et peptides anti-WNV et la démonstration de preuve de concept sont en cours dans plusieurs laboratoires.

I.6.2 Approches vaccinales

Malgré des études précliniques et cliniques visant à développer un vaccin contre le virus West Nile, aucun vaccin n'est disponible pour l'homme (Amanna and Slifka, 2014; Beck et al., 2013; Biedenbender et al., 2011; David and Abraham, 2016). Seuls des vaccins pour une utilisation vétérinaire dans la population équine sont disponibles sur le marché aux Etats-Unis et en Europe. Ceux-ci montrent une protection efficace des chevaux contre le développement de formes neuroinvasives dues au virus West Nile (Beck et al., 2013). On retrouve ainsi un vaccin basé sur une souche de WNV inactivée (EQUIP WNV[®], auparavant Duvaxyn WNV[®], Fort Dodge Animal Health/Pfizer). Ainsi qu'un vaccin recombinant (vaccin chimérique) basé sur un virus canarypox qui exprime les protéines de surface prM et E du WNV (PROTEQ WEST NILE[®] en Europe, Recombitek West Nile[®] aux USA, Merial/ Boehringer Ingelheim). Un autre vaccin recombinant était utilisé, le vaccin PreveNile[®] (Intervet / MSD Animal Health), basé sur une chimère virus YFV exprimant les protéine prM et E de WNV. Néanmoins, en raison d'une augmentation de problèmes sévères suite à la vaccination avec le vaccin PreveNile[®], celui-ci a été retiré du marché en 2010 (Amanna and Slifka, 2014; Beck et al., 2013). Ce vaccin chimérique a depuis été remplacé par une forme inactivée, ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché européen en 2013. Enfin, on retrouve aussi sur le marché un vaccin à ADN contenant des adjuvants, le West Nile-Innovator DNA[®] (Fort Dodge Animal Health/Pfizer, Zoetis) uniquement disponible aux USA. De manière intéressante, avec l'émergence de souches virulentes de WNV appartenant au lignage 2, les vaccins EQUIP WEST NILE[®] et PROTEQ WEST NILE[®] ont montré une protection contre ces souches virales en modèles animaux (Beck et al., 2013). Néanmoins, les épizooties de WNV étant difficilement prédictibles et la mise en place d'une immunité protectrice étant longue (supérieure à 6 semaines), l'utilisation des vaccins est limitée.

I.6.3 Outils de diagnostic

Le diagnostic du WNV représente un enjeu important en termes de mesures cliniques et d'épidémiologie. En effet, les diagnostics d'infections à WNV à la fois dans la population animale (faune aviaires et chevaux) et humaine permettent de surveiller la circulation du WNV et ainsi mettre en évidence une épidémie lorsque celle-ci se déclare (augmentation de l'incidence dans une ou plusieurs régions données sur une période donnée). De plus, le diagnostic permet de suivre l'évolution d'une épidémie et d'aider à la mise en place de mesures sanitaires adéquates. Ainsi, la prise en charge médicale d'animaux infectés et/ou de patients est facilitée et accélérée.

Une grande diversité d'outils sérologiques sont disponibles pour diagnostiquer une infection par le WNV. Les méthodes les plus utilisées sont la neutralisation virale (VNT), les tests ELISA et les immunomarquages fluorescents (**Figure 32**) (Beck et al., 2013).

La neutralisation virale, avec le test de réduction du nombre de plages de lyses (PRNT), représente la référence (gold standard) des tests sérologiques de diagnostic d'une infection par WNV. Ce test est réalisé en accord avec les protocoles standards utilisant un seuil de réduction du nombre de plages de 90% (PRNT90) relatif à la dilution du sérum contenant les anticorps. Grâce à ce test, la présence et la capacité des anticorps (présents dans le sérum d'un individu potentiellement infecté) à réduire le nombre de plages de lyses *in vitro* sont quantifiées visuellement. Un échantillon est considéré positif si le seuil de 90% de plages de lyses en moins par rapport au contrôle (sans anticorps anti-WNV) est atteint. Un test PRNT50 avec un seuil de 50% de réduction du nombre de plaque de lyse est parfois utilisé. Un test de micro-neutralisation virale est également utilisé. Celui-ci est une modification du test PRNT qui permet le criblage d'un grand nombre d'échantillons via l'utilisation de microplaques de culture cellulaire. La VNT est suffisamment spécifique pour différencier les réactions sérologiques croisées entre des *Flavivirus* de groupes sérologiques différents, mais pas entre les différentes espèces virales au sein d'un même groupe (Weingartl et al., 2003). De plus, cette méthode est moins sensible que la méthode ELISA. Enfin, bien que la VNT soit la méthode de référence, elle nécessite la manipulation de virus WNV infectieux en laboratoire confiné de niveau 3 (BSL3), du personnel entraîné et qualifié,

et les résultats sont obtenus en 5 à 7 jours. En situation épidémique, durant ce temps incompressible pour l'obtention des résultats du diagnostic, un cas de fièvre West Nile peut dériver en forme sévère neuroinvasive.

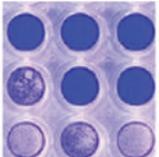
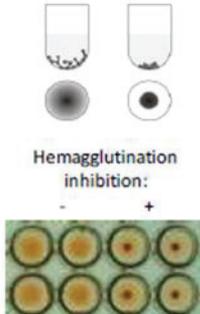
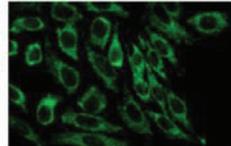
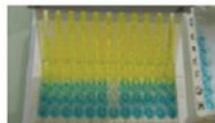
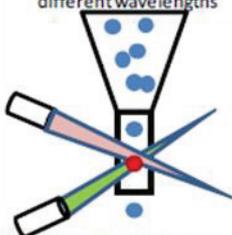
	PRNT/micro-VNT	Hemagglutination inhibition Test (HIT)	Immunofluorescence Assay (IFA)	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Microsphere immunoassay (MIA)
Principle	Neutralization of virus attachment to the cells or of post-binding steps	Inhibition of virus-induced erythrocyte aggregation	Antibody binding to virus-infected cells coated on microscope slides, revealed by fluorophore-conjugated antibodies	Antibody binding on 96-well plates coated with a viral antigen and revealed by enzyme-conjugated antibodies	Antibody binding on color coded beads coated with different viral antigens and differentiated by their fluorescence intensity
Antibody targets	Neutralizing epitopes in the E protein Blue wells: cells protected from viral lysis Other wells: virus-induced lysis plaques	E protein	Whole virus	Whole virus, viral cell lysate or recombinant proteins (prM-E, NS1, E-DIII...)	Recombinant proteins (prM-E, E-DIII...)
Interpretation					
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> - Gold standard - Highly specific - Not species specific 	<ul style="list-style-type: none"> - Inexpensive - Screening method (a few hours) - Not species specific - BSL-3 facility not required once the antigen has been prepared 	<ul style="list-style-type: none"> - Rapid (1-2 days) - Commercial kits available - IgM and IgG differentiated - More specific than ELISA for IgM detection within the JEV serocomplex - No need for BSL-3 facility once the antigen has been inactivated 	<ul style="list-style-type: none"> - Rapid (a few hours) and inexpensive - Screening method - Commercial kits available - Highly reproducible and sensitive - IgM and IgG detection - Competition ELISA are not species specific - No need for BSL-3 facility with inactivated or recombinant antigens 	<ul style="list-style-type: none"> - Multiplexing capacity - Rapid (1 day) - Small sample volumes are needed
Drawbacks	<ul style="list-style-type: none"> - Less sensitive than ELISA - Cross-neutralization within the JEV serocomplex - Time-consuming (1 week) - Handling of infectious material in BSL-3 facility - IgM and IgG not differentiated 	<ul style="list-style-type: none"> - Less sensitive than ELISA - Less specific than VNT: cross reactions within the JEV serocomplex and with other flavivirus serocomplexes - Presence of non-specific inhibitors - IgM and IgG not differentiated 	<ul style="list-style-type: none"> - Less specific than VNT: cross reactions within the JEV serocomplex and with other flavivirus serocomplexes (particularly for IgG IFA) 	<ul style="list-style-type: none"> - Less specific than VNT : cross-reactions within the JEV serocomplex and with other flavivirus serocomplexes (particularly for ELISA IgG) 	<ul style="list-style-type: none"> - Specialized and equipped laboratories - Expensive
Field applications	Confirmation of past WNV infections (clinical investigations and serosurveys)	Screening tool (serosurveys)	Investigation of clinical cases	Competition and IgG indirect ELISAs: investigation of clinical cases, serosurveys, trade certification MAC-ELISA : confirmation of recent WNV infections, trade certification for countries specifically requiring IgM detection (e.g., Argentina, Tunisia,...)	Under development

Figure 32 : Principaux tests sérologiques de diagnostic d'une infection à WNV. (Beck et al., 2013).

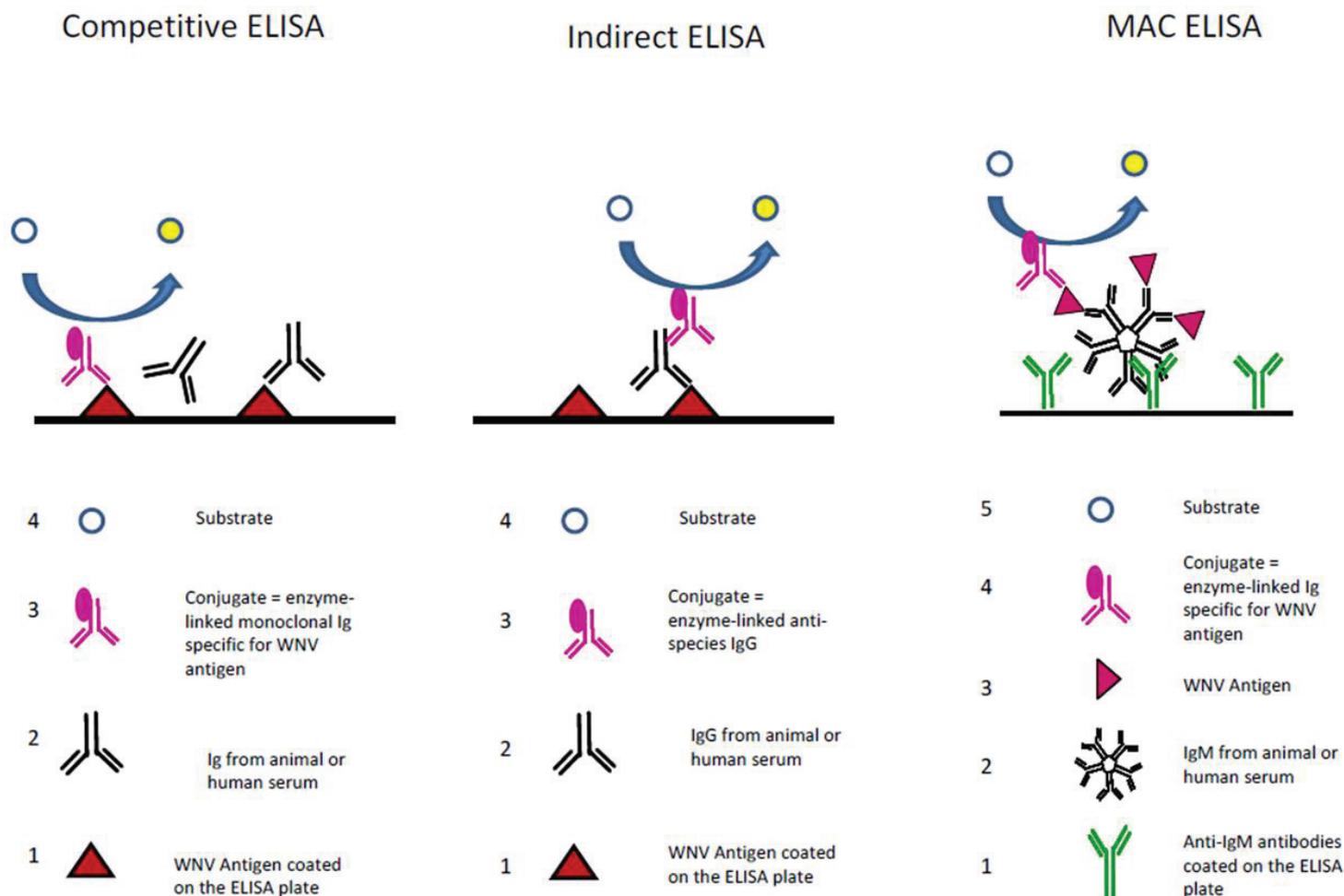


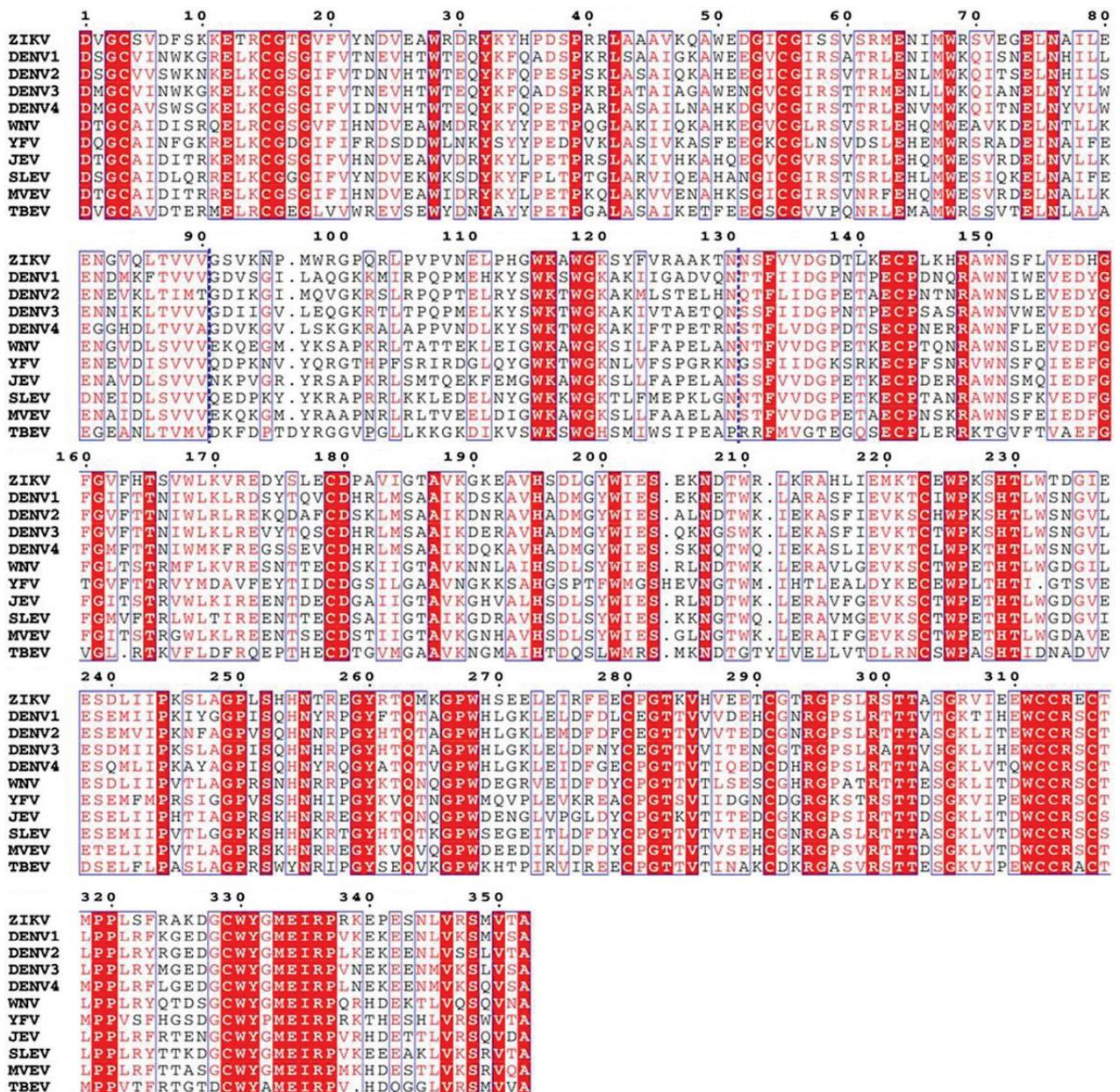
Figure 33 : Représentations schématiques des trois différentes méthodes ELISA pour le diagnostic d'infections à WNV. (Beck et al., 2013).

La détection d'une infection à WNV par ELISA est souvent préférée car il s'agit d'une méthode rapide, sensible, reproductible et abordable de détection des anticorps anti-WNV dans des échantillons. Il existe trois différents tests ELISA communément utilisés. La méthode ELISA compétitive, la méthode indirecte IgG ELISA, et l'ELISA de capture des anticorps IgM (MAC-ELISA) (**Figure 33**) (Beck et al., 2013, 2017). Des kits de diagnostic du WNV prêts à l'emploi basés sur les méthodes ELISA sont disponibles commercialement. Les tests ELISA basés sur la protéine d'enveloppe E, ou son domaine DIII, sont capables de différencier entre des infections causées par des *Flavivirus* de groupes sérologiques différents mais aussi entre WNV et d'autres *Flavivirus* du sérocomplexe JEV (JEV, MVEV, USUV et SLEV) (Beasley et al., 2004; Holbrook et al., 2004; Piyasena et al., 2017). Une

méthode à haut débit visant à détecter des anticorps anti-NS1 est également investiguée (Cleton et al., 2017). D'autres tests ELISA sont basés sur la détection de la protéine NS1 sécrétée dans la circulation sanguine. Ceux-ci peuvent discriminer entre des infections causées par WNV et celles causées par d'autres virus du même groupe. De plus, la présence de sNS1 dans le sang intervient assez tôt dans la cinétique de l'infection. Ainsi, l'utilisation d'une méthode ELISA ciblant la protéine sNS1 est avantageuse car elle permet un diagnostic précoce des infections à WNV. Des kits commerciaux de détection de la protéine sNS1 de *Flavivirus* (en particulier DENV) sont disponibles sur le marché (Platelia Dengue NS1 Ag #72830, Bio-Rad ; DENV Detect™ NS1 ELISA Kit, InBios) (Pal et al., 2014).

II. La protéine NS1 des *Flavivirus*

La glycoprotéine non-structurale NS1 est un produit viral inhabituel et énigmatique hautement conservé au sein des *Flavivirus*. En effet, les séquences nucléotidiques et peptidiques de NS1 partagent un fort degré d'identité chez l'ensemble des *Flavivirus* (Figure 34) (Mandl et al., 1989; Rastogi et al., 2016). Cette protéine multifonctionnelle assume une grande diversité de rôles au cours de l'infection.



Elle a tout d'abord été décrite comme un antigène soluble fixant le complément dans le sérum et le cerveau de souris infectées par DENV (Brandt et al., 1970). Avant d'être détectée dans le sang de patients infectés par la dengue (Young et al., 2000). Après le séquençage du génome de YFV, cette protéine virale fut renommée NS1 car le gène codant cette protéine est le premier de la région codant les protéines non-structurales (Rice et al., 1985). Une potentielle implication de cet antigène soluble dans la pathogenèse et la maladie a rapidement été mise en avant. En effet, une grande quantité de NS1 est observée dans les formes les plus sévères de la maladie causée par DENV, telles que le syndrome de choc ou les fièvres hémorragiques (DSS et DHF) (Alcon et al., 2002; Bokisch et al., 1973; Libraty et al., 2002; Young et al., 2000). Aujourd'hui, des études structurales démontrent que cette forme sécrétée de NS1 (sNS1) se présente comme un hexamère lipoprotéique avec une structure particulière « barrel-shaped structure » (Figure 35) (Akey et al., 2014; Edeling et al., 2014; Gutsche et al., 2011). Celle-ci est associée avec plusieurs types de molécules lipidiques différentes (Gutsche et al., 2011). De plus, sNS1 est fortement immunogène, induisant la production d'une grande quantité d'anticorps anti-NS1 pouvant protéger vis-à-vis d'une dose létale de virus (Falgout et al., 1990; Henchal et al., 1988; Schlesinger et al., 1987). A la fois ces anticorps et la protéine ont été avancés comme étant impliqués dans la pathogenèse de la maladie (Avirutnan et al., 2006; Sun et al., 2007a).

En parallèle, cette protéine d'un poids moléculaire de 46-55 kDa, suivant le statut de glycosylation, se présente sous forme dimérique au niveau intracellulaire ou lorsqu'elle est associée aux membranes (à l'intérieur ou à la surface de la cellule) (Figure 36) (Mackenzie et al., 1996; Smith and Wright, 1985; Westaway and Goodman, 1987; Westaway et al., 1997). La glycosylation de NS1 est essentielle à la fois pour ses fonctions mais aussi pour la sécrétion (Flamand et al., 1999; Somnuk et al., 2011). De plus, les N-glycosylations sont notamment impliquées dans la capacité neuroinvasive du WNV (Whiteman et al., 2011). La NS1 intracellulaire co-localise avec des composants du complexe de réplication et l'ARN double brin, avec un rôle essentiel dans la réplication virale (Figure 36) (Fan et al., 2014; Mackenzie et al., 1996; Westaway et al., 1997; Youn et al., 2013). Concernant la forme associée à la membrane plasmique, à la surface de la cellule, elle est également fortement immunogène (Muller and Young, 2013; Schlesinger et al., 1990).

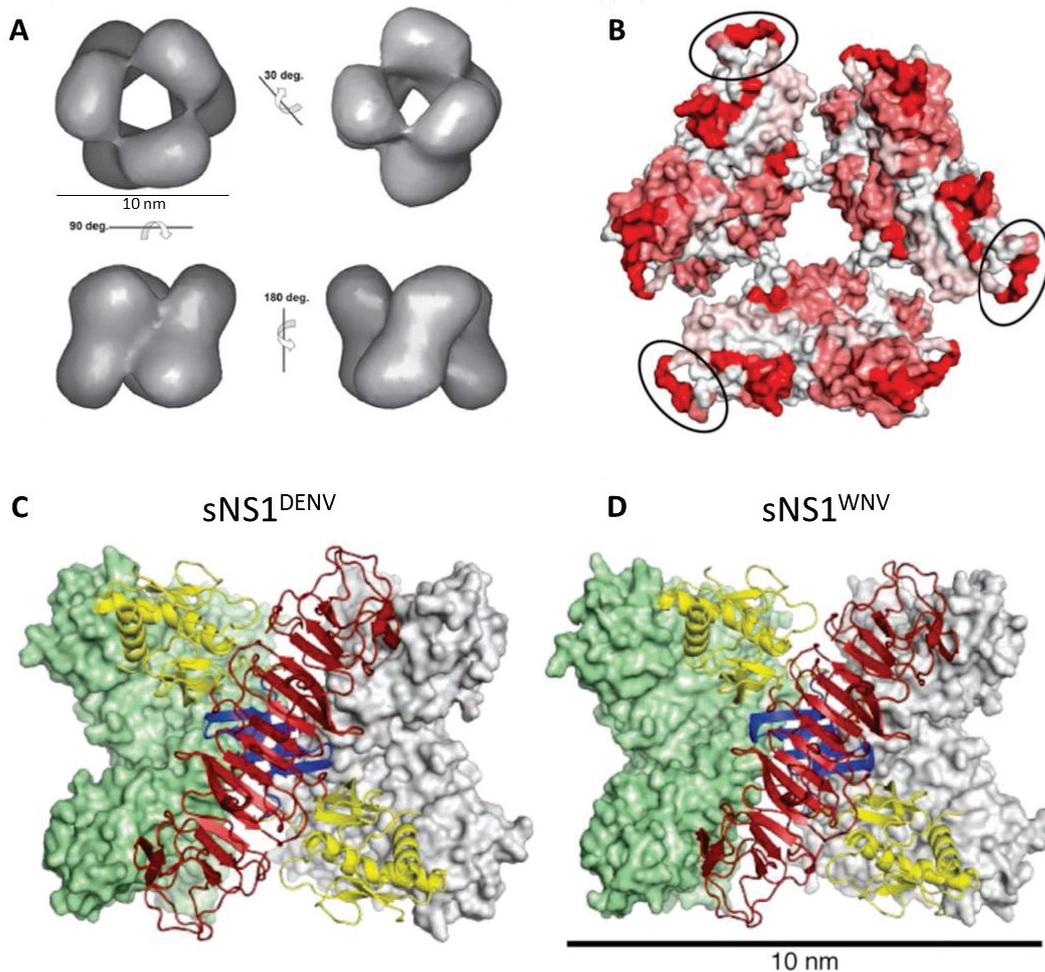


Figure 35 : Structure de la protéine sNS1 des *Flavivirus*. A, Modélisation de la structure hexamérique de la protéine sNS1 à partir d'images de microscopie électronique à transmission (MET). B, modélisation de la structure de la surface de la protéine sNS1 et présentation des principaux épitopes. C-D, structure symétrique de l'hexamère sNS1^{DENV} (C) et sNS1^{WNV} (D) et représentation de la structure en feuillets β et hélices α . Les surfaces moléculaires sont en vert et en blanc pour 2 dimères. D'après (Akey et al., 2014; Gutsche et al., 2011).

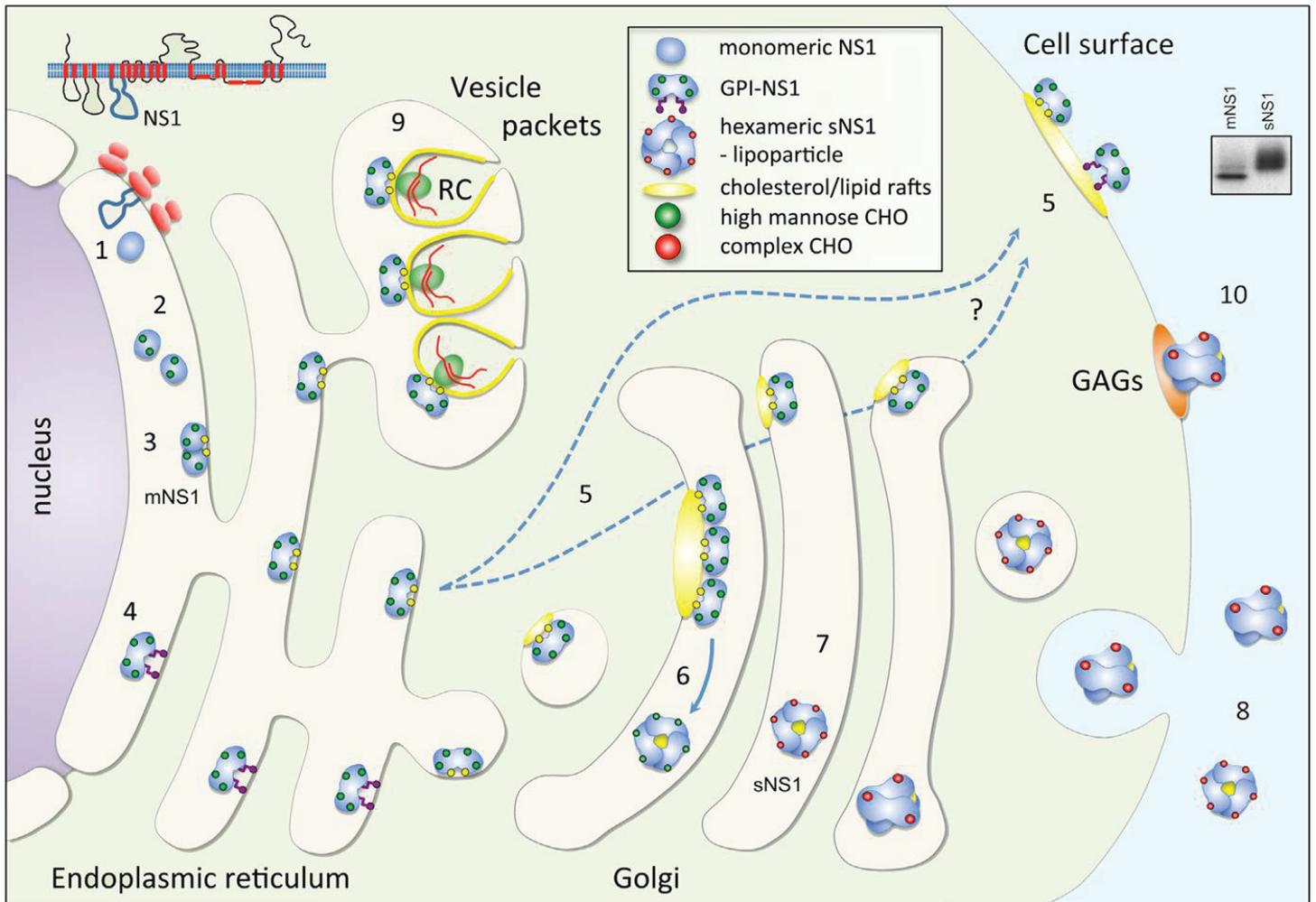


Figure 36 : Représentation schématique résumant le trafic de la protéine NS1 en cellules de mammifères. NS1 est initialement exprimée en association avec le RE comme partie intégrante de la polyprotéine virale. Une séquence signal située au niveau C-terminal, de la séquence correspondant à E, permet l'adressage de NS1 dans la lumière du RE ainsi que le clivage dans le RE afin de former le monomère de NS1 (1). (Muller and Young, 2013).

A noter, chez les *Flavivirus* appartenant au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise (ex : WNV, JEV, MVEV), l'expression d'une forme élonguée de NS1 (en C-ter), appelée NS1' (Blitvich et al., 1999; Mason, 1989; Melian et al., 2009). Cette protéine de 52-58 kDa, est exprimée à la fois dans des cellules d'insectes et de mammifères infectées. NS1' est le produit d'un décalage -1 du cadre ribosomique suite à la reconnaissance d'un motif conservé chez ces virus au niveau de l'extrémité 5' du gène *NS2A* (Figure 37) (Firth and Atkins, 2009; Melian et al., 2009). Ce décalage résulte en l'addition de 52 aa supplémentaires à la protéine NS1. La forme NS1' semble être impliquée à la fois dans la réplication virale mais aussi dans

la neurovirulence, en substituant NS1 lorsque celle-ci est délétée (Melian et al., 2009; Young et al., 2013).

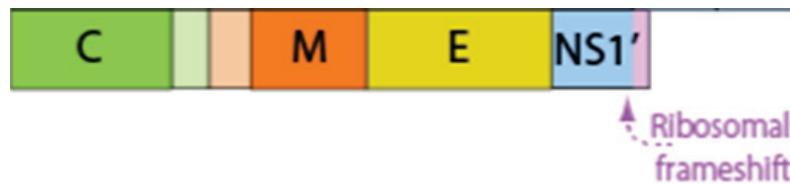


Figure 37 : Représentation schématique du décalage du cadre ribosomique de lecture conduisant à la production de la protéine NS1'. D'après ViralZone, ExPASy.

II.1 Fonctions de NS1 au niveau intracellulaire

II.1.1 Rôle dans la réplication virale et l'assemblage

Les *Flavivirus* détournent les protéines cellulaires et leurs fonctions afin d'effectuer les étapes de leur cycle, telles que la réplication du génome viral. Celle-ci a lieu dans des structures membranaires, dérivées de la membrane du RE, désignées comme « vesicle packets » (VPs) (Welsch et al., 2009; Yu et al., 2017). Le remodelage membranaire du RE, à l'origine de l'invagination formant ces sites de réplication, implique la protéine virale NS1 en interaction avec NS2A, NS4A et NS4B (**Figure 38**) (Akey et al., 2015; Youn et al., 2013; Yu et al., 2017). A noter que ces sites de réplication sont distincts des sites d'assemblage du virus (**Figure 39**) (Scaturro et al., 2015; Yu et al., 2017).

Une région hydrophobe de la protéine NS1 interagit avec l'extrémité N-terminale transmembranaire des protéines NS4A et NS4B (Youn et al., 2012). Cette interaction permet de former et de stabiliser l'ensemble de la structure du complexe de réplication (Yu et al., 2017). Ainsi, lorsque le gène codant NS1 est délété, la formation de complexes de réplication est drastiquement altérée. Ceci conduit à l'incapacité de répliquer l'ARN viral et donc à un défaut de production de particules (Youn et al., 2013). Néanmoins, la réplication peut être rétablie par *trans*-complémentation de la protéine NS1 et ce, de manière hétérologue (Khromykh et al., 1999; Youn et al., 2013).

De plus, les N-glycosylations portées par la protéine NS1 semblent importantes pour sa fonction dans la réplication virale (Crabtree et al., 2005; Muylaert et al., 1996; Whiteman et al., 2011, 2015). Les sites de glycosylation portés par les asparagines en positions 130 et 207, lorsqu'ils sont mutés, entraînent une suppression de la réplication à la fois en cellules de mammifères et d'insectes.

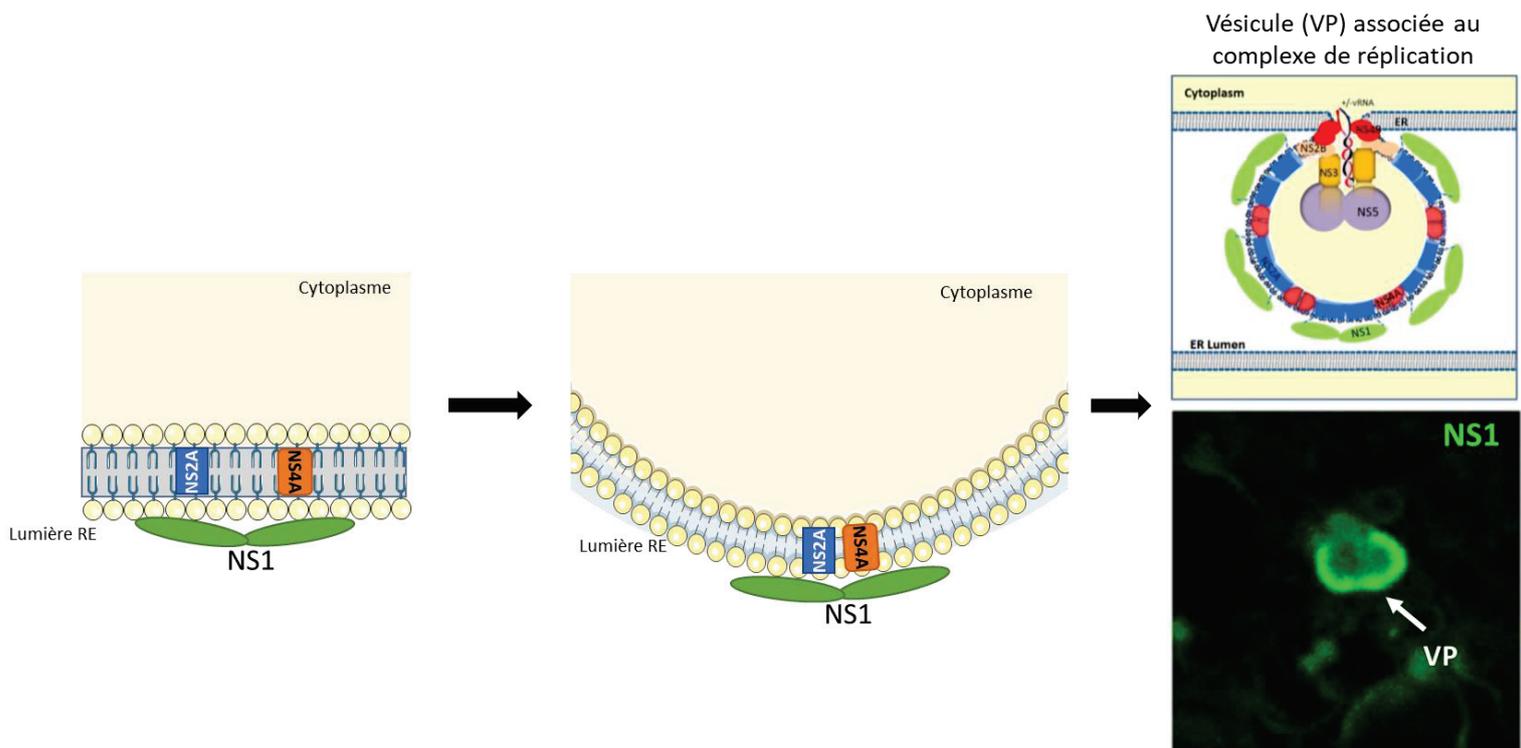


Figure 38 : Représentation schématique d'une vésicule (VP) associée au complexe de réplication du WNV et de sa formation. Les protéines non-structurales NS1, NS2A et NS4A induisent la courbure de la membrane du RE afin de former une vésicule (VP) dans laquelle aura lieu la réplication virale (complexe de réplication). Image d'une VP observée par détection de la protéine NS1 en microscopie confocale en fluorescence. Synthèse personnelle adaptée de (Yu et al., 2017).

Outre son implication dans le remodelage des membranes cellulaires, NS1 interagit aussi avec une grande diversité de protéines de la cellule hôte à des fins de réplication virale (Dechtawewat et al., 2016; Rastogi et al., 2016). NS1 interagit notamment avec des protéines ribosomales impliquées dans la traduction de la polyprotéine virale. De plus, ces processus nécessitant de l'énergie, NS1 entraîne la relocalisation de la GAPDH à proximité des sites de réplication, lors de l'infection par DENV, augmentant son activité dans la

glycolyse localement. Cette modulation de l'énergie métabolique cellulaire permet d'augmenter l'efficacité de la réplication et de la traduction lors d'une infection (Allonso et al., 2015).

Enfin, NS1 est également impliquée dans l'assemblage et la production de particules virales infectieuses (**Figure 39**). En effet, dans le cas de DENV, l'activité de remodelage des lipides et des membranes cellulaires couplée à l'interaction avec les protéines structurales suggère que NS1 participe à la morphogénèse des virions (Scaturro et al., 2015; Watterson et al., 2016).

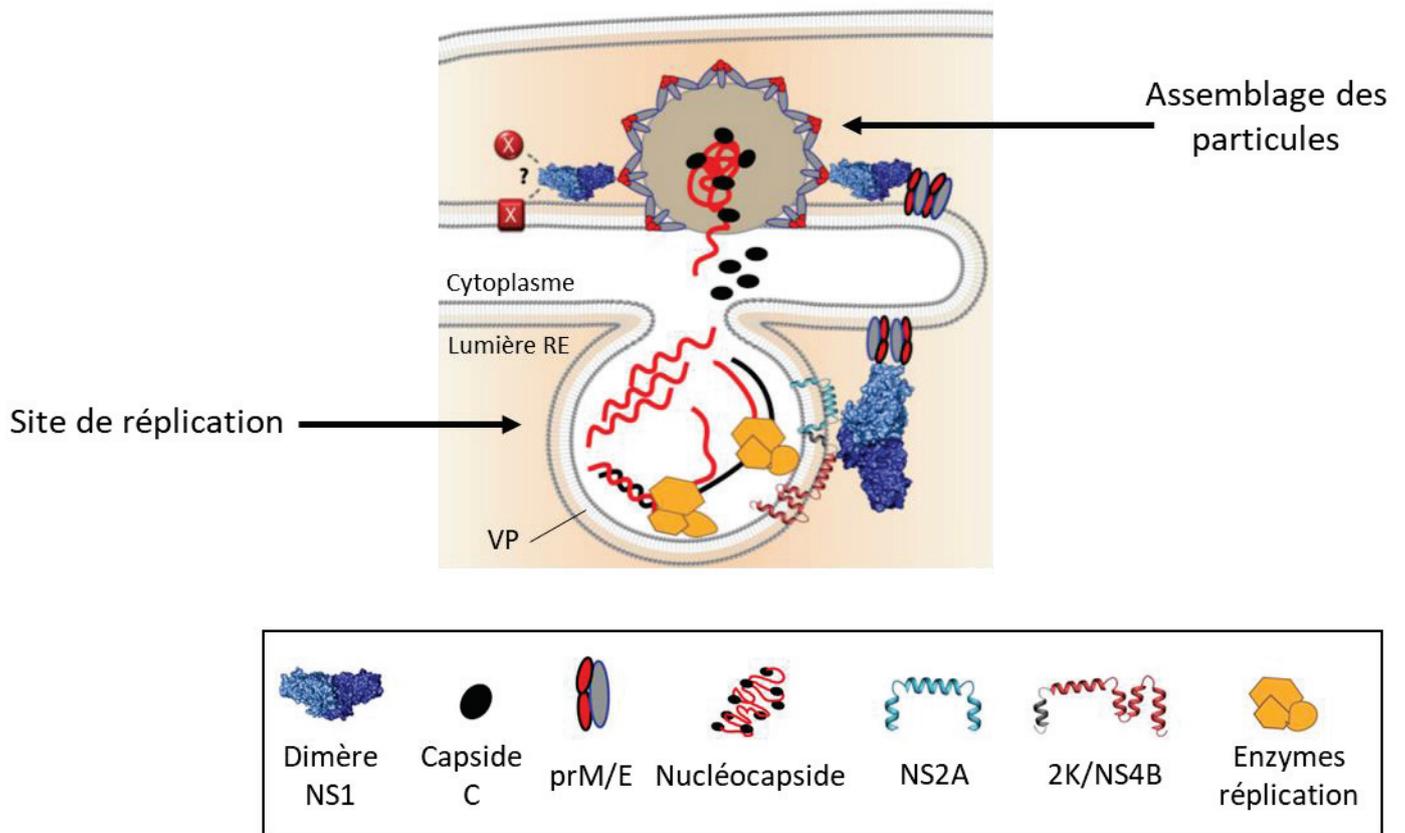


Figure 39 : Représentation schématique du rôle de NS1 dans l'assemblage et la production des particules flavivirales. Adaptée de (Scaturro et al., 2015).

II.1.2 Rôle dans l'évasion à la réponse immunitaire innée

La forme intracellulaire de la protéine NS1 des *Flavivirus* est également impliquée dans l'évasion à la réponse immune innée de la cellule (Wilson et al., 2008; Youn et al., 2010; Zhang et al., 2017). En outre, NS1 de WNV est capable d'inhiber la voie de signalisation dépendante du TLR3 et des RLRs, antagonisant la production d'IFN- β (Figure 40). La translocation des protéines IRF3 et NF- κ B phosphorylées vers le noyau est ainsi bloquée, inhibant l'activation de promoteurs dépendants de NF- κ B et des promoteurs IFN- β (Wilson et al., 2008; Zhang et al., 2017). L'altération du transport des formes actives de IRF3 et NF- κ B vers le noyau suggère l'interaction de NS1 avec RIG-I et MDA5 (Figure 40) (Zhang et al., 2017). En effet, cette interaction entraîne la dégradation de ces facteurs par le protéasome, bloquant alors le reste de la voie de signalisation, dont la phosphorylation et la translocation de IRF3 (Zhang et al., 2017).

Néanmoins, ces mécanismes sont sujets à débat puisque certaines études montrent des résultats contraires. Ceux-ci ne mettent pas en évidence une inhibition de la voie TLR3, impliquant également IRF3, par NS1 de WNV ni par NS1 de différents *Flavivirus* tels que YFV et DENV2 (Baronti et al., 2010; Fredericksen and Gale, 2006). Cependant, l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B est dépendante des voies TLR3 et/ou RLRs. Ainsi, il est possible que l'inhibition par la protéine NS1 soit plus importante dans la voie dépendante de RIG-I et MDA5 (RLRs) que celle dépendante de TLR3. De plus, l'ensemble des études suggère une modulation et une régulation fines de ces mécanismes ainsi qu'une dépendance du type cellulaire.

D'autre part, la récente description de la structure cristallographique de NS1 WNV et DENV met en avant un domaine « wing » qui est, de manière intéressante, similaire au domaine hélicase de RIG-I et MDA5 (Akey et al., 2014; Kato et al., 2006; Loo and Gale, 2011). Cette similitude structurale entre ces molécules de la cellule hôte et la protéine virale NS1 des *Flavivirus* tend à confirmer une implication de NS1 dans l'évasion à la réponse innée de la cellule via l'inhibition de ces voies de signalisation lors de l'infection.

Membrane plasmique

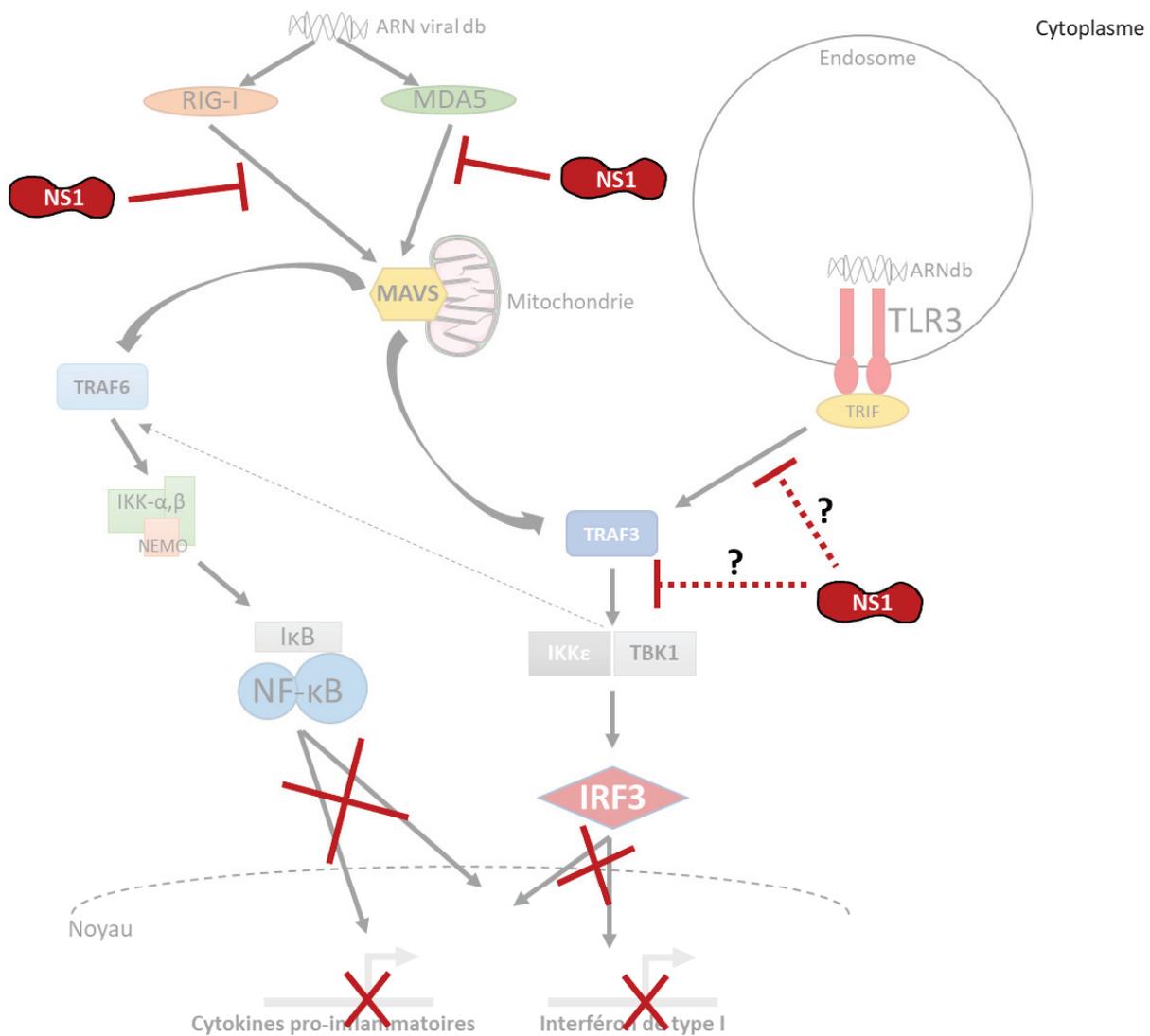


Figure 40 : Représentation schématique des mécanismes d'évasion à la réponse cellulaire médiés par la protéine NS1. Rôle de la protéine NS1 dans l'interférence avec les systèmes TLR3 et RLRs. Synthèse personnelle.

II.2 Fonctions de la forme sécrétée sNS1

Une caractéristique importante de NS1 est la quantité élevée de protéine sécrétée (sNS1) dans le milieu extracellulaire, avec notamment une concentration importante dans la circulation sanguine d'un individu infecté par un *Flavivirus* (Alcon et al., 2002; Chung and

Diamond, 2008; Macdonald et al., 2005; Young et al., 2000). En effet, lors de phases aiguës de la maladie à *Flavivirus*, la concentration de sNS1 peut atteindre plus de 50µg/ml dans le sang (Chung and Diamond, 2008; Libraty et al., 2002; Young et al., 2000). A noter que le niveau de sNS1 sécrétée diffère significativement d'un *Flavivirus* à l'autre. Cependant, en dehors d'une infection par DENV ou WNV, les données disponibles de quantification de sNS1 circulante *in vivo* (modèle animal et patients humains) sont limitées. Enfin, l'augmentation ces dernières années des projets visant à étudier le/les rôle(s) de sNS1 a permis de mettre en évidence une implication dans la pathogenèse et la pathologie associée à une infection par un *Flavivirus*.

II.2.1 Attachement et tropisme de sNS1

La forme sécrétée sNS1 des *Flavivirus* est capable de se fixer à la surface d'une grande diversité de cellules mais aussi d'interagir avec des facteurs de la réponse immunitaire dans la circulation sanguine (complément) (Alcon-LePoder et al., 2005; Avirutnan et al., 2007, 2011; Chung et al., 2006b; Crook et al., 2014; Modhiran et al., 2015). La fixation de sNS1 à des cellules se fait par l'interaction avec des glycosaminoglycanes (GAG) tels que l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate E mais aussi avec des récepteurs TLRs (Avirutnan et al., 2007; Crook et al., 2014; Modhiran et al., 2015). L'affinité de sNS1 pour la fixation à la surface des cellules présente une très grande variabilité en fonction du type cellulaire (cellules épithéliales, cellules endothéliales, cellules gliales, etc...) mais aussi en fonction du tissu dont le type cellulaire provient (Avirutnan et al., 2007). Par exemple sNS1 du virus de la dengue présente un tropisme privilégié pour les hépatocytes, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Alcon-LePoder et al., 2005). Suite à la fixation à la surface d'hépatocytes, sNS1 est internalisé par endocytose et s'accumule dans les endosomes tardifs (Alcon-LePoder et al., 2005). Cependant, sa vitesse de dégradation est assez lente puisqu'elle peut être détectée dans la cellule jusqu'à 48h après. En ce qui concerne sNS1 produite par le virus West Nile, son panel de cellules cibles reste encore assez éluif à cause du manque d'études à ce sujet.

L'éventail de cellules identifiées comme cibles pour la fixation de sNS1 et la grande variabilité d'affinité de sNS1 pour celles-ci suggèrent des interactions à la fois spécifiques et non-spécifiques. En effet, la possession d'un domaine hydrophobe, le contenu en lipides et la relative fragilité de la forme hexamérique de NS1 (sNS1) supposent une difficulté d'interprétation exacte quant à ces interactions (Akey et al., 2014 ; Muller and Young, 2013). De plus, l'ensemble des partenaires moléculaires identifiés ou non encore identifiés pour sNS1 suggère des spécificités d'interactions propres à chaque *Flavivirus*.

II.2.2 Immuno-modulation de la réponse de l'hôte par sNS1

II.2.2.1 Rôle dans l'évasion à la réponse immune médiée par le complément

Le système complément est un effecteur de la réponse immunitaire, contre un pathogène, médiée par les anticorps. La NS1 sécrétée peut avoir une fonction dans l'évasion à la réponse immune de l'hôte en inhibant certaines voies du complément telles que la voie classique et la voie des lectines (Avirutnan et al., 2010, 2011; Thiemmecca et al., 2016). La protéine sNS1 des *Flavivirus* a été décrite comme interagissant avec plusieurs protéines de la voie du complément, telles que C3, C4, C5, la clusterine et le facteur H.

La sNS1 sécrétée par plusieurs *Flavivirus* (DENV, WNV et YFV) se fixe sur les protéines régulatrices du complément C4 et C1s. En recrutant C1s (protéase spécifique du complément), sNS1 entraîne le clivage continu de C4 en C4b (**Figure 41**) (Avirutnan et al., 2010, 2011). En solution dans la circulation sanguine, la forme C4b est très rapidement inactivée par hydrolyse. De plus, sNS1 est capable d'interagir avec une protéine fixant C4 et C4b (la protéine C4BP), induisant le clivage de C4b fixé sur les cellules infectées et donc son inactivation (**Figure 41**) (Avirutnan et al., 2011). Ces deux mécanismes antagonistes du complément, médiés par sNS1, limitent la réponse immunitaire en modulant l'activation des voies classiques et des lectines du complément. Récemment, il a été montré que sNS1 de DENV interagit aussi avec la lectine fixant le mannose (MBL), un autre partenaire impliqué dans l'activation du complément via la voie des lectines (Thiemmecca et al., 2016). La sNS1 inhibe alors l'activité du complément. Ainsi, les cellules infectées sont protégées de la lyse et

de la neutralisation par le complément afin de permettre le cycle viral dans son intégralité **(Figure 41)**.

Le facteur H (fH), un régulateur de la voie alternative du complément, est également un ligand de sNS1 du WNV (Chung et al., 2006b). La fixation du fH circulant par sNS1 semble réduire la formation du complexe d'attaque C5b-9 et donc la réponse associée (Chung et al., 2006b; Conde et al., 2017; Schlesinger, 2006). Cependant, cette interaction semble ne pas avoir lieu avec la sNS1 du JEV (Krishna et al., 2009). De fait, on constate que même si la fonction antagoniste des voies du complément de sNS1 semble être une stratégie commune à tous les *Flavivirus*, il existe néanmoins des différences en termes de partenaires protéiques. Cette différence de spécificité d'interaction suggère que la contribution de sNS1 dans la pathogenèse varie certainement entre *Flavivirus* (Muller and Young, 2013).

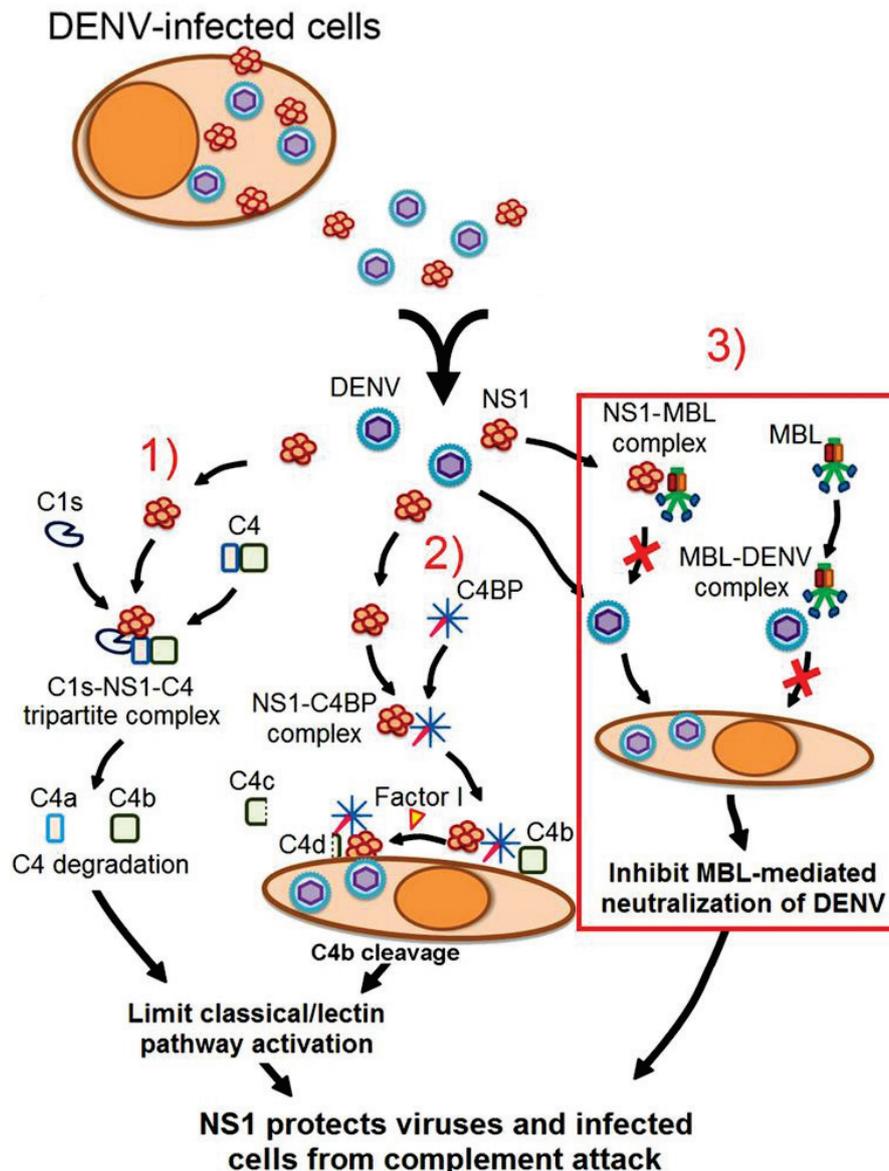


Figure 41 : Modèle schématique de l'antagonisme du complément par la protéine sNS1 de DENV. 1, sNS1 se fixe sur les facteurs proC1s et C4, déclenchant le clivage de C4 en C4a et C4b. Ces formes sont alors rapidement inactivées par hydrolyse (dégradation) ce qui entraîne une baisse de l'activation de la voie classique et de la voie des lectines du complément. 2, La protéine virale sNS1 recrute la protéine C4BP qui induit le clivage de C4b via son interaction avec le facteur I. Ceci limite alors l'activation des voies classiques et des lectines du complément. 3, sNS1 se fixe de manière compétitive sur le MBL, prévenant ainsi la reconnaissance du virus par MBL. La neutralisation médiée par MBL est alors limitée. (Thiemmecca et al., 2016).

II.2.2.2 Activation immunitaire et perméabilisation endothéliale/épithéliale

La perturbation de l'intégrité des barrières endothéliales et épithéliales est un composant fondamental de la pathologie causée par les *Flavivirus* chez leur hôte. Dans le cas d'une infection par DENV ou YFV, la paroi des vaisseaux sanguins, constituée de cellules endothéliales, est endommagée. Ceci entraîne alors des fuites vasculaires et des hémorragies caractéristiques des formes sévères de la maladie (syndrome de choc et fièvre hémorragique) (Basu and Chaturvedi, 2008; Beatty et al., 2015; Modhiran et al., 2015; Monath and Barrett, 2003). Tandis qu'avec les *Flavivirus* neurotropes, tels que WNV et JEV, la dérégulation et la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique sont des facteurs critiques dans le développement de la pathologie au niveau du SNC (Neal, 2014). Ces effets sont étroitement associés avec le niveau de molécules inflammatoires produites au cours de l'infection et sNS1 en est le principal suspect. Cette activation dérégulée du système immunitaire induite par la protéine NS1 sécrétée est à l'origine de la pathologie associée à la maladie. On parle alors de l'immunopathologie liée à une infection par un *Flavivirus* tel que WNV (Wang et al., 2011).

a. Rôle dans l'activation du complément

De manière paradoxale, sNS1 peut également suractiver la réponse complément au cours de l'infection flavivirale. Des études comparatives entre des patients souffrant de formes sévères et d'autres avec des formes modérées de l'infection par un *Flavivirus* ont mis en évidence une augmentation de l'activation du complément (Sobel et al., 1975). Cette augmentation est en lien avec la pathophysiologie de la maladie chez les patients présentant une forme sévère (Bokisch et al., 1973).

La forme sécrétée ainsi que la forme associée à la membrane plasmique de NS1 sont capables d'activer le complément en formant des complexes d'attaque de la membrane (MAC) avec les protéines C5b-9 et SC5b-9. L'action de ces complexes entraîne l'augmentation de la sécrétion de cytokines vasoactives en lien avec la sévérité de la maladie (**Figure 42**) (Avirutnan et al., 2006; Watterson et al., 2016). De plus, sNS1 interagit directement avec la clusterine (un facteur inhibiteur du complément) durant une infection par DENV. Cette interaction entraîne une réduction de la quantité de clusterine libre dans la

circulation sanguine, ce qui augmente la formation de complexes SC5b-9 dans le sérum de patients infectés, donc l'activation du complément et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Kurosu et al., 2007; Watterson et al., 2016).

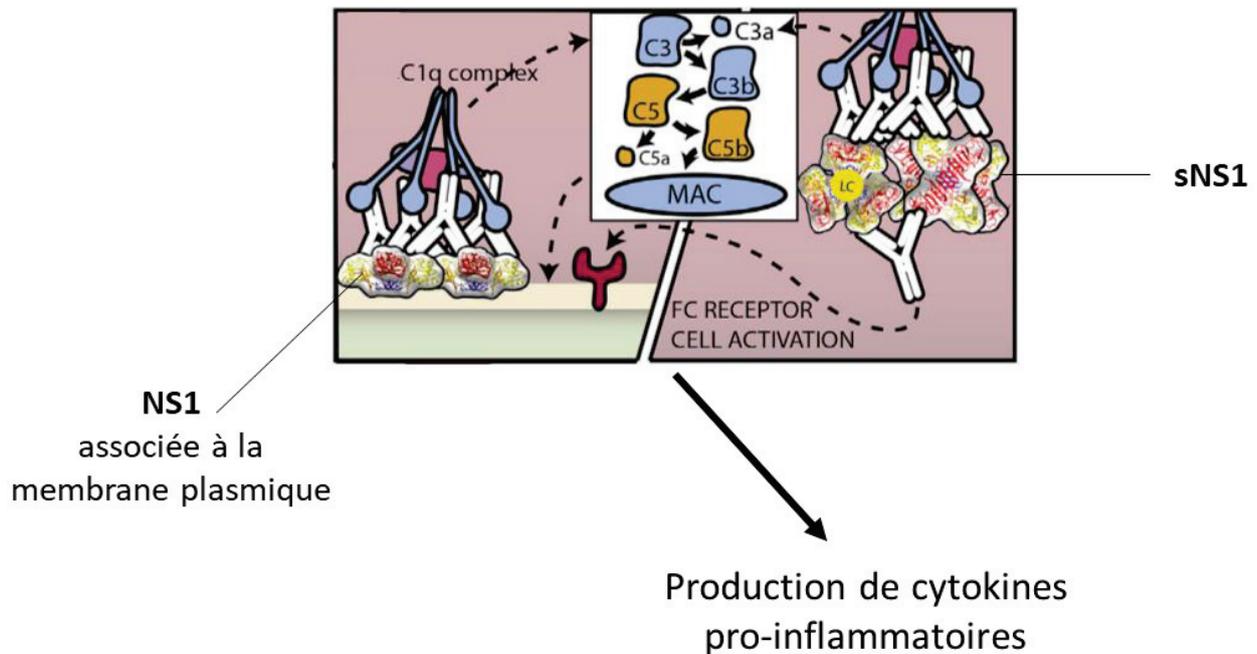


Figure 42 : Représentation schématique de l'activation du système complément par la protéine NS1. Les formes associées à la membrane plasmique ou sécrétée de NS1 forment des complexes avec les anticorps et des facteurs du complément. Ces complexes ont été mis en évidence dans la stimulation de l'activation du système complément, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires dans la circulation sanguine. Adaptée de (Watterson et al., 2016).

b. Induction d'auto-anticorps

En plus du complément, la sNS1 de DENV a été décrite comme inductrice d'auto-anticorps pouvant réagir de manière croisée avec des protéines présentes sur les plaquettes et les cellules endothéliales (Sun et al., 2007b, 2015). Suite à l'interaction d'auto-anticorps avec la surface des plaquettes, leur activation est alors bloquée (Figure 43). Une grande diversité de protéines cellulaires a été identifiée comme cible pour ces auto-anticorps (Cheng et al., 2009; Lien et al., 2015; Sun et al., 2015; Yin et al., 2013). Bien que la plupart

des anticorps dirigés contre la protéine NS1 confère une protection passive vis-à-vis d'une infection (*in vivo*), certains ont été mis en cause dans une augmentation de la morbidité et dans l'induction de l'apoptose médiée par l'oxyde nitrique dans les cellules endothéliales (*in vitro*) (Chen et al., 2013; Lin et al., 2002). De plus, la fixation d'anticorps anti-NS1 de DENV sur des cellules endothéliales peut également activer NF- κ B, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoire telles que IL-6, IL-8 (Figure 43) (Chen et al., 2013; Lin et al., 2005). Il apparaît donc important d'identifier les épitopes de sNS1 qui sont impliqués dans l'induction d'auto-anticorps afin de développer des stratégies vaccinales adéquates, basées sur cette protéine flavivirale.

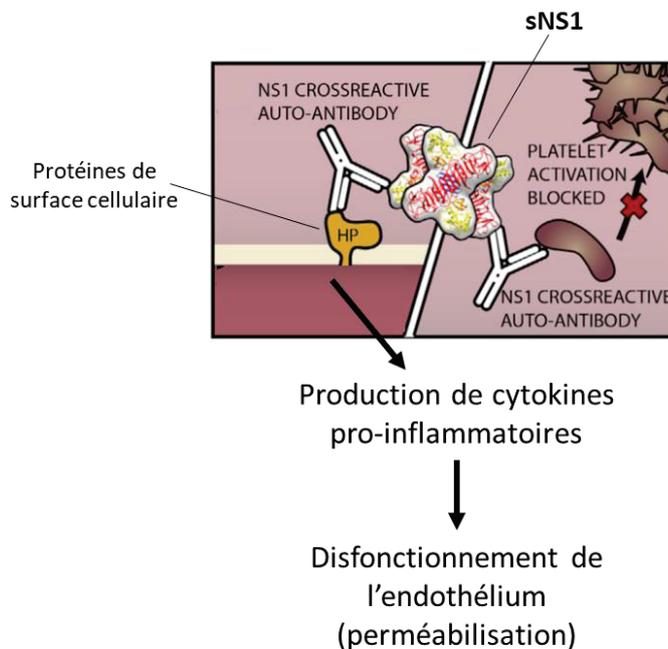


Figure 43 : Rôle de sNS1 dans l'induction d'auto-anticorps liés au dysfonctionnement de l'endothélium des vaisseaux sanguins. Les auto-anticorps générés contre la protéine sNS1 se fixent directement sur des protéines présentes à la surface de cellules endothéliales. Cela active alors la production de cytokines à l'origine de dysfonctionnements de l'endothélium sanguin et donc de fuites vasculaires. Les anticorps anti-sNS1 se fixent également aux plaquettes, inhibant leur activation. Adaptée de (Watterson et al., 2016).

c. Dérégulation de la réponse médiée par le système TLRs

Parmi les propriétés multifonctionnelles de la protéine sNS1 des *Flavivirus*, un rôle direct dans l'activation de la réponse immunitaire et dans le dysfonctionnement des cellules endothéliales a été mis en évidence. Ceci argumente une nouvelle fois sur les fonctions ambivalentes de ce déterminant viral au cours de l'infection.

En effet, un traitement à la sNS1 de DENV seule (en absence d'infection) suffit à reproduire des signes pathologiques caractéristiques d'une forme sévère d'infection par DENV. L'activation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que les fuites vasculaires engendrées sont ainsi retrouvées *in vitro* (**Figures 44-45**) (Beatty et al., 2015; Modhiran et al., 2015). Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle animal démontre que l'injection par voie intraveineuse de sNS1 recombinante induit une morbidité observable. Celle-ci est accompagnée par une importante production de cytokines à l'origine de ruptures au niveau de la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins (**Figures 44-45**) (Beatty et al., 2015). De plus, la co-administration de sNS1 et de virus augmente les symptômes de la maladie. L'effet est observé à son maximum au 3^{ème} jour post administration. Ce phénotype reflétant le retard observé, de manière courante chez l'humain, dans les cinétiques de réplication virale et la sévérité de la maladie suite à une infection par DENV (Watterson et al., 2016).

La dérégulation de la réponse cellulaire qui conduit à la synthèse et la sécrétion importante, voire exagérée, de cytokines pro-inflammatoires est plus couramment appelée « cytokines storm » (choc cytokinique). D'un point de vue moléculaire, le mécanisme à l'origine de cette surexpression est médié par la reconnaissance de sNS1 de DENV par le récepteur TLR4 (**Figure 44**) (Modhiran et al., 2015, 2017). Le récepteur TLR4 est exprimé à la surface d'une grande diversité de types cellulaires, tels que les cellules immunitaires et les cellules endothéliales (Vaure and Liu, 2014). Ce récepteur TLR4, agissant comme un récepteur de reconnaissance de motif ou PRR (« pattern recognition receptor »), va alors reconnaître sNS1 comme une signature moléculaire associée à un pathogène (PAMP). Conséquence de cette reconnaissance, l'activation des macrophages, lymphocytes et monocytes, ce qui conduit à la production de cytokines et à l'amplification dérégulée de la réponse (**Figures 44-45**) (Modhiran et al., 2015).

Cette activité de sNS1 semble mimer celle de l'endotoxine bactérienne, LPS (lipopolysaccharide), un ligand du TLR4 capable d'induire une importante production de molécules pro-inflammatoires (Cavaillon, 2017). En effet, une analyse comparative met en évidence des similitudes entre les manifestations cliniques d'une forme sévère d'infection par DENV (DSS/DHF) et celles d'un choc septique suite à une infection bactérienne. Ainsi, le terme de « toxine virale » est avancé afin de définir la protéine sNS1 du virus de la dengue (Modhiran et al., 2015).

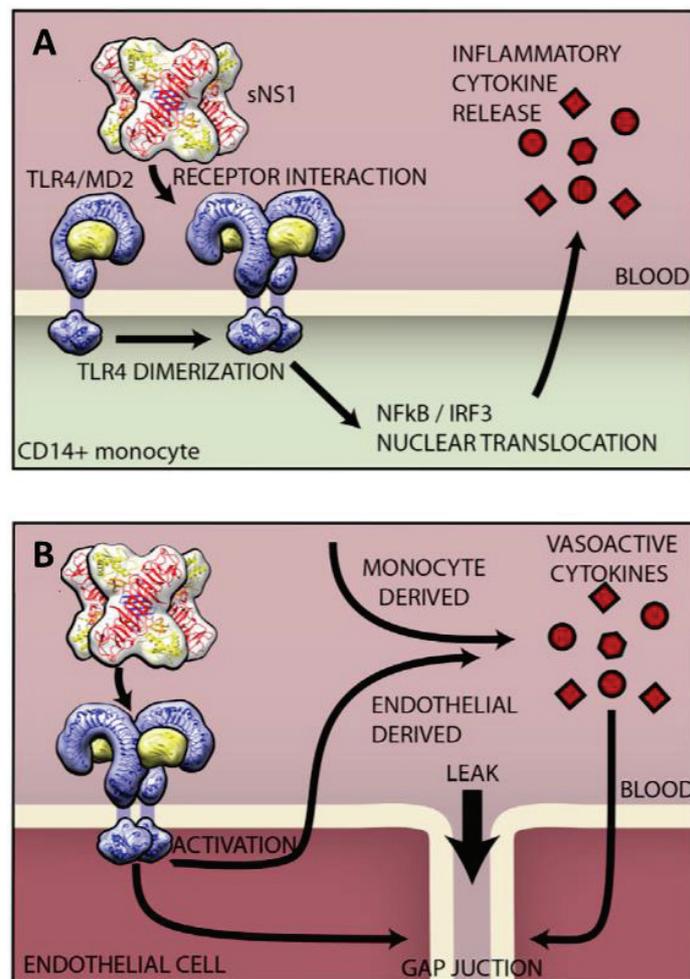


Figure 44 : Représentation schématique du rôle de sNS1 dans le déclenchement d'une réponse immunitaire dérégulée. A, La protéine sNS1^{DENV} interagit avec le récepteur TLR4 à la surface des cellules immunitaires (ex : monocytes CD14+), déclenchant l'activation de NF-κB et IRF3. L'activation de ces facteurs de transcription conduit à une importante production et sécrétion de molécules pro-inflammatoires dans la circulation sanguine. B, sNS1 interagit également avec TLR4 à la surface des cellules endothéliales. L'importante concentration en cytokines pro-inflammatoires provenant des cellules immunitaires et des cellules endothéliales activées est à l'origine de la déstabilisation et de la perméabilisation de l'endothélium des vaisseaux sanguins. (Watterson et al., 2016).

L'implication de sNS1 de DENV dans l'immunopathogénèse lors d'une infection par le virus de la dengue a également été évoquée via l'activation des récepteurs TLR2 et TLR6 (Chen et al., 2015). Le blocage des récepteurs TLR2 et TLR6 réduisant la production de TNF- α et d'IL-6 à la suite d'une stimulation par sNS1. De plus, des souris déficientes en TLR6 préalablement traitées avec sNS1 ont un taux de survie plus élevé après l'injection d'une dose létale de DENV (Chen et al., 2015). Cependant, ces résultats sont controversés puisque, par ailleurs, une étude démontre l'absence d'interaction entre sNS1 et les récepteurs TLR2 et TLR6 exprimés par les cellules immunitaires (Modhiran et al., 2017).

Dans le cas de la sNS1 produite par le WNV, les résultats sont contradictoires quant à l'interaction avec le système TLRs, notamment avec TLR3. Ce récepteur, exprimé au niveau de la membrane de l'endosome, semble être impliqué dans l'inflammation et dans l'augmentation de la charge virale au niveau du SNC. Notamment à cause de la déstabilisation de la BHE suite à la réponse inflammatoire (Wang et al., 2004). Néanmoins, un rôle protecteur est aussi décrit pour TLR3 lors de l'infection par WNV (Daffis et al., 2008). Ceci grâce au déclenchement d'une réponse antivirale efficace. Ainsi, sNS1 de WNV peut être impliquée dans l'inhibition de la voie de signalisation dépendante du TLR3. Une baisse de la production de molécules antivirales (IL-6 et IFN- β) par la voie TLR3 est observée à la fois *in vitro* et *in vivo* lors d'un traitement par sNS1 (Crook et al., 2014).

Malgré la multiplication des études concernant la forme sécrétée de la protéine NS1 des *Flavivirus*, ses propriétés multifonctionnelles rendent les interprétations de résultats difficile. Amenant parfois à des observations contradictoires. Néanmoins, celles-ci tendent à confirmer le rôle de sNS1, à la fois de manière directe et indirecte, dans la pathogénèse des *Flavivirus* durant l'infection de l'hôte.

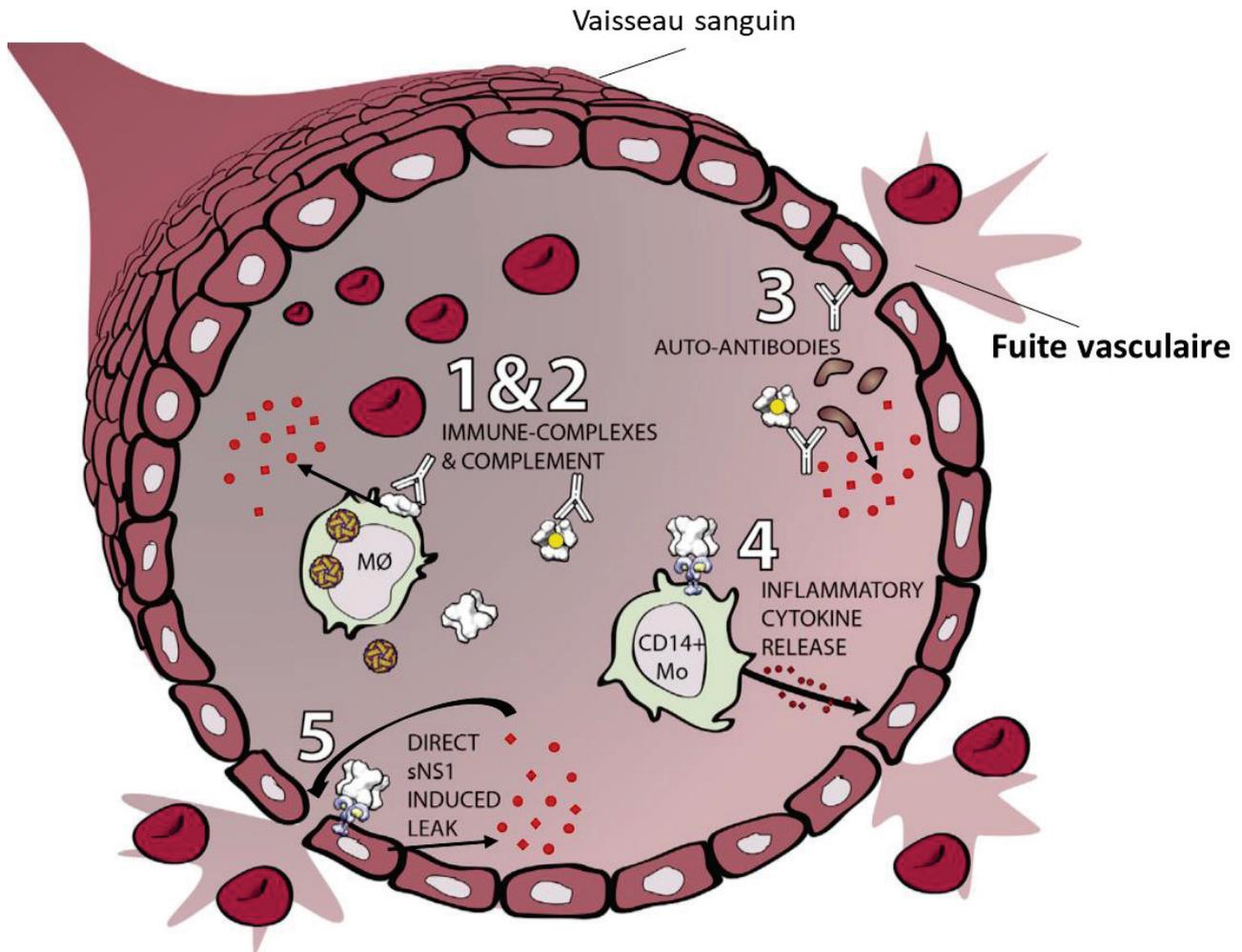


Figure 45 : Schéma général des différentes fonctions de la protéine sNS1^{DENV} présente dans la circulation sanguine lors de l'infection par DENV. (Watterson et al., 2016).

d. Implication dans la compétence vectorielle chez le moustique

Le cycle de transmission des *Flavivirus* implique un transfert viral entre des hôtes vertébrés et les vecteurs moustiques. L'ingestion, lors d'un repas sanguin, du virus par le vecteur à partir d'un hôte mammifère infecté est une étape essentielle dans le maintien et la transmission des *Flavivirus*. Étant donnée la quantité importante de protéine sNS1 circulant dans le sang d'un hôte infecté, celle-ci peut être ingérée simultanément avec le virus.

Dernièrement, il a été démontré que la sNS1 produite lors d'une infection (hôte mammifère) par DENV ou JEV augmentait l'acquisition de virus par le moustique au cours d'un repas sanguin (Liu et al., 2016). En effet, la présence de sNS1 dans le sang entraîne un taux d'infection plus important chez les moustiques par rapport à un repas sanguin

dépourvu de sNS1. Ce phénotype est également observé dans le cas de la transmission du ZIKV (Liu et al., 2017). De plus, une analyse transcriptomique met en évidence une activité modulatrice de l'immunité, par la sNS1, au niveau de la barrière du système digestif chez l'insecte (Liu et al., 2016). Cette modulation implique notamment l'inhibition de la cascade de signalisation JAK/STAT et du système ROS (« reactive oxygen species »), voies essentielles de l'immunité antivirale chez le moustique, mais aussi chez les insectes de manière générale (Dostert et al., 2005; Paradkar et al., 2012; Souza-Neto et al., 2009). Facilitant ainsi le passage de la barrière de l'intestin du moustique, étape critique pour le virus avant de se répliquer.

Cependant, l'immunisation active de l'hôte mammifère avec la protéine sNS1 permet de diminuer l'efficacité d'infection du vecteur (Liu et al., 2016).

Ainsi, la protéine sNS1 présente dans le sang d'un hôte infecté influencerait l'efficacité d'infection du vecteur moustique, par un *Flavivirus*, au cours du repas sanguin. Cette protéine virale semble alors jouer un rôle dans la dynamique de transmission de ces arbovirus (Liu et al., 2017). Cette fonction peut résulter de l'évolution des *Flavivirus* pour s'adapter à des environnements (hôtes) multiples (Liu et al., 2016).

Objectifs

Face à l'importante circulation du virus West Nile sur de nombreuses et vastes régions du globe, il est nécessaire de mettre en place des mesures, mais aussi de renforcer celles déjà existantes, contre le virus. L'étude fondamentale des propriétés du WNV permet, en décryptant les fonctions de chacune des protéines virales au cours de l'infection, une meilleure compréhension de la biologie complexe du virus. Ainsi, les connaissances acquises permettent le développement d'approches antivirales et diagnostiques dans le but de contrôler plus efficacement la transmission du WNV. La protéine virale NS1 des *Flavivirus* et sa forme sécrétée sNS1, portent un intérêt particulier du fait de leurs propriétés multifonctionnelles durant l'infection de l'hôte. L'hexamère sNS1 joue notamment un rôle central dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte, conduisant à la pathogenèse virale (Avirutnan et al., 2006; Beatty et al., 2015; Watterson et al., 2016). En effet, la protéine sNS1 et ses fonctions sont associées avec les formes sévères des maladies observées lors de l'infection par un *Flavivirus*. Néanmoins, l'essentiel des fonctions décrites concerne plus précisément la protéine sNS1 du virus DENV. On peut alors émettre l'hypothèse d'un rôle physiologique de la protéine sécrétée sNS1 également dans les formes sévères (neuroinvasives) d'infections par le WNV. Bien que les structures et de nombreuses fonctions biologiques du virus et de ses protéines soient communes à l'ensemble des *Flavivirus*, il semble que la protéine sNS1 interagisse avec des mécanismes suffisamment fins pour varier d'une espèce virale à une autre (Rastogi et al., 2016; Watterson et al., 2016). De plus, aucune étude n'a concerné la protéine NS1 issue d'une souche européenne de WNV, s'intéressant plus particulièrement aux souches américaines telles que la souche WNV-NY99.

Dans un premier axe, nos objectifs sont d'investiguer le rôle fonctionnel de la protéine virale sNS1 sécrétée dans le milieu extracellulaire au cours de l'infection par le WNV. Dans ce cadre, nous souhaitons produire la protéine sNS1 hexamérique correspondant à la souche méditerranéenne WNV-IS98-ST1. Parce qu'une réorganisation du cytosquelette est décrite lors de l'infection d'une cellule par les *Flavivirus*, nous avons évalué l'effet de l'interaction cellulaire de sNS1^{WNV-IS98} sur la dynamique du cytosquelette de cellules épithéliales, gliales ou neuronales. D'autre part, nous avons déterminé l'impact de la

protéine sécrétée sNS1 sur l'infection des cellules par le WNV. L'entrée mais aussi la cinétique de réplication et production virales ont été analysées. L'induction d'une réponse immunitaire innée des cellules gliales et neuronales humaines a également été analysée.

En parallèle, dans un second axe, nous avons pour but d'identifier de nouvelles molécules dirigées contre le WNV et ses déterminants protéiques. Nous disposons d'une banque de molécules thermostables (protéines α Rep), basées sur des petites protéines naturelles à motifs répétés, codé par des phages recombinants (Urvoas et al., 2010, 2012). La technologie du « phage display » a été employée pour réaliser un criblage en ciblant la glycoprotéine d'enveloppe E d'une part, et la protéine sNS1 d'autre part. Un premier objectif consiste à développer une plateforme de pseudotypage de la glycoprotéine d'enveloppe E du WNV. Cet outil, manipulable en conditions BSL2, permet ainsi d'éviter d'avoir recours au virus WNV sauvage (conditions BSL3) pour le criblage de la banque contre la protéine E. La protéine sNS1^{WNV-IS98} produite dans le premier axe a été utilisée comme cible lors du criblage des molécules α Rep. Ces molécules, mimant les anticorps mais pourvues de propriétés nouvelles, pourraient ainsi être appliquées dans le développement d'une approche de diagnostic rapide (détection de la protéine sNS1 dans le sang) mais aussi d'une approche thérapeutique antivirale (protéine d'enveloppe E et protéine NS1 ciblées) contre le WNV.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1

Etude fonctionnelle de la
protéine sNS1 du virus West Nile
au cours de l'infection

I. Production et purification de la forme sécrétée de la protéine NS1 du WNV

I.1 Contexte

Afin d'étudier les fonctions de la protéine sNS1^{WNV-IS98}, sa production et sa purification sont nécessaires. La protéine NS1 étant formée et correctement conformée après le clivage de la polyprotéine virale (au niveau de la région correspondant à NS1) par des protéases cellulaires, sa production en système recombinant est possible (Muller and Young, 2013). Cependant, comme NS1 est une glycoprotéine et que la glycosylation est nécessaire pour sa sécrétion, il est important de conserver, dans la stratégie de clonage, la séquence correspondant au 24 derniers aa de la protéine E au niveau de l'extrémité N-terminale de NS1 (Flamand et al., 1999; Macdonald et al., 2005; Somnuk et al., 2011). En effet, la séquence d'adressage au RE (compartiment cellulaire où a lieu la glycosylation) ainsi que le site de clivage sont situés dans cette séquence. De plus, afin de purifier par la suite la protéine sNS1^{WNV-IS98}, de précédentes études ont démontré que l'ajout d'une étiquette Histidine (6xHis) en fusion au niveau C-terminal de la séquence peptidique, n'altérerait en rien la bonne conformation et donc la fonctionnalité de la protéine sNS1 des *Flavivirus* (Macdonald et al., 2005; Somnuk et al., 2011).

La première étape de ce projet consistait donc à cloner le gène codant la protéine NS1 du virus West Nile (souche IS98-ST1) afin de l'exprimer en système mammifère dans le but de respecter le statut de glycosylation de la protéine naturelle synthétisée au cours de l'infection par WNV. La protéine sNS1^{WNV-IS98} recombinante devait ensuite être purifiée afin de pouvoir étudier ses fonctions et interactions *in vitro* dans nos modèles cellulaires.

I.2 Matériel et méthodes

a. Cellules

Les cellules HEK-293T (ATCC® CRL-3216™) étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Gibco) avec 10% de

sérum de veau fœtal, SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Pour la production de sNS1, 500µg/ml de G418 était ajouté au milieu de culture lors du passage précédent l'ensemencement des cellules.

b. Constructions plasmidiques

Le gène codant la protéine NS1 du WNV (souche IS-98-ST1) a été cloné en fusion avec une étiquette Histidine (6x-His) à l'extrémité C-terminale (**Figure 46**). Une séquence de type « linker » (Glycine-Sérine-Glycine) a été ajoutée entre le gène *NS1* et l'étiquette 6xHis afin de conférer une flexibilité à l'étiquette 6x-His et de ne pas altérer la conformation et l'oligomérisation de la protéine NS1. Au niveau N-terminal, les 72 derniers nucléotides du gène *E*, correspondant au 24 aa de la polyprotéine virale situés immédiatement en amont de la séquence de la protéine NS1 ont été conservés car ils portent la séquence d'adressage de NS1 au RE et le site de clivage par une protéase cellulaire. Des sites de restriction ont été ajoutés aux extrémités N- et C-terminales avec respectivement un site BamHI et un site XhoI. L'ensemble de ces modifications a été ajouté par PCR à l'aide des amorces suivantes : amorce sens, 5' **GGATCCAATACGGAATTCATGCAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTCAAGCTTGCG** 3' et amorce anti-sens 5' **CTCGAGTCACTAGTGGTGATGGTGATGATGGCCGCTTCCAGCATTAC TTGTGACTGCACG** 3'. Le fragment obtenu a été inséré par ligation dans le vecteur pBSK, préalablement linéarisé par l'enzyme EcoRV, puis le fragment d'intérêt a été récupéré par digestion enzymatique BamHI-XhoI. Enfin, ce fragment a été cloné dans le vecteur d'expression en cellules de mammifères, pcDNA3.1, préalablement linéarisé par les enzymes de digestion BamHI et XhoI. Cette construction sera nommée pNS1^{WNV-IS98} dans la suite du manuscrit. Le vecteur vide pcDNA3.1 a été utilisé comme contrôle dans les expériences.

c. Production de la protéine sNS1 recombinante

Un jour avant la transfection, les cellules HEK-293T ont été ensemencées en boîtes de Petri (diamètre 100mm) à une densité de 4.10⁶ cellules par boîte en DMEM réduit en sérum (1% sérum). Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 10µg de plasmides (pNS1^{WNV-IS98} ou pcDNA3.1) avec de la Lipofectamine 2000 (Life Technologies). 6h post-transfection, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu DMEM 1% sérum et les cellules incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 3 jours. Le surnageant de culture a été récolté puis

filtré sur 0.2µm avant d'être stocké à +4°C jusqu'au moment de la purification. Du milieu DMEM 1% sérum a été ajouté sur les cellules pour incubation pendant 2 jours supplémentaires avant d'être récolté, filtré puis stocké comme précédemment.

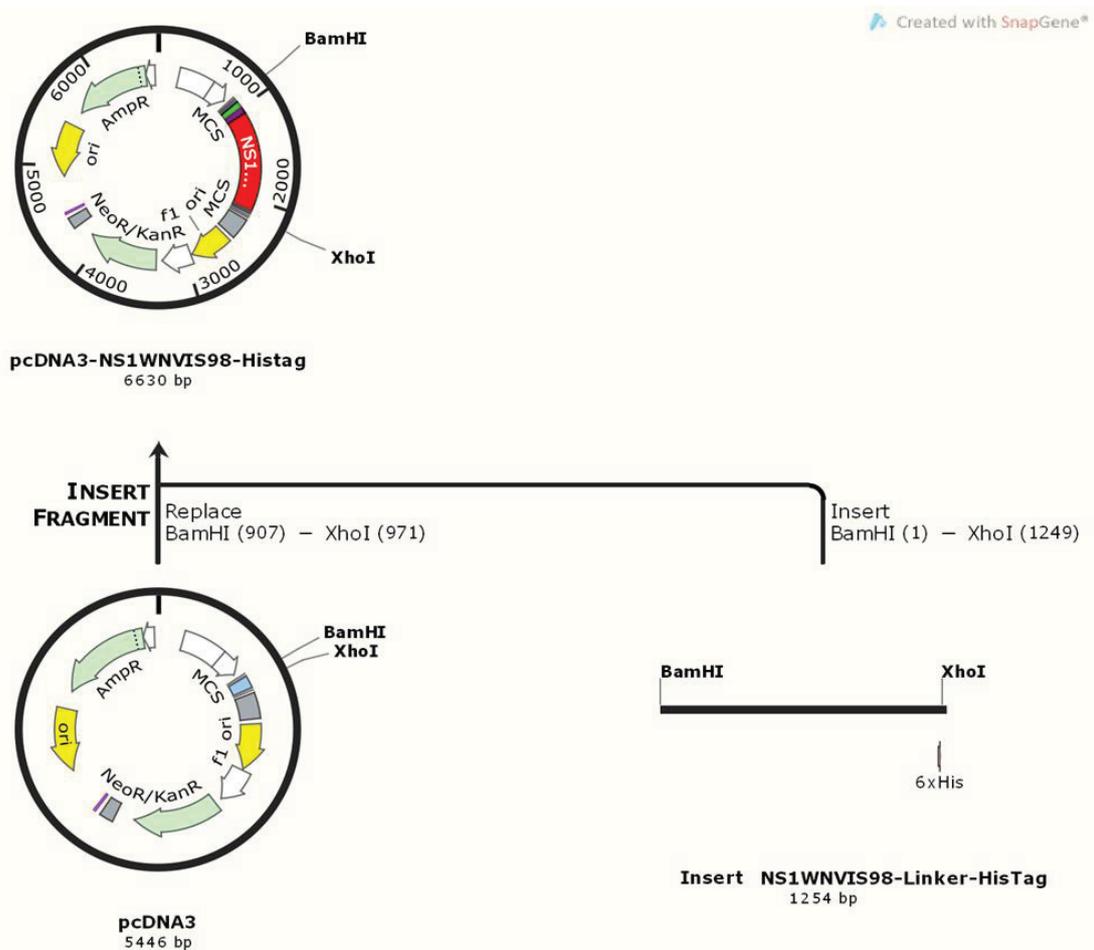


Figure 46 : Représentation schématique de la stratégie de clonage du gène *NS1* en vecteur d'expression mammifère.

d. Extraction des protéines totales

Afin d'extraire les protéines totales intracellulaires, les cellules ont été trypsinées, récoltées puis centrifugées à 400 g avant d'être stockées (culot sec) à -20°C jusqu'à extraction des protéines. Pour l'extraction, le culot cellulaire est repris dans 0,5-1 ml de tampon de lyse RIPA (NaCl 100 µM, Tris-HCl pH7,4 20 mM, EDTA 1 mM, désoxycholate de sodium 0,5%, SDS 1%).

e. Western Blot

Les protéines totales extraites sont additionnées de tampon Laemmli 5X (avec ou sans β -Mercaptoéthanol) puis chauffées à 95°C pendant 5 min afin d'être dénaturées. Les échantillons ont été séparés sur gel SDS-PAGE, 10% polyacrylamide. La migration des protéines s'effectue à voltage constant de 110V dans du tampon de migration dans un système Protean 3TM (Bio-Rad). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Le transfert s'effectue dans une cassette du système TransBlot (Bio-Rad) 2,5A, 25V, 10 min. Les sites non spécifiques des membranes ont été saturés en incubant les membranes pendant 1h dans une solution (TNT) contenant 5% de lait écrémé. Puis les membranes ont été incubées avec un anticorps primaire de souris dirigé contre l'étiquette Histidine (penta His antibody, Qiagen) dilué dans du TNT contenant 1-2% de lait écrémé sur la nuit à +4°C, sous agitation. Les membranes sont ensuite lavées par des bains successifs de TNT puis incubées 1h sous agitation avec l'anticorps secondaire, conjugué à la peroxydase, dirigé contre l'anticorps primaire (anti-IgG de souris, HRP, Sigma-Aldrich). Après minimum 3 lavages au TNT, les membranes ont été révélées à l'aide du kit SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) et des systèmes ChemiDoc (BioRad) ou Cawomat.

Dans le but d'observer la forme dimérique de la protéine NS1, certains échantillons ont été additionnés de tampon Laemmli puis déposés sur gel sans l'étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min avant la migration.

La détection de la protéine sNS1 dans le surnageant de culture avant ou après purification a été réalisée en ajoutant du Laemmli ne contenant pas de β -Mercaptoéthanol (conditions non réductrices) et sans l'étape de dénaturation de 5 min à 95°C avant la migration. L'anticorps primaire utilisé était un anticorps de souris dirigé contre l'étiquette Histidine ou un anticorps de souris spécifique de la protéine NS1 des *Flavivirus* (ab214337, Abcam). L'anticorps secondaire était dirigé contre l'anticorps primaire (anti-IgG de souris, HRP, Sigma Aldrich).

Les anticorps utilisés, leur référence et leur dilution sont listés dans le **Tableau 5**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-penta His	Souris	Penta His Antibody / Qiagen	1/2000
Anti-NS1 Flavivirus	Souris	ab214337/Abcam	1/1000
Anti-IgG de souris couplé HRP	Chèvre	A5906/Sigma-Aldrich	1/10000
Anti-β-actin couplé HRP	Souris	A3854/Sigma-Aldrich	1/75000

Tableau 5 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour la détection de la protéine NS1 au niveau intracellulaire et de la protéine sNS1 non purifiée dans le surnageant de culture ou purifiée.

f. Immunofluorescence indirecte

Pour détecter l'expression de la protéine NS1^{WNV-IS98} au niveau intracellulaire, les cellules transfectées ont été perméabilisées au PBS 0,5% Triton X100 pendant 15 min à TA. La saturation a été réalisée au PBS 5% SVF pendant 30 min à TA. La protéine sNS1^{WNV-IS98} a été marquée à l'aide d'un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine NS1 des *Flavivirus*, dilué dans du PBS 0,1% Triton X100 puis incubé sur la nuit à +4°C. Le lendemain, après 3 lavages de 5 min au PBS 0,1% Triton X100, les cellules ont été incubées pendant 1h à température ambiante (TA), avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué au fluorochrome AlexaFluor 488 dans du PBS 0,1% Triton X100. Les cellules ont ensuite été lavées 3x 5 min avec du PBS 0,1% Triton X100 puis incubées pendant 10 min avec du 4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dihydrochloride (DAPI), dilué au 1/1000 dans du PBS 0,1% Triton X100, afin de marquer les noyaux. Les observations ont été faites au microscope à fluorescence inversée Axiovert 135 (Zeiss). Les anticorps utilisés pour les marquages immunofluorescents ainsi que leur dilution respective sont listés dans le **Tableau 6**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-penta His	Souris	Penta His Antibody/Qiagen	1/500
Anti-IgG de souris – AlexaFluor 488	Chèvre	A11029/Invitrogen	1/500

Tableau 6 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine NS1^{WNV-IS98} par immunofluorescence indirecte.

g. Purification de la protéine sNS1 recombinante

L'ensemble du protocole de purification de la protéine sNS1^{WNV-IS98} a été réalisé en respectant des conditions non dénaturantes (natives). Le surnageant contenant la protéine sNS1 a été mélangé à un volume égal de tampon d'équilibrage (phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM en PBS avec imidazole 10 mM ; pH 7,4). Le mélange contenant la protéine sNS1 a ensuite été passé sur colonne (Pierce Centrifuge Column, Thermo Scientific), préalablement chargée avec 2ml de solution contenant de la résine HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific) et équilibrée avec le tampon d'équilibrage. Puis, la résine contenue dans la colonne a été lavée intensivement avec un tampon de lavage (PBS avec imidazole 25 mM ; pH 7,4). Enfin, l'élution de la protéine sNS1, à partir de la résine, a été réalisée avec le tampon d'élution (PBS avec imidazole 250 mM ; pH 7,4) (**Figure 47**).

L'éluât a été dialysé sur la nuit, à +4°C, contre du PBS 1X en utilisant le système SnakeSkin avec une taille de pores de 7kDa (Thermo Scientific). La protéine sNS1^{WNV-IS98} purifiée a ensuite été dosée puis stockée à -80°C, sous forme d'aliquots, jusqu'à utilisation.

Le même protocole a été réalisé sur le surnageant contrôle issu de la culture de cellules HEK-293T transfectées avec le vecteur vide pcDNA3.1. Ce surnageant contrôle purifié sera nommé Ctrl-pcDNA3.1 dans la suite du manuscrit.

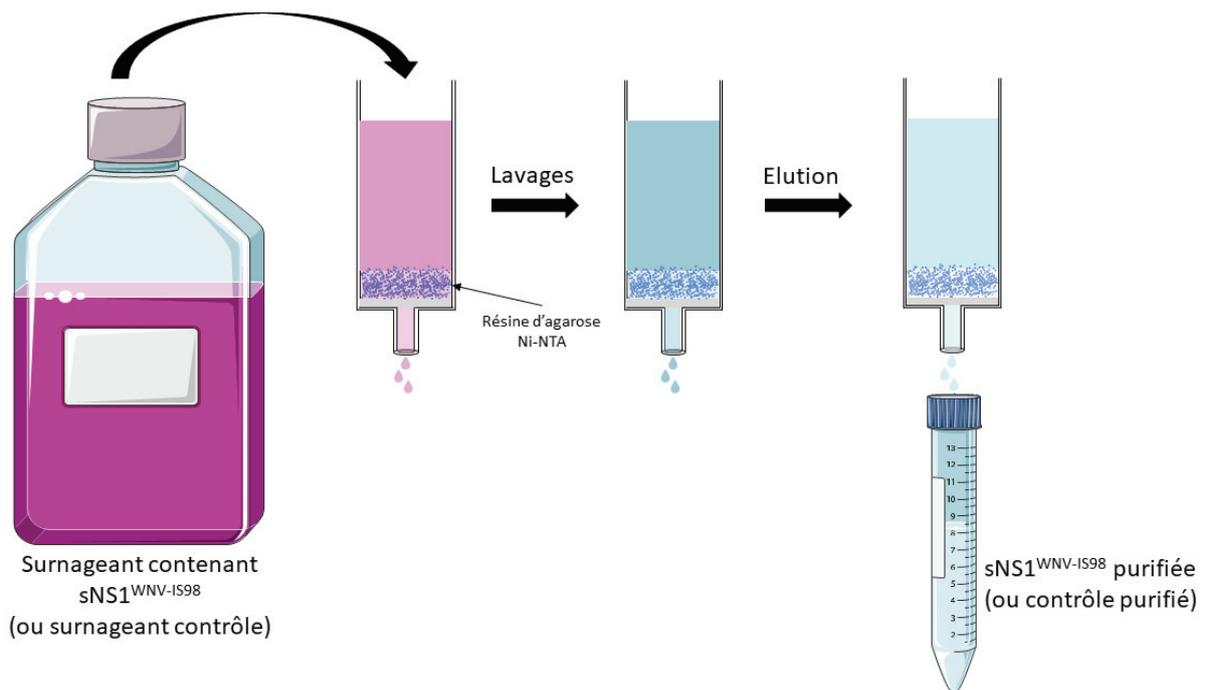


Figure 47 : Schéma d'illustration de la purification de la protéine sNS1^{WNV-IS98} avec la résine d'agarose Ni-NTA sur colonne. Le surnageant de culture contenant la protéine sNS1^{WNV-IS98} (ou le surnageant contrôle) est mélangé à un volume égal de tampon d'équilibration avant d'être passé sur la colonne contenant la résine d'agarose Ni-NTA. La résine d'agarose retenant la protéine sNS1^{WNV-IS98} est ensuite lavée plusieurs fois avant l'éluion permettant de récupérer la protéine purifiée (ou le Ctrl^{pcDNA3.1}).

h. Dosage de la protéine sNS1^{WNV-IS98}

La quantification de la protéine sNS1^{WNV-IS98} purifiée, présente dans l'éluât, a été réalisée par la méthode de Bradford. Le réactif Protein Assay Dye Reagent (#5000006, BioRad) a été utilisé selon les recommandations du fabricant pour la réalisation d'un dosage de type microassay en microplaque. L'absorbance a été lue dans un lecteur de plaque de type Victor (Perkin Elmer).

i. Microscopie électronique

La protéine sNS1 purifiée a été préparée sur grille constitué d'un film de carbone évaporé sur une feuille de mica avec une coloration négative à l'acétate d'uranyle. L'observation a été faite à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL 10CX II 100kV.

I.3 Résultats

I.3.1 Production de la protéine sNS1^{WNV-IS98}

L'expression de la protéine NS1 du WNV (souche IS98) dans les cellules HEK-293T transfectées avec la construction plasmidique pNS1^{WNV-IS98} a été vérifiée par Western Blot et par immunofluorescence indirecte. En Western Blot, dans les échantillons non chauffés, on observe majoritairement la forme dimérique de la protéine NS1 du WNV (100 kDa) tandis que dans les échantillons chauffés seul le monomère (50-52 kDa) est détecté (**Figure 48**). Ceci traduit la nécessité d'une dénaturation importante par la chaleur pour casser les fortes liaisons covalentes de l'homodimère de NS1. Dans les échantillons contrôles (pcDNA3.1) aucune bande n'est détectée à la taille correspondant à NS1 (**Figure 48**).

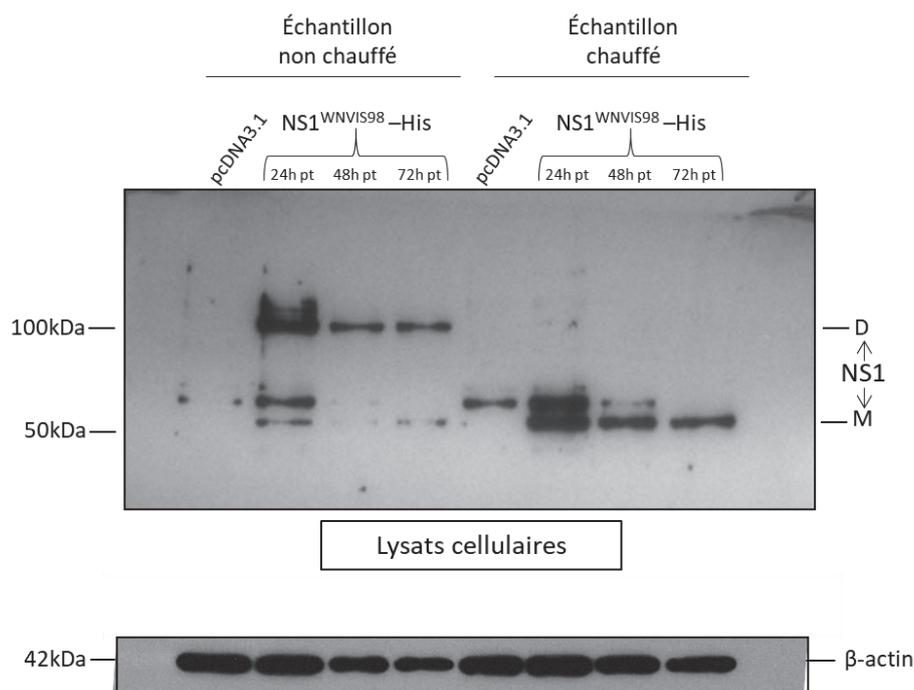


Figure 48 : Expression de la protéine NS1^{WNV-IS98} dans les cellules HEK-293T transfectées avec la construction pNS1^{WNV-IS98}. La détection de la protéine sur la membrane a été réalisée à l'aide de l'anticorps primaire de souris dirigé contre l'étiquette Histidine (anti-His). La détection de l'actine-β comme contrôle de dépôt a été réalisée à l'aide de l'anticorps dirigé contre cette forme de l'actine (anti-β-actin-HRP). D = Dimère ; M = Monomère.

Nous avons également détecté l'expression de NS1^{WNV-IS98} par immunofluorescence dans des cellules HEK-293T transfectées avec le plasmide pNS1^{WNV-IS98} (**Figure 49**). Ainsi, ces résultats confirment d'une part, l'expression de la protéine NS1 codée par le plasmide pNS1^{WNV-IS98} en système mammifère et d'autre part, la conformation correcte de la protéine permettant sa dimérisation. Dimérisation décrite comme la forme fonctionnelle de la protéine NS1 au niveau intracellulaire.

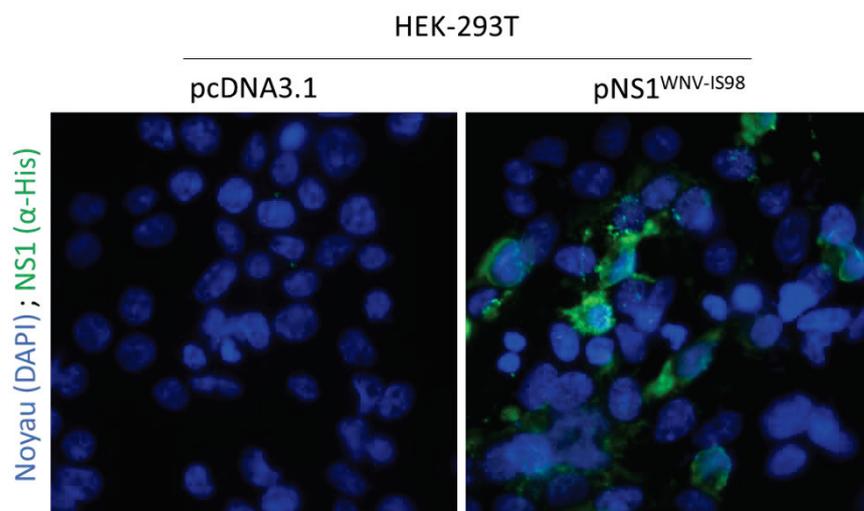


Figure 49 : Observation de l'expression de NS1^{WNV-IS98} en HEK-293T par immunofluorescence indirecte. La protéine NS1 du WNV a été détectée par immunomarquage dans les cellules HEK-293T, 24h après transfection.

L'expression sous forme dimérique de la protéine NS1^{WNV-IS98} dans les cellules transfectées par la construction pNS1^{WNV-IS98} est confirmée. Cependant, il était nécessaire de vérifier la sécrétion de la forme sNS1 dans le surnageant de culture afin de la purifier pour étudier ensuite ses fonctions. La sécrétion de la protéine NS1 (forme sNS1) dans le surnageant de culture a été suivi au cours du temps (24, 48 et 72h post-transfection).

La forme sNS1^{WNV-IS98} est détectée par Western Blot dans le surnageant des cellules HEK-293T exprimant la protéine NS1^{WNV-IS98}. De plus, on observe une augmentation de la quantité de sNS1^{WNV-IS98} présente dans le surnageant en fonction du temps, avec un pic d'intensité à 72h post-transfection (**Figure 50**). Ainsi, la protéine NS1 exprimée dans les cellules transfectées, est également sécrétée dans le surnageant de culture. Ces résultats permettent de valider notre construction pNS1^{WNV-IS98} pour la production de sNS1 dans le

surnageant de culture en vue de la purifier grâce à la présence de l'étiquette Histidine. De plus, l'observation d'une plus importante quantité de sNS1 dans le milieu de culture 72h post-transfection (par rapport aux temps 24h et 48h) nous a permis de définir ce temps comme le plus adéquat pour la récolte du surnageant. La spécificité du signal détecté pour la protéine NS1 est vérifiée par l'absence de signal dans le surnageant provenant de cellules transfectées avec le vecteur vide (pcDNA3.1) 72h post-transfection. Ces résultats confirment également la sécrétion de la protéine NS1 en l'absence des autres protéines virales, conformément à la littérature.

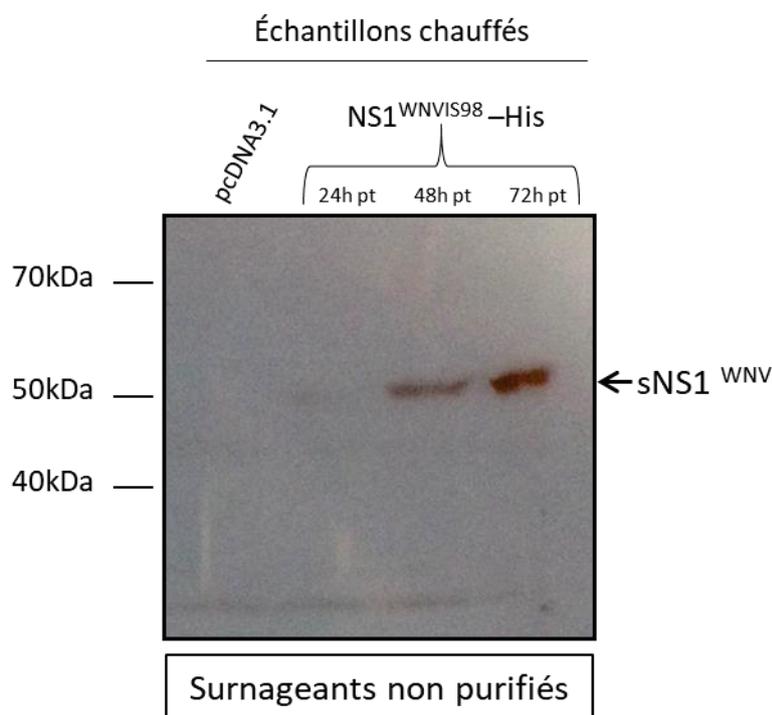


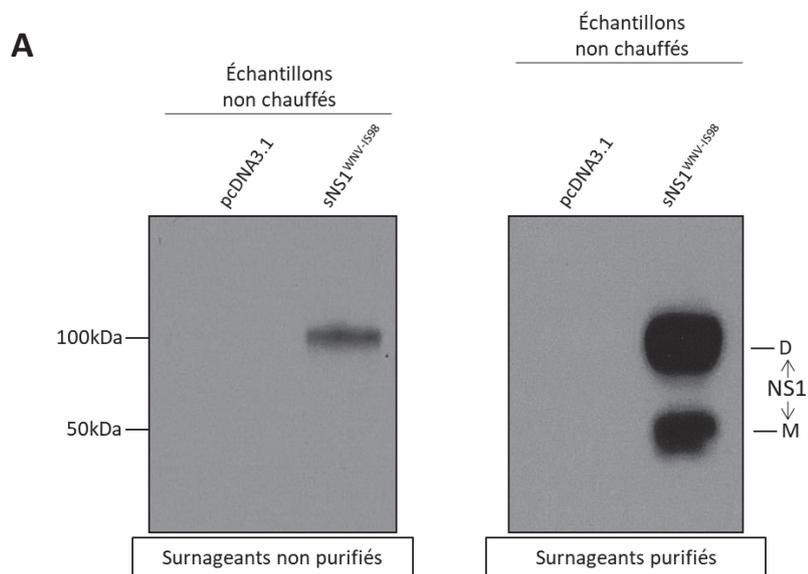
Figure 50 : Sécrétion de la protéine NS1 au cours du temps dans le surnageant de culture de cellules HEK-293T transfectées avec la construction pNS1^{WNV-IS98}. La forme sécrétée sNS1^{WNV-IS98} a été détectée dans le surnageant de culture à l'aide de de l'anticorps primaire dirigé contre l'étiquette Histidine (anti-6xHis).

1.3.2 Purification de la protéine hexamérique sNS1^{WNV-IS98}

L'expression et la sécrétion de la protéine NS1 du virus West Nile étant confirmées dans notre système recombinant, nous souhaitons purifier la protéine sNS1^{WNV-IS98}. L'Histidine présente une forte affinité pour le Nickel (Ni) et peut ainsi se fixer sur des billes

d'agarose couplées au Nickel (résine d'agarose Ni-NTA). La protéine recombinante sNS1^{WNV-1S98} contenant une étiquette Histidine à l'extrémité C-terminale pourrait ainsi être retenue par affinité sur les billes d'agarose couplées au Nickel. Afin de vérifier cela, nous avons analysé par Western Blot la présence de sNS1 dans des échantillons avant et après purification (**Figure 51 A-B**).

La protéine sNS1 est détectée dans les deux échantillons, ce qui confirme la capacité de fixation de la protéine sur la résine d'agarose couplée au Nickel. De plus, nous constatons que la protéine sNS1 est présente en quantité plus importante dans l'échantillon purifié que dans l'échantillon avant purification (**Figure 51 A-B**). L'éluion de la protéine sNS1 ayant lieu dans un volume très inférieur au volume de surnageant de départ, la protéine se retrouve ainsi concentrée. Cette concentration après éluion confirme l'affinité de la protéine recombinante pour la résine couplée au Nickel et donc la possibilité de purifier la protéine sNS1^{WNV-1S98} à partir de notre système de production. Aucune bande n'est détectée dans l'échantillon contrôle avant ou après purification, montrant la spécificité du signal observé par immunomarquage.



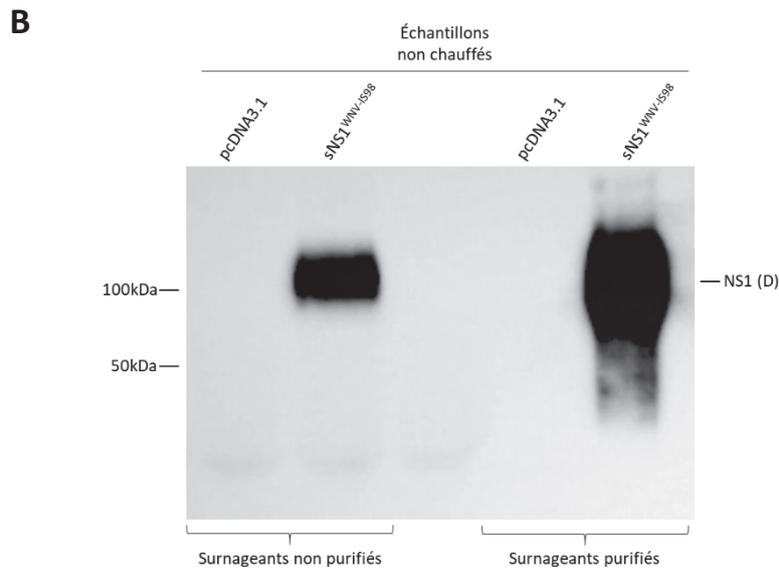


Figure 51 : Détection de la protéine sNS1^{WNV-IS98} avant et après purification. A, la protéine recombinante sNS1^{WNV-IS98} a été détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette 6xHis fusionnée à l'extrémité C-terminale. B, la protéine sNS1^{WNV-IS98} recombinante a été détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine NS1 des *Flavivirus*. D = Dimère ; M = Monomère. La migration a été réalisée en conditions non réductrices (sans β -Mercaptoéthanol).

Malgré la visualisation de la forme dimérique après purification, il était nécessaire de vérifier que la sNS1 produite dans notre système possédait une conformation hexamérique. En effet, la forme sécrétée sNS1 des *Flavivirus*, dont le WNV, est décrite comme hexamérique dans la littérature. Cet hexamère étant plus exactement un trimère de dimères et les liaisons entre chaque dimère étant faibles, il n'est pas possible d'observer la forme hexamérique sur gel SDS-PAGE (conditions dénaturantes). Cependant, cette forme est observable en microscopie électronique à transmission (MET). Nous avons alors analysé l'échantillon de sNS1^{WNV-IS98} purifiée de la sorte (**Figure 52**). Ceci dans le but de valider la conservation de la forme hexamérique, donc la forme native et fonctionnelle, de la protéine après purification. La sNS1^{WNV-IS98} visualisée par MET présente alors des formes et structures semblables à celles décrites dans la littérature pour sNS1 (**Figure 52**). Ces structures, de type « barrel shape », sont caractéristiques de la forme hexamérique de la protéine sNS1 des

Flavivirus et notamment du WNV. L'analyse par MET met ainsi en évidence une conformation hexamérique de la protéine recombinante sNS1^{WNV-IS98} purifiée. La méthode de purification employée, en conditions natives, permet donc de purifier et de concentrer la protéine sNS1^{WNV-IS98} sans affecter sa conformation.

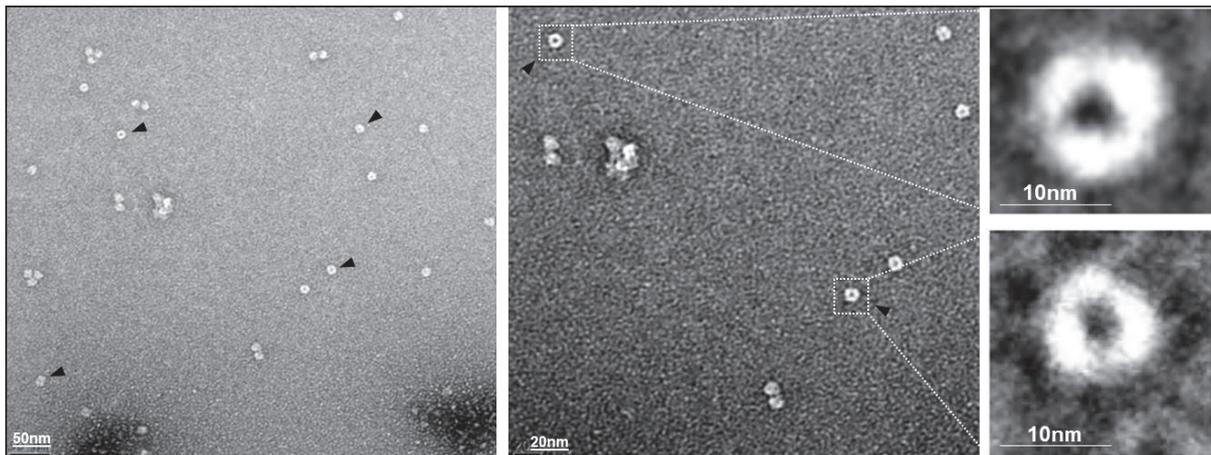


Figure 52 : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de la forme hexamérique de la protéine sNS1^{WNV-IS98}. La construction plasmidique pNS1^{WNV-IS98} transfectée dans des cellules mammifères permet ainsi l'expression sous forme dimérique et la sécrétion, sous forme hexamérique, de la protéine NS1^{WNV-IS98}. La forme sécrétée peut être purifiée par affinité pour le Nickel, via la présence d'une étiquette Histidine, sans affecter sa conformation. L'ensemble de ces résultats permettent de valider à la fois notre système de production mais aussi de purification de la protéine sNS1^{WNV-IS98} sous sa forme décrite comme fonctionnelle. L'obtention d'une protéine purifiée et correctement conformée était une étape essentielle pour l'étude fonctionnelle de ce déterminant du WNV. Images obtenues avec l'aide du Dr Pascal Fender, IBS, Grenoble.

II. La protéine sNS1^{WNV-IS98} interagit avec la cellule de manière dépendante du type cellulaire

II.1 Contexte

La protéine sNS1 des *Flavivirus* étant sécrétée au cours de l'infection dans le milieu extracellulaire, elle est capable d'interagir, entre autres, avec des cellules naïves (non infectées). Plusieurs travaux ont mis en évidence des interactions avec des cellules provenant d'hôtes différents, de types différents mais aussi d'origines tissulaires différentes (Alcon-LePoder et al., 2005; Avirutnan et al., 2007; Crook et al., 2014). Cette capacité d'attachement varie avec beaucoup d'amplitude suivant ces différentes propriétés cellulaires, avec également une grande diversité de fonctions (Alayli and Scholle, 2016; Alcon-LePoder et al., 2005; Avirutnan et al., 2007; Crook et al., 2014; Modhiran et al., 2015). Cependant, l'essentielle de ces études concerne la protéine sNS1 de DENV. C'est pourquoi, dans le cadre de notre étude fonctionnelle de la protéine sNS1 du WNV, nous avons souhaité faire une analyse comparative de l'interaction de sNS1 avec trois types cellulaires différents. Nous avons ainsi choisi différents modèles cellulaires tels que les cellules VeroE6 (cellules épithéliales de primate) et deux lignées cellulaires d'origine neurale, U87MG (astroglioblastome humain) et SH-SY5Y (neuroblastome humain). Le choix des deux lignées U87MG et SH-SY5Y est basée sur notre choix d'étudier le rôle de la forme sécrétée de la protéine NS1 au cours de l'infection de cellules du SNC. Le WNV étant un virus neurotrope et capable d'induire des lésions dans le SNC, ces modèles cellulaires nous ont semblés pertinents pour l'étude fonctionnelle de la protéine virale sNS1.

II.2 Matériel et méthodes

a. Cellules

Les cellules épithéliales de singe vert, VeroE6 (ATCC® CRL-1586™), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high

glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les cellules d'astroglioblastome humain, U87MG (CelluloNet, SFR Biosciences Lyon), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les cellules de neuroblastome humain, SH-SY5Y (CelluloNet, SFR Biosciences Lyon) étaient maintenues dans du milieu DMEM/F12 Nutrient Mix 1 :1 (GlutaMAX, Gibco) avec 2% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Attachement et internalisation de sNS1^{WNV-IS98} dans les cellules

5.10⁵ cellules (VeroE6, U87MG, SH-SY5Y) préalablement trypsinées (Trypsine-EDTA 0,2X) ont été ajoutées en plaques 96 puits à fond conique, puis centrifugées à 800 g pendant 5 min à +4°C. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 100 µl de PBS + sNS1 à une concentration de 10 µg/ml de sNS1^{WNV-IS98}. Un volume de resuspension équivalent de Ctrl-pcDNA3.1 a été utilisé comme contrôle. Les cellules ont ensuite été incubées 1h (attachement) à température ambiante ou 6h (internalisation) à 37°C, 5% CO₂. Après incubation, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 min à température ambiante (TA) avant immunomarquage de la protéine sNS1^{WNV-IS98} pour analyse en cytométrie en flux.

c. Analyse par cytométrie en flux

Pour l'étude comparative de l'attachement de sNS1^{WNV-IS98} à la surface des cellules, la protéine a été marquée avec l'anticorps primaire de souris anti-NS1 de *Flavivirus* pendant 1h, sur glace, sans perméabilisation des cellules dans du PBS 10% SVF. Pour la détection de la sNS1^{WNV-IS98} internalisée, les cellules ont été perméabilisées au PBS 0,1% Saponine pendant 15min sur glace. La protéine sNS1^{WNV-IS98} a ensuite été marquée avec l'anticorps primaire de souris anti-NS1 de *Flavivirus* pendant 1h, sur glace, dans du PBS 0,1% Saponine 10% SVF. Après incubation, dans les deux cas, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS puis, incubées sur glace avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorochrome Alexa 488. Enfin, après 3 lavages avec du PBS, les cellules ont été analysées au

cytomètre en flux (FACS Calibur) pour la détection de cellules positives pour sNS1^{WNV-IS98}. A noter qu'à chaque étape, les plaques contenant les cellules sont centrifugées 5 min à 800 g, +4°C, afin d'éliminer le surnageant. Les anticorps, leur référence ainsi que la dilution utilisée, sont listés dans le **Tableau 7**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-NS1 Flavivirus	Souris	ab214337/Abcam	1/250
Anti-IgG de souris AlexaFluor488	Chèvre	A11029/Invitrogen	1/500

Tableau 7 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine NS1^{WNV-IS98} par immunofluorescence indirecte pour l'analyse au cytomètre de flux.

II.3 Résultats

II.3.1 Interaction sNS1-cellule dépendante du type cellulaire

Nous avons dans un premier temps voulu vérifier la capacité d'interaction de la protéine sNS1^{WNV-IS98} avec la surface cellulaire mais aussi son internalisation par les trois différents types cellulaires, VeroE6, U87MG et SH-SY5Y.

Les différents types cellulaires ont été incubés avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} purifiée (10µg/ml) pendant 1h afin de comparer l'attachement de la protéine virale à la surface des cellules en fonction du type cellulaire. L'analyse par cytométrie en flux sur cellules non perméabilisées met en avant la détection de cellules positives pour la protéine sNS1 à leur surface (**Figure 53 A**). Néanmoins, les valeurs d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) ne sont pas significativement supérieures pour les cellules traitées avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport à celles traitées avec Ctrl^{pcDNA3.1} (**Figure 53 C**) (**Tableau 8**). Malgré cela, la tendance suggère que la protéine sNS1^{WNV-IS98} semble se fixer à la surface des cellules VeroE6 et SH-SY5Y, mais

pas à celle des cellules U87MG. En parallèle, le traitement des cellules avec sNS1 pendant 6h et l'analyse après perméabilisation mettent en avant la détection de cellules positives pour la protéine virale (**Figure 53 B**). La MFI est significativement supérieure lorsque les cellules VeroE6 et SH-SY5Y sont traitées avec sNS1 par rapport au contrôle (**Figure 53 D**) (**Tableau 8**). En revanche, les cellules U87MG ne présentent pas de marquage pour la protéine sNS1, ou de manière trop faible pour être significativement différent par rapport aux cellules traitées avec Ctrl^{pcDNA3.1}. La détection de sNS1^{WNV-IS98} après perméabilisation des cellules VeroE6 et SH-SY5Y traduit ainsi à la fois une internalisation et un attachement de la protéine à la surface de ces cellules. La protéine sNS1^{WNV-IS98} est alors capable d'interagir avec différentes cellules cibles mais de manière type dépendant, conformément à ce qui a déjà été mis en évidence. Ces résultats permettent d'identifier les cellules épithéliales et les cellules de neuroblastome (type neuronal) comme cibles cellulaires pour la protéine sécrétée sNS1 du WNV.

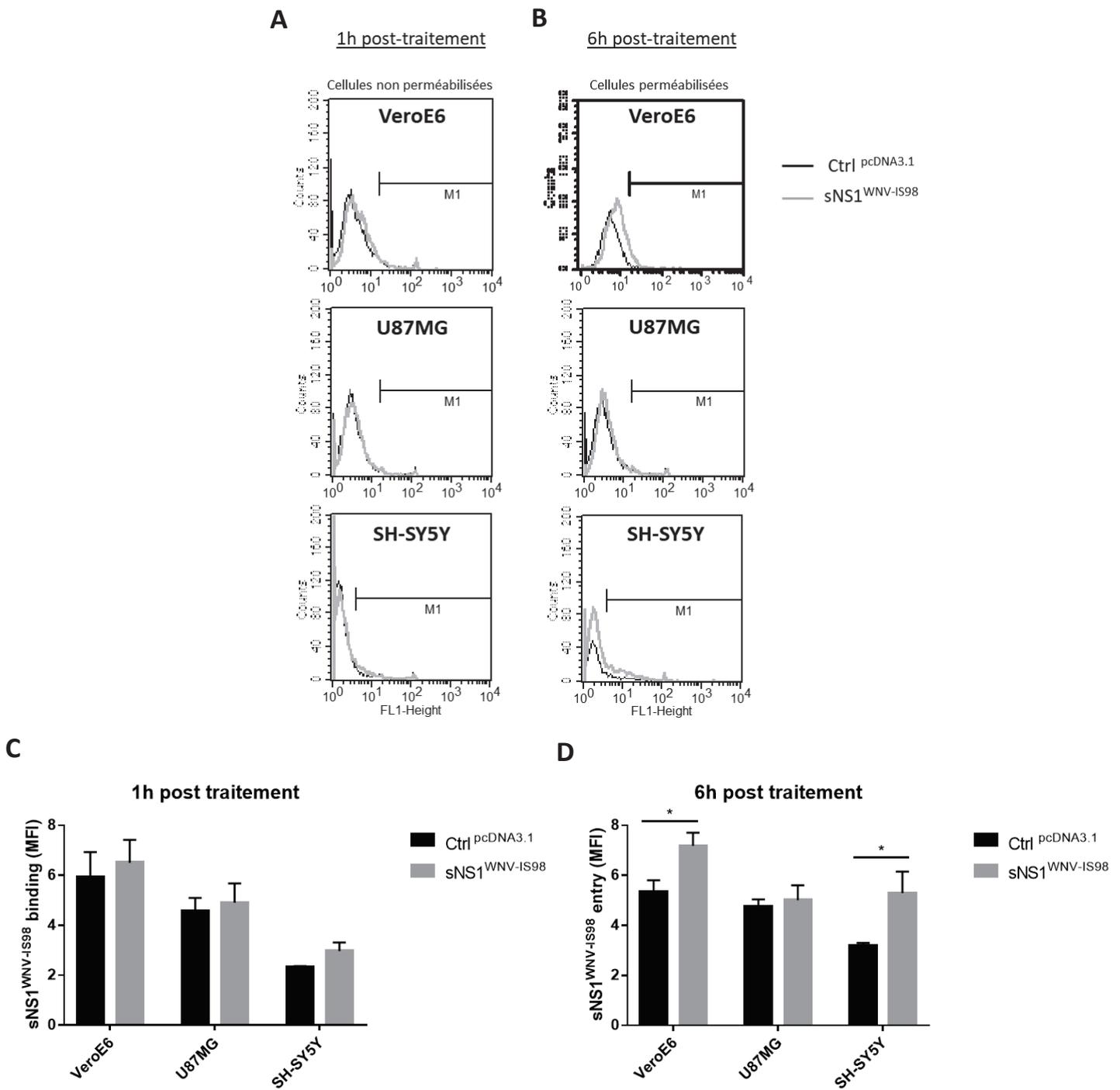


Figure 53 : La fixation et l'internalisation de sNS1^{WNV-IS98} sont dépendantes du type cellulaire. Analyse de cytométrie en flux de la fixation et l'internalisation cellulaire de la protéine sNS1^{WNV-IS98}. **A**, les différents types cellulaires ont été incubés avec 10µg/ml de sNS1^{WNV-IS98} (ou un volume équivalent de Ctrl_{pcDNA3.1}) pendant 1h puis analysées sans perméabilisation. **B**, les différents types cellulaires ont été incubés avec 10µg/ml de sNS1^{WNV-IS98} (ou un volume équivalent de Ctrl_{pcDNA3.1}) pendant 6h puis analysées après perméabilisation. **A et B**, les panels sont représentatifs de deux expériences indépendantes en duplicats. **C et D**, Représentations graphiques des valeurs d'intensité moyenne de fluorescence du traitement avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport au traitement avec Ctrl_{pcDNA3.1} pour chaque type cellulaire. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test Mann-Whitney (*, $p < 0,05$).

Type cellulaire	Description/origine	Intensité moyenne de fluorescence (MFI)		p-value
		Ctrl ^{pcDNA3.1} + Anti-NS1 Flavivirus	sNS1 ^{WNV-IS98} + Anti-NS1 Flavivirus	
1h post traitement				
VeroE6	Epithélium de rein de singe	5,9 ± 1	6,5 ± 0,9	0,49
U87MG	Astroglionblastome humain/Cerveau	4,6 ± 0,5	4,9 ± 0,8	0,89
SH-SY5Y	Neuroblastome humain/moelle osseuse	2,3 ± 0,0	3,0 ± 0,3	0,33
6h post traitement				
VeroE6	Epithélium de rein de singe	5,4 ± 0,4	7,2 ± 0,5	<0,05
U87MG	Astroglionblastome humain/Cerveau	4,7 ± 0,3	5,0 ± 0,6	0,69
SH-SY5Y	Neuroblastome humain/moelle osseuse	3,2 ± 0,1	5,3 ± 0,9	<0,05

Tableau 8 : La fixation et l'internalisation de sNS1^{WNV-IS98} varient selon le type cellulaire. Valeurs des intensités moyennes de fluorescence pour chaque type cellulaire et chaque condition. Les données représentent la moyenne ± SD de deux expériences indépendantes en duplicats (cf=> figure précédente). Les p-values ont été déterminées par un test Mann-Whitney après comparaison de la MFI des cellules traitées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} (+ anticorps anti-NS1) avec les cellules traitées avec le contrôle Ctrl^{pcDNA3.1} (+ anticorps anti-NS1).

III. La protéine sNS1^{WNV-IS98} induit un remodelage du cytosquelette dans les cellules épithéliales

III.1 Contexte

Au cours de l'infection virale, le cytosquelette subit des changements tels qu'une réorganisation et ou une déstabilisation dans les cellules. Ces modifications du cytosquelette ont été décrites suite à l'infection par des virus de familles, de genres et d'espèces différents, notamment par des *Flavivirus* tels que WNV ou DENV (Chen et al., 2004; Foo and Chee, 2015; Henry Sum, 2015; Taylor et al., 2011). Les interactions entre les virus et le cytosquelette de la cellule hôte, tels que les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires, sont impliquées dans les mécanismes moléculaires de détournement de la machinerie cellulaire au profit de l'infection virale (entrée, réplication, transport cellulaire, assemblage et sortie) (Foo and Chee, 2015; Taylor et al., 2011). Cependant, ces interactions et ces changements phénotypiques varient en fonction des virus et des types cellulaires. Par exemple, la protéine NS3 des virus Kunjin et JEV interagit avec le réseau de microtubules au cours de l'infection (Chiou et al., 2003; Ng and Hong, 1989). D'autre part, les microfilaments d'actine ont été mis en avant pour contribuer à l'entrée, la réplication et la production du virus DENV2 via des interactions avec la protéine d'enveloppe E du virus (Orozco-García et al., 2016; Wang et al., 2010; Yang et al., 2013). Enfin, lors d'une infection de cellules neuronales par WNV, la dynamique du cytosquelette d'actine et les voies de signalisations des Rho-GTPases sont modifiées, conduisant à un réarrangement du réseau d'actine (Fraisier et al., 2013). Cependant, l'ensemble des déterminants viraux impliqués dans ces mécanismes au cours de l'infection restent peu connus.

Dans ce contexte, la protéine NS1 du WNV (et des *Flavivirus* en général) représente un candidat intéressant. En effet, du fait des propriétés multifonctionnelles de cette protéine virale, nous souhaitons investiguer l'hypothèse d'un rôle dans la modification de la dynamique du cytosquelette. En particulier la forme sécrétée de la protéine NS1 du virus West Nile, sNS1. En effet, la protéine sNS1, sécrétée au cours de l'infection et interagissant

avec des cellules naïves, pourrait induire un remodelage du cytosquelette d'actine dans celles-ci afin de faciliter leur infection par le virus par la suite.

III.2 Matériel et méthodes

a. Cellules

Les cellules épithéliales de singe vert, VeroE6 (ATCC® CRL-1586™), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les cellules de neuroblastome humain, SH-SY5Y (CelluloNet, SFR Biosciences Lyon) étaient maintenues dans du milieu DMEM/F12 Nutrient Mix 1 :1 (GlutaMAX, Gibco) avec 2% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Impact de sNS1^{WNV-IS98} sur le cytosquelette de la cellule

Les cellules ont étéensemencées en Labtek traitées au collagène (LabTek CC2 4 ou 8 puits, Nunc). Les cellules VeroE6 ont étéensemencées à une densité de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/puits en Labtek 4 puits ou à une densité de $8 \cdot 10^4$ cellules/puits en LabTek 8 puits. Les cellules U87MG ont étéensemencées à une densité de $2 \cdot 10^5$ cellules/puits en LabTek 4 puits ou à une densité de $1 \cdot 10^5$ cellules/puits en LabTek 8 puits. Les cellules SH-SY5Y ont également étéensemencées à une densité de $2 \cdot 10^5$ cellules/puits en LabTek 4 puits ou à une densité de $1 \cdot 10^5$ cellules/puits en LabTek 8 puits. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec 10µg/ml de sNS1^{WNV-IS98} (ou un volume équivalent de Ctrl-pcDNA3.1 comme contrôle) puis fixée avec du paraformaldéhyde 4% à différent temps post-traitement. Enfin, les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires ainsi que la protéine sNS1^{WNV-IS98} ont été observés par immunofluorescence.

c. Immunofluorescence indirecte

Pour la détection des protéines au niveau intracellulaire, les cellules ont été perméabilisées au PBS 0,5% Triton X100 pendant 15 min à TA. La saturation a été réalisée au PBS 5% SVF pendant 30 min à TA. Les filaments intermédiaires ont été marqués à l'aide d'un anticorps primaire de lapin anti- α -tubuline. La protéine sNS1^{WNV-IS98} a été marquée à l'aide d'un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine NS1 des *Flavivirus*. Les anticorps primaires étaient dilués dans du PBS 0,1% Triton X100 puis incubés sur la nuit à +4°C. Le lendemain, après 3 lavages de 5 min au PBS ,1% Triton X100, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin (pour détecter la tubuline) conjugué à un fluorochrome AlexaFluor 633, avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris (pour détecter la sNS1^{WNV-IS98}) couplé au fluorochrome AlexaFluor 488 tandis que de la phalloïdine (couplée à la rhodamine) a été incubée pour marquer les microfilaments d'actine. Les cellules étaient incubées avec les anticorps secondaires, dilués dans du PBS 0,1% Triton X100, pendant 1h à TA protégées de la lumière. Les cellules étaient ensuite lavées 3x 5 min avec du PBS 0,1% Triton X100 puis incubées avec du 4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dihydrochloride (DAPI) pendant 10 min afin de marquer les noyaux. Enfin, après lavages au PBS, les LabTek étaient montées avec lamelles grâce au liquide de montage VectaMount AQ (Vector). Les observations ont été faites en microscopie confocale à l'aide d'un microscope Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) ou bien par microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope AxioVert 135 (Zeiss). Les anticorps, leur référence ainsi que la dilution utilisée, sont listés dans le (Tableau 9).

Anticorps/drogue	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-α Tubuline	Lapin	Ab15246/Abcam	1/250
Anti-NS1 Flavivirus	Souris	Ab214337/Abcam	1/250
Anti-IgG de lapin AlexaFluor633	Chèvre	A21070/Invitrogen	1/500
Anti-IgG de souris AlexaFluor488	Chèvre	A11029/Invitrogen	1/500
Phalloïdine - Rhodamine		R415/Invitrogen	1/500

Tableau 9 : Anticorps/drogue et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire du cytosquelette et de la protéine NS1^{WNV-IS98} par immunofluorescence indirecte.

III.3 Résultats

III.3.1 Remodelage du cytosquelette de cellules épithéliales induit par la protéine sNS1^{WNV-IS98}

III.3.1.1 La protéine sNS1^{WNV-IS98} induit un remodelage du réseau de microfilament d'actine

L'interaction entre la protéine virale sNS1^{WNV-IS98} et les cellules cibles étant vérifiée, nous avons ensuite voulu tester l'hypothèse d'un potentiel changement dans la structure du cytosquelette médié par sNS1^{WNV-IS98}. Pour cela, nous avons dans un premier temps traité des cellules épithéliales (VeroE6) avec la protéine purifiée et analysé la structure du réseau de microfilament d'actine à différents temps après traitement. Nous avons tout d'abord pu détecter la protéine sNS1^{WNV-IS98} fixée et/ou internalisée au niveau des cellules. Aucun marquage n'est détecté dans les cellules traitées avec Ctrl^{pcDNA3.1} (**Figure 54 A**). L'intensité du signal spécifique pour la protéine sNS1 étant la plus importante au bout de 6h d'incubation, cela nous a permis de corrélérer ces observations avec les résultats des analyses par cytométrie en flux. La protéine sNS1 est ensuite de moins en moins détectée au cours du temps. Ceci étant sans doute dû à sa dégradation par la cellule. De manière intéressante, la protéine sNS1 est encore détectable 24h après incubation, traduisant néanmoins une dégradation assez lente.

En parallèle, nous avons pu observer que le cytosquelette semble subir des changements d'organisation lorsque les cellules sont incubées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} par rapport aux cellules traitées avec le contrôle Ctrl^{pcDNA3.1}. En effet, à partir de 2h d'incubation et jusqu'à 8h nous avons constaté une déstabilisation de la structure du réseau d'actine dans la cellule (**Figure 54 B**). Le marquage fluorescent de l'actine filamenteuse, notamment sous forme de fibres de stress, diminue de façon importante dans une grande

proportion de cellules. On observe en particulier une diminution, allant jusqu'à l'absence, du marquage du réseau d'actine au niveau intracellulaire dans les cellules incubées avec la protéine virale (6h post traitement). L'actine semble même parfois se condenser aux extrémités de la cellule (**Figure 54 B**). Le changement phénotypique du cytosquelette des cellules se présente également avec un marquage ponctiforme de l'actine, caractéristique d'une dépolymérisation des microfilaments (2h, 6h et 8h post traitement). De plus, chaque cellule présentant ce phénotype d'altération des microfilaments d'actine possède un marquage positif pour la protéine sNS1^{WNV-IS98}. Néanmoins, ce remodelage du réseau d'actine par la protéine sNS1^{WNV-IS98} est transitoire. En effet, la fréquence d'observation des caractéristiques d'un remodelage dans les cellules est significativement la plus élevée après 6h d'incubations avec sNS1^{WNV-IS98} (**Figure 55**). A partir de 8h post traitement, on observe en majorité un phénotype non altéré, jusqu'à restauration complète à 24h (**Figures 54 B - 55**).

Ces résultats suggèrent que la forme sécrétée sNS1^{WNV-IS98} est à l'origine d'un remodelage transitoire du réseau de microfilaments d'actine dans des cellules épithéliales et ce, en l'absence d'infection par WNV. Cependant, nous ne pouvons pas déterminer s'il s'agit d'un rôle direct ou indirect de la protéine sNS1.

III.3.1.2 La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'induit pas d'altération du réseau de microtubules

La forme sNS1^{WNV-IS98} étant capable d'induire une déstabilisation transitoire des microfilaments d'actine, nous nous sommes ensuite intéressés à un autre constituant du cytosquelette, le réseau de microtubules. Ceci dans le but de définir si la protéine sNS1^{WNV-IS98} était à l'origine d'un remodelage global du cytosquelette ou d'un constituant spécifique. Nous avons donc traité les cellules VeroE6 avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} et analysé par immunofluorescence la structure du réseau de microtubules au cours du temps (**Figure 56**). Contrairement au réseau d'actine, nous n'avons pas observé d'altération ou de remodelage des microtubules au sein des cellules épithéliales incubées avec sNS1^{WNV-IS98}. En effet, aucune différence d'organisation du réseau n'est observée dans les cellules traitées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} par rapport au cellules traitées avec Ctrl^{pcDNA3.1}. A chacun des temps

post traitement, incluant les temps où le réseau d'actine est déstabilisé, les deux conditions présentent le même profil d'organisation des microtubules (**Figure 56**). Ces résultats suggèrent donc que la fixation et l'internalisation cellulaire de la protéine sNS1^{WNV-IS98} n'impactent pas le réseau de microtubules. Le remodelage du cytosquelette dans les cellules épithéliales, par la forme sécrétée de la protéine NS1, semble alors être spécifique du réseau de microfilaments d'actine.

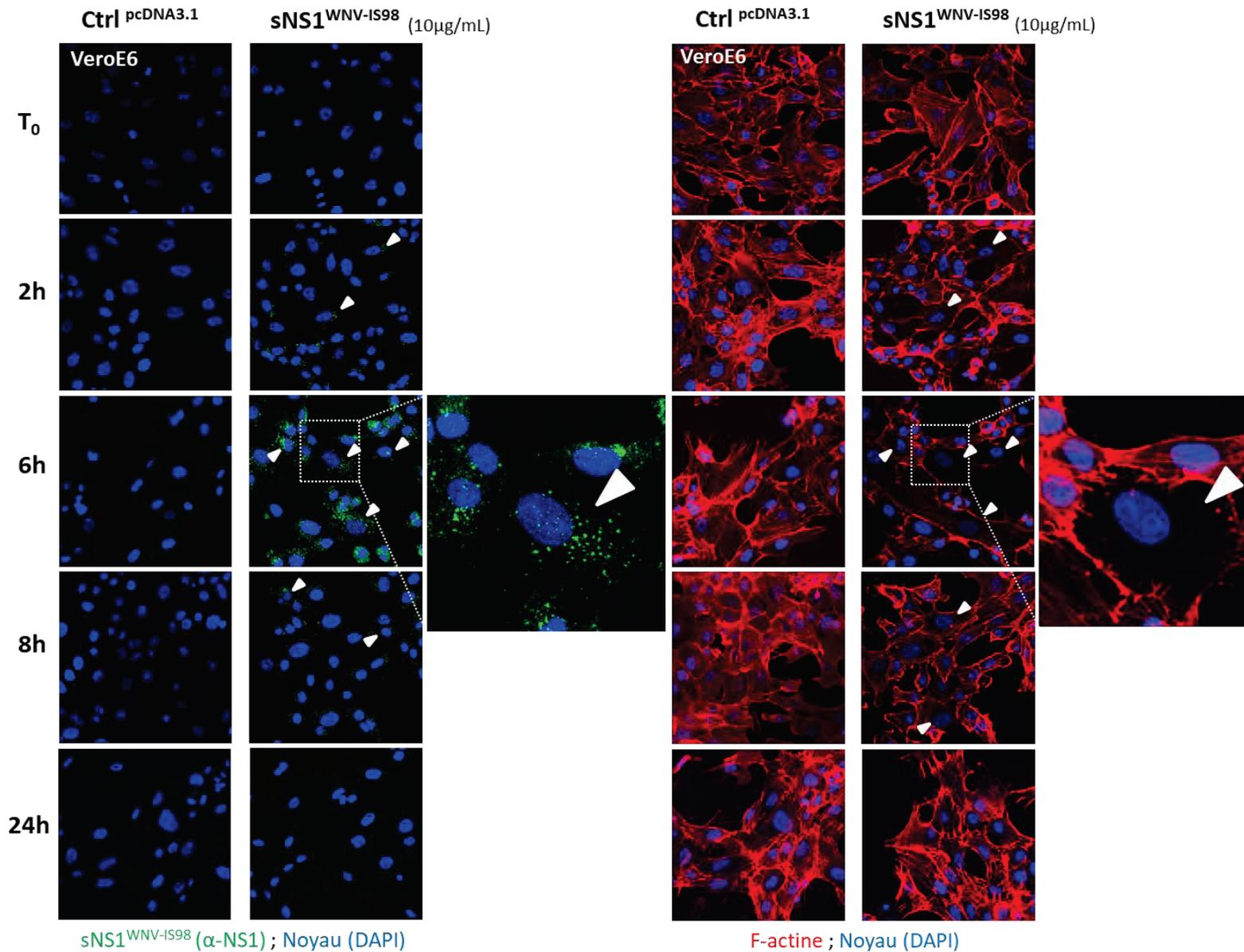


Figure 54 : Remodelage transitoire du réseau de microfilaments d'actine par sNS1^{WNV-IS98} dans des cellules épithéliales. Le réseau de microfilaments d'actine est déstabilisé (têtes de flèche), par rapport au contrôle, dans les cellules traitées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98}, à partir de 2h après traitement jusqu'à 8h. On note une importante diminution des fibres de

stress au sein des cellules traitées avec sNS1^{WNV-IS98}. L'effet est observable de manière plus fréquente 6h après traitement. Le réseau est ensuite restauré au bout de 24h. Les images sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes avec différents stocks de sNS1^{WNV-IS98} et de Ctrl^{pcDNA3.1} purifiés.

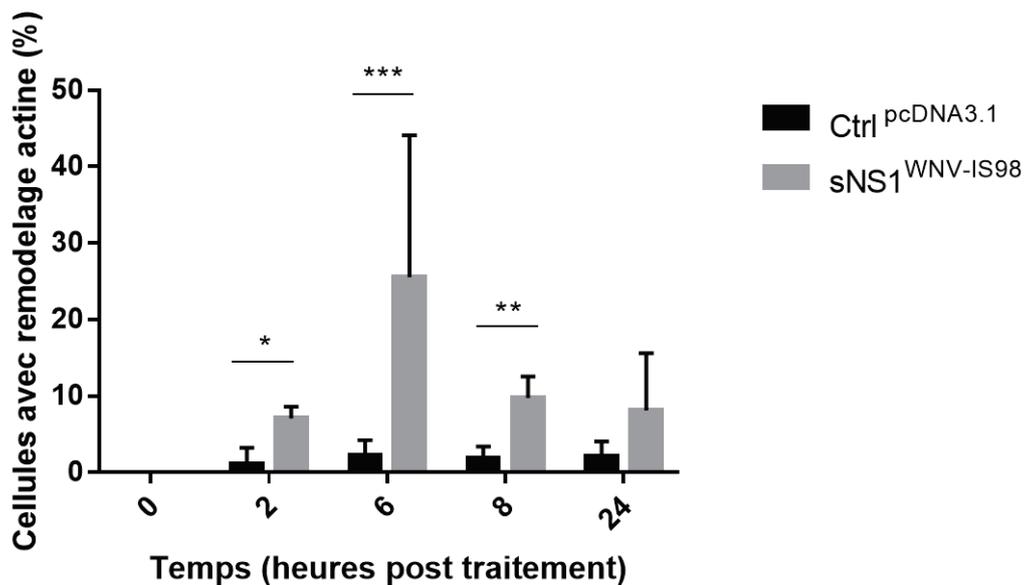


Figure 55 : Pourcentage de cellules présentant un remodelage du réseau de microfilaments d'actine après traitement avec sNS1^{WNV-IS98}. Les données sont issues d'une quantification du nombre total de cellules dans un champ de microscopie et du nombre de cellules présentant un remodelage du réseau. Plusieurs champs par conditions, provenant de trois expériences indépendantes ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ. Les *p*-Values ont été obtenues avec un test statistique Mann-Whitney (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

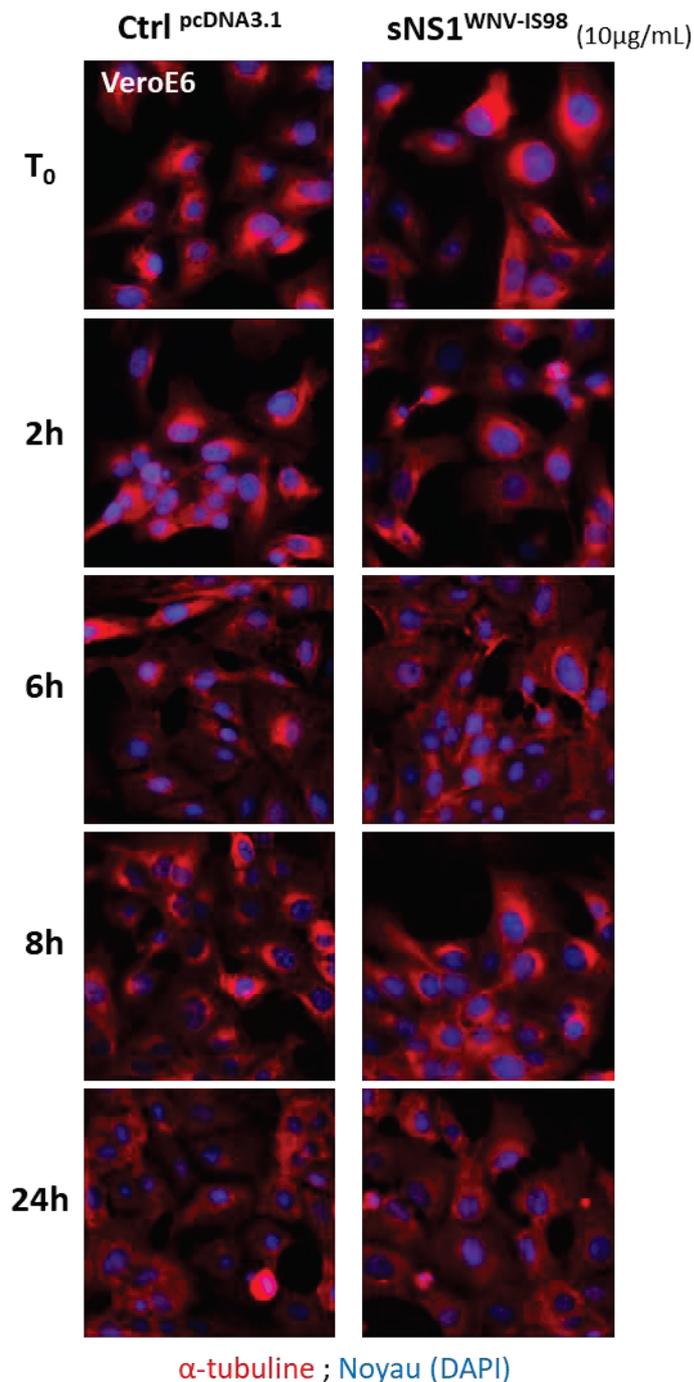


Figure 56 : sNS1^{WNV-IS98} n'induit pas de remodelage du réseau de microtubules dans les cellules épithéliales. On n'observe pas de changement d'organisation du réseau de microtubules dans les cellules traitées avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport aux cellules traitées avec Ctrl pcDNA3.1. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes avec différents stocks de sNS1^{WNV-IS98} et de Ctrl pcDNA3.1 purifiés.

III.3.2 Le cytosquelette des cellules neuronales n'est pas impacté par la protéine sNS1^{WNV-IS98}

III.3.2.1 Absence de remodelage du réseau de microfilaments d'actine dans les cellules neuronales

Notre étude visant également à étudier les fonctions de la protéine sNS1^{WNV-IS98} dans des cellules du SNC, nous avons réalisé le même type d'expériences sur les cellules neuronales SH-SY5Y. Nous avons aussi réalisé ces expériences sur les cellules U87MG, mais n'avons pas réussi à obtenir des images interprétables. Ceci étant dû à la faible capacité d'attachement de ces cellules sur le support en verre (LabTek), entraînant une perte trop importante de cellules au cours du protocole de traitement et d'immunomarquage. Les cellules SH-SY5Y ont ainsi été incubées avec 10µg/ml de sNS1^{WNV-IS98} (ou un volume équivalent de Ctrl^{pcDNA3.1}) et le cytosquelette d'actine a été analysé après marquage fluorescent. Contrairement à ce que nous avons observé en cellules épithéliales, les cellules neuronales SH-SY5Y ne présentent pas de déstabilisation de leur réseau d'actine (**Figure 57**). Nous constatons que le marquage spécifique des filaments d'actine, par la Phalloïdine conjuguée à la Rhodamine, ne présente pas de différence en termes de localisation ou d'autres changements phénotypiques entre les deux conditions de traitement. Notamment, on note l'absence d'une variation importante de la quantité de fibres de stress au cours du temps ou encore de signes de dépolymérisation des microfilaments dans les cellules traitées avec sNS1^{WNV-IS98}. Ces observations suggèrent alors que la protéine sNS1^{WNV-IS98} n'a aucune influence sur la dynamique et l'organisation du réseau de microfilaments d'actine dans les cellules neuronales SH-SY5Y. Le remodelage observé dans les cellules épithéliales semblerait donc être un effet spécifique de la protéine sNS1^{WNV-IS98} sur ce type cellulaire.

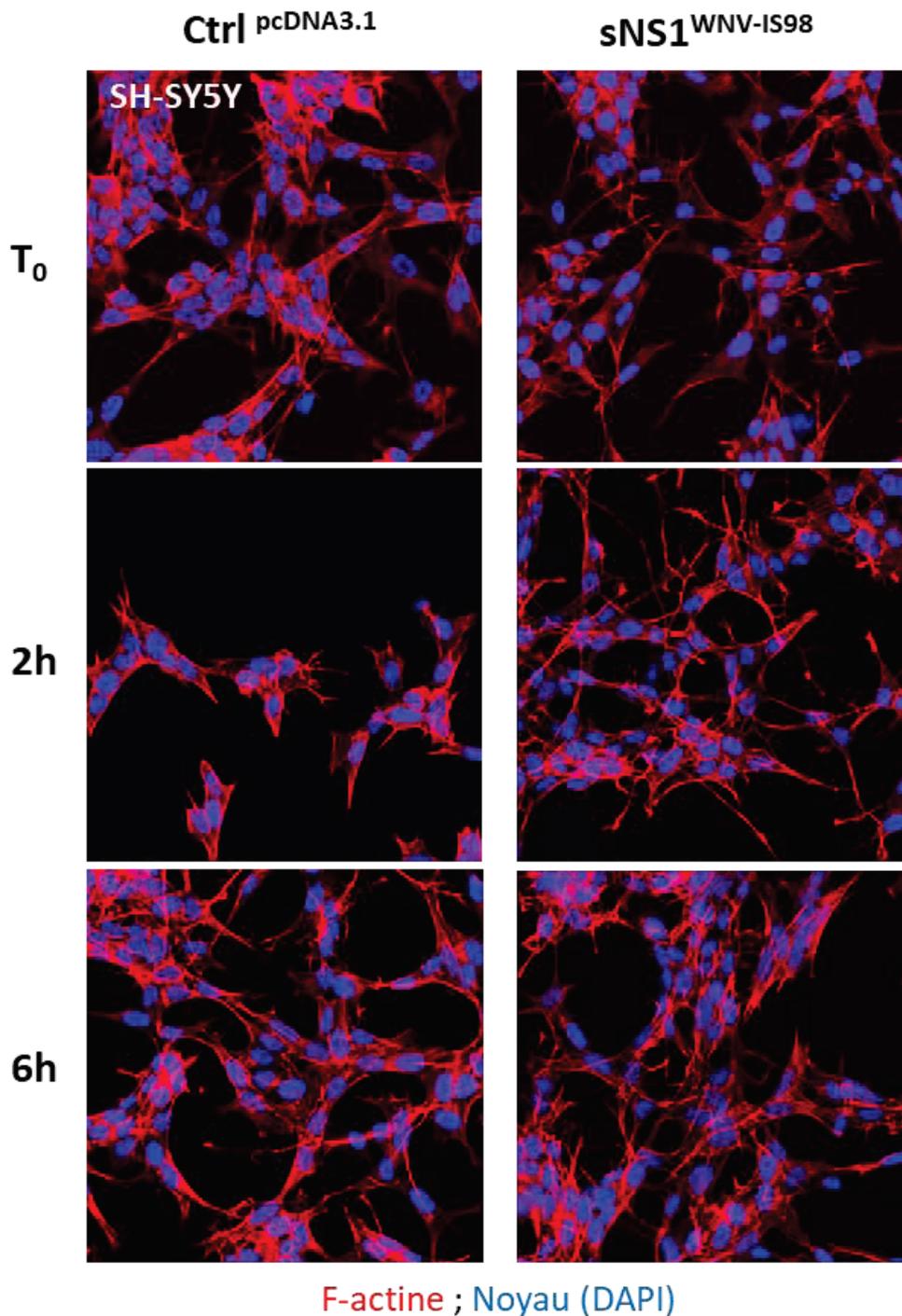


Figure 57 : La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'induit pas de remodelage du réseau de microfilaments d'actine dans les cellules neuronales. On n'observe pas de changement d'organisation du réseau de microfilaments d'actine dans les cellules traitées avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport aux cellules traitées avec Ctrl^{pcDNA3.1}. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes avec différents stocks de sNS1^{WNV-IS98} et de Ctrl^{pcDNA3.1} purifiés.

III.3.2.2 Le réseau de microtubules n'est pas impacté par l'interaction de sNS1^{WNV-IS98} avec les cellules neuronales

Comme pour les cellules épithéliales VeroE6, nous avons investigué l'effet que pouvait avoir l'interaction de la protéine sNS1^{WNV-IS98} avec les cellules SH-SY5Y sur le réseau de microtubules. Nous avons donc observé les microtubules après immunomarquage fluorescent dans les cellules traitées avec la protéines sNS1^{WNV-IS98}. Les cellules traitées avec Ctrl^{pcDNA3.1} représentent à nouveau la condition contrôle. A nouveau, nous n'avons pas observé de déstabilisation des microtubules aux différents temps d'incubation des cellules SH-SY5Y avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} par rapport au contrôle (**Figure 58**).

Ainsi, la protéine sNS1^{WNV-IS98} ne semble avoir aucune fonction au niveau du cytosquelette de microtubules dans les deux types cellulaires étudiés. En revanche, sNS1^{WNV-IS98} induit un remodelage transitoire du cytosquelette d'actine et ce, de manière spécifique aux cellules épithéliales. Néanmoins, à l'heure actuelle, nous ne pouvons déterminer les mécanismes moléculaires impliqués et donc s'il s'agit d'une fonction directe ou indirecte de la forme sécrétée sNS1 du WNV.

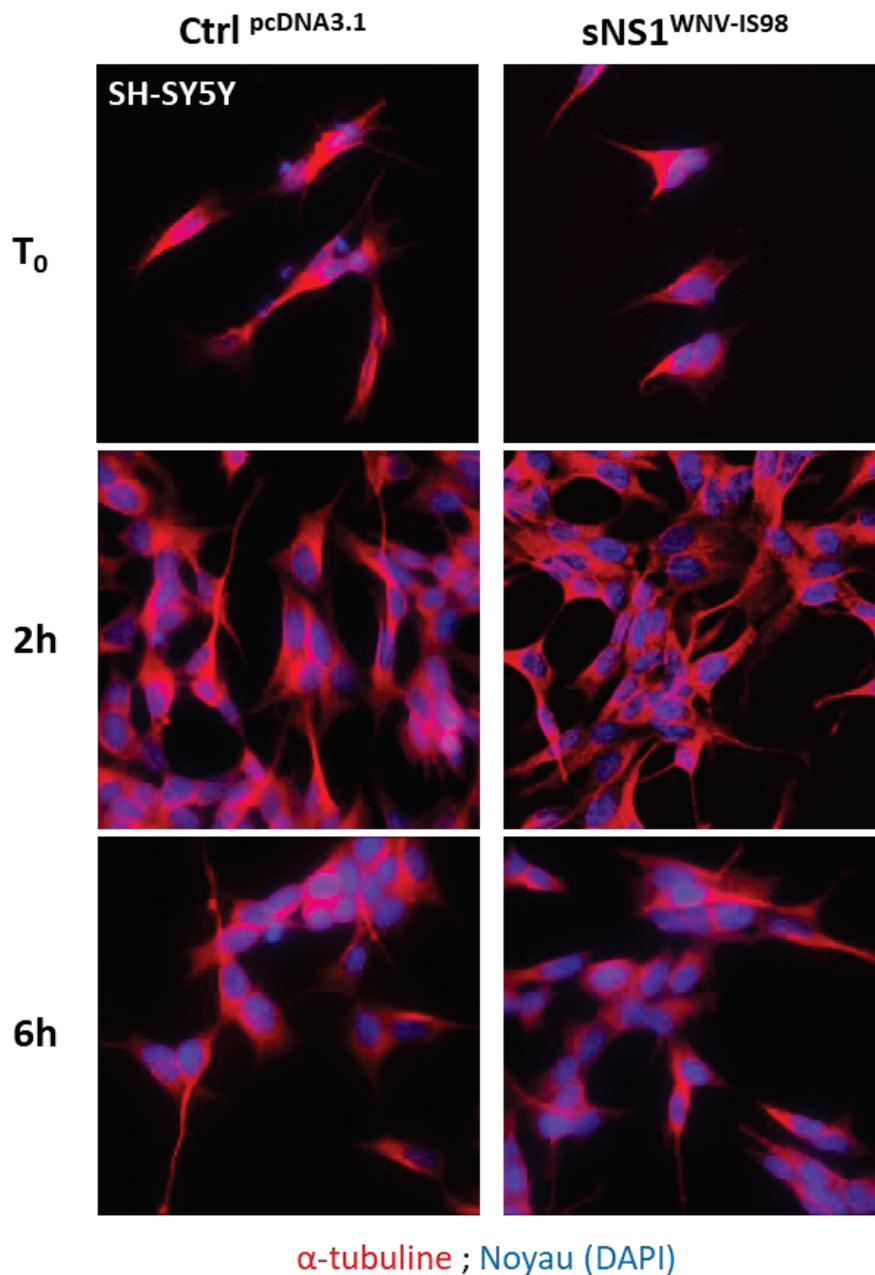


Figure 58 : La protéine SNS1^{WNV-IS98} n'induit pas de remodelage du réseau de microtubules dans les cellules neuronales. On n'observe pas de changement d'organisation du réseau de microtubules dans les cellules traitées avec SNS1^{WNV-IS98} par rapport aux cellules traitées avec Ctrl pcDNA3.1. Les images sont issues d'une expérience avec un stock de SNS1^{WNV-IS98} et de Ctrl pcDNA3.1 purifiés.

IV. La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas l'efficacité d'infection et la réplication du virus West Nile

IV.1 Contexte

La sécrétion d'une protéine virale au cours de l'infection par un *Flavivirus* peut amener à émettre l'hypothèse d'un rôle dans la fitness du virus. En effet, en termes de stratégie virale, la forme sécrétée sNS1 des *Flavivirus* peut impacter l'efficacité d'infection et de réplication du virus dans des cellules ayant au préalable interagi avec la protéine sNS1. De précédents travaux ont parfois mis en évidence, outre une capacité d'immunomodulation de la réponse de l'hôte par sNS1, un effet sur l'infection (Alayli and Scholle, 2016; Alcon-LePoder et al., 2005). D'un autre côté, d'autres travaux n'ont pas mis en évidence de variation dans la réplication virale en cellules traitées avec sNS1 (Crook et al., 2014; Liu et al., 2016). Ces données mettent en avant une nouvelle fois la diversité de rôles et fonctions de la protéine sNS1 des *Flavivirus* au cours d'infection, avec ce qui semble être une spécificité d'action dépendante des cellules cibles. De plus, ces études concernent essentiellement le virus DENV et sa protéine sNS1. Dans le cadre de nos travaux, nous avons mis en évidence une implication de sNS1 du WNV dans le remodelage des microfilaments d'actine en cellules épithéliales. Afin de mettre en lien ce phénotype observé avec la fitness du virus, nous avons réalisé des expériences en contexte infectieux. Afin de mettre en corrélation le remodelage du réseau d'actine, les cellules ont été prétraitées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} avant d'être infectées par WNV.

IV.2 Matériel et Méthodes

a. Cellules

Les cellules épithéliales de singe vert, VeroE6 (ATCC® CRL-1586™), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high

glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les cellules d'astroglioblastome humain, U87MG (CelluloNet, SFR Biosciences Lyon), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les cellules de neuroblastome humain, SH-SY5Y (CelluloNet, SFR Biosciences Lyon) étaient maintenues dans du milieu DMEM/F12 Nutrient Mix 1 :1 (GlutaMAX, Gibco) avec 2% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Evaluation de l'impact de sNS1^{WNV-IS98} sur l'efficacité d'infection (entrée) du WNV (Tests d'entrée du virus)

Les cellules VeroE6 ont étéensemencées à une densité de 1.10⁵ cellules par puits en plaque 48 puits (Nunc) en milieu DMEM 10% SVF (Gibco). Le lendemain, les cellules ont été incubées avec 10µg/ml de protéine sNS1^{WNV-IS98} (ou un volume équivalent de Ctrl^{pcDNA3.1}) pendant 5 heures à 37°C, 5% CO₂ puis infectées avec le virus WNV-IS98 à MOI 1 en milieu DMEM 2% SVF. Les cellules ont été incubées pendant 2h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être rincées deux fois avec du milieu frais puis ont été incubées pendant 12h à 37°C, 5% CO₂ dans du milieu DMEM 10% SVF. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant minimum 30 min. Les cellules infectées ont été détectées par immunomarquage et analyses en cytométrie en flux.

c. Analyse par cytométrie en flux

Pour la détection des cellules infectées par le WNV, les cellules ont été perméabilisées au PBS 0,1% Saponine pendant 15min sur glace. La protéine d'enveloppe E du WNV a ensuite été marquée avec l'anticorps primaire de lapin anti-E^{DIII} du WNV pendant 1h, sur glace, dans du PBS 0,1% saponine 10% SVF. Après incubation, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS 0,1% Saponine puis, incubées sur glace avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorochrome Alexa 488. Enfin, après 3 lavages avec du PBS, les cellules ont été analysées au cytomètre en flux (FACS Calibur) pour la détection de cellules positives pour la protéine E du WNV donc infectées par le virus. A noter qu'à

chaque étape, les plaques contenant les cellules sont centrifugées 5 min à 800 g, +4°C, afin d'éliminer le surnageant. Les anticorps, leur référence ainsi que la dilution utilisée, sont listés dans le **Tableau 10**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-E^{DIII} WNV (serum)	Lapin	ANSES	1/500
Anti-IgG de lapin AlexaFluor 488	Chèvre	A11034/Invitrogen	1/500

Tableau 10 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine d'enveloppe E du WNV par immunofluorescence indirecte.

d. Plaque assay

Les cellules VeroE6 ont étéensemencées à une densité de $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits en plaque 12 puits. Le lendemain, les cellules ont été incubées avec $10 \mu\text{g/ml}$ de protéine sNS1^{WNV-IS98} (ou un volume équivalent de Ctrl^{pcDNA3.1}) dans du milieu DMEM 2% SVF pendant 5h à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont ensuite été infectées avec 500 μl d'inoculum de WNV-IS98 dilué en série au 1/10 dans du DMEM 2% SVF pendant 2h à 37°C, 5% CO₂. Après deux rinçages avec du milieu frais, 1,5 ml d'agarose 1,5% ; MEM 1X 2% SVF ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont ensuite été incubées pendant trois jours à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde 4% sur la nuit. Le lendemain, l'agarose a été enlevé puis les cellules colorées au crystal violet (0,1% crystal violet, 10% méthanol dans dH₂O) pendant 10min puis rincées à l'eau dH₂O. Enfin, les plages de lyses ont été quantifiées dans chaque puits.

e. Focus forming assay

Cf=> paragraphe « d. Plaque assay ». Après avoir enlevé l'agarose des puits, les cellules ont été perméabilisées dans les puits avec une solution de PBS 0,5% Triton X100 pendant 15 min. Les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit avec l'anticorps primaire,

dirigé contre la protéine d'enveloppe E du WNV, dans du PBS 0,1% Triton X100 ; 5% SVF. Le lendemain, après rinçage au PBS ,0,1% Triton X100, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire, dirigé contre les IgG de lapin, conjugué à la HRP pendant 1h dans du PBS 0,1% Triton X100. Après rinçage, 400µl de réactif substrat peroxydase TrueBlue (TrueBlue Peroxidase Substrate, KPL) ont été ajoutés dans les puits et incubés 15 min à TA. Après rinçage et séchage, les plaques ont été scannées et les foyers d'infection quantifiés.

f. Cinétique de réplication virale

Les cellules VeroE6 ont étéensemencées à une densité de 1.10^5 cellules par puits en plaque 48 puits (Nunc) en milieu DMEM 10% SVF (Gibco) Les cellules U87MG et SH-SY5Y ont étéensemencées à une densité de 2.10^5 cellules par puits en plaque 48 puits (Nunc). Le lendemain, les cellules ont été incubées avec 10µg/ml de protéine sNS1^{WNV-IS98} (ou un volume équivalent de Ctrl ^{pcDNA3.1}) pendant 5 heures ou simultanément avec l'infection, à 37°C, 5% CO₂ puis infectées avec le virus WNV-IS98 à différentes MOI en milieu DMEM 2% SVF (VeroE6 et U87MG) ou milieu DMEM/F12 2% SVF (SH-SY5Y). Les cellules ont été incubées pendant 2h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être rincées deux fois avec du milieu frais puis ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ dans du milieu DMEM 10% SVF (VeroE6 et U87MG) ou DMEM/F12 2% SVF (SH-SY5Y). Les surnageants ont été récoltés à différents temps après infection. Ils ont ensuite été titrés par la méthode de dilution limite TCID50.

g. Titration par dilution limite (TCID50)

100µl de milieu DMEM 10% SVF (Gibco) ont été ajoutés dans les puits de plaque 96 puits (Nunc). Ensuite, 10µl de surnageants viraux ont été ajouté dans les puits de la première ligne (dilution 10^{-1}) puis ont été dilués en série en ajoutant 11µl de la dilution précédente dans la suivante jusqu'à la dilution 10^{-7} . Une ligne de cellules non infectées était présente dans chaque plaque de titration afin de vérifier l'absence de contamination dans les plaques. 1.10^4 cellules VeroE6 ont ensuite été ajoutées dans chaque puit de plaque 96 puits et laissées incubées pendant quatre jours à 37°C, 5% CO₂. Après le temps d'incubation, la lecture des plaques étaient réalisées en notant comme positifs (+) les puits présentant un effet cytopathique. L'absence d'effet cytopathique était notée comme négatif (-). Les titres viraux étaient ensuite calculés selon la méthode Reed-Muench.

IV.3 Résultats

IV.3.1 La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas l'infection des cellules épithéliales par le WNV

IV.3.1.1 L'entrée virale n'est pas modulée par sNS1^{WNV-IS98}

Dans un premier temps, nous avons analysé l'influence de la protéine sNS1^{WNV-IS98} sur l'entrée du virus dans les cellules VeroE6. Les cellules ont donc été incubées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} avant d'être ensuite infectées. L'analyse par cytométrie en flux n'a pas mis en évidence un taux d'infection significativement différent entre chaque condition (**Figure 59**). On note que les pourcentages de cellules infectées par WNV sont similaires lorsque celles-ci sont prétraitées avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport aux conditions contrôles non traitées ou traitées Ctrl^{pcDNA3.1}. La protéine sécrétée sNS1^{WNV-IS98} et le remodelage du réseau d'actine qu'elle induit ne semblent pas avoir d'effet sur l'efficacité d'infection et donc l'entrée du WNV en cellules épithéliales.

IV.3.1.2 Les effets cytopathiques induits par le WNV ne dépendent pas de sNS1^{WNV-IS98}

Nous avons ensuite utilisé la technique du « plaque assay » afin de comparer les effets cytopathiques provoqués par le WNV avec et sans pré-incubation des cellules épithéliales avec la protéine sNS1^{WNV-IS98}. On a constaté que le nombre de plages de lyses, traduisant des effets cytopathiques dus à l'infection par WNV, n'étaient pas significativement différents (**Figure 60**). Les puits contenant les cellules préalablement incubées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} présentent une quantité de plages de lyses similaire aux puits contenant les cellules incubées avec Ctrl^{pcDNA3.1} ou non traitées. De plus, la taille des plages de lyses ne varie pas en fonction des conditions. En parallèle, nous avons détecté

par immunomarquage et coloration enzymatique les foyers de cellules infectées dans chacune des conditions. Cette expérience complémentaire aux effets cytopathiques, montre également l'absence de différences significatives en termes de nombre de foyer de cellules infectées (**Figure 61**). Nous avons également noté que la taille de ces foyers était similaire quand les cellules étaient incubées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} par rapport aux contrôles. La protéine sNS1^{WNV-IS98} semble alors ne pas jouer de rôle important dans la virulence du WNV en cellules épithéliales. De façon étonnante, le remodelage transitoire du réseau de microfilaments d'actine par la protéine sNS1^{WNV-IS98} ne semble pas affecter la virulence du WNV.

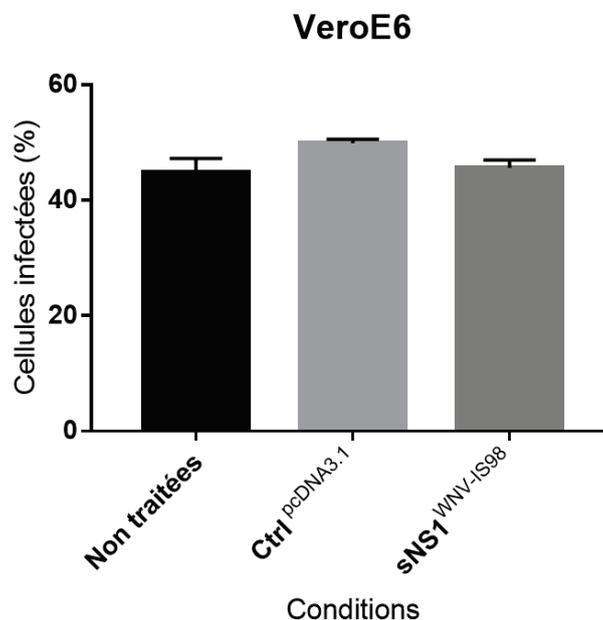


Figure 59 : La forme sécrétée de la protéine NS1^{WNV-IS98} n'influence pas l'efficacité d'entrée du virus dans la cellule. Les données de cytométrie en flux ont été obtenues après marquage intracellulaire du WNV à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine d'enveloppe E. Les pourcentages de cellules infectées sont similaires entre chaque condition. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes en triplicats. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis.

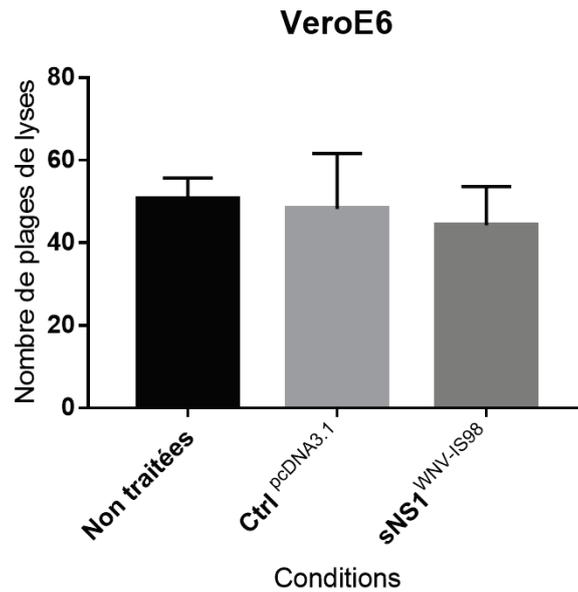


Figure 60 : sNS1^{WNV-IS98} n'est pas impliquée dans les effets cytopathiques induits par le WNV. Le nombre moyen de plages de lyses ne varie pas de manière significative entre chaque condition. Les effets cytopathiques du WNV après le traitement avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} ne diffèrent pas de ceux observés dans les conditions contrôles. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes en triplicats. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis.

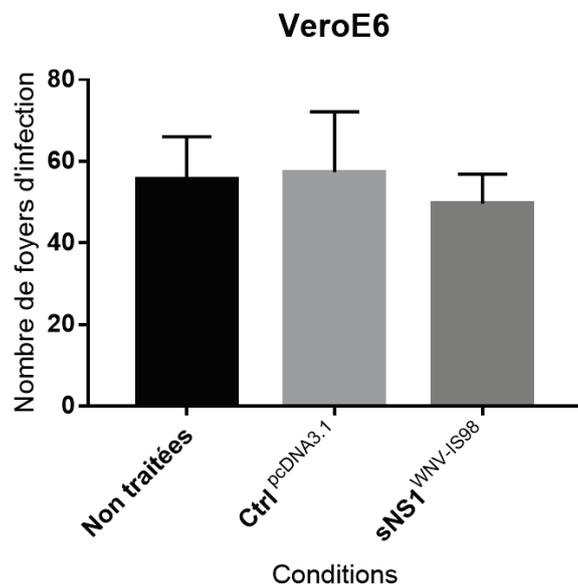


Figure 61 : La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'affecte pas le nombre de foyer d'infection WNV en cellules épithéliales. Les foyers infectieux ont été détectés par détection intracellulaire de la protéine virale d'enveloppe E du WNV. La quantité de foyers positifs pour le WNV ne varie pas de manière significative en fonction des conditions. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes en triplicats. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis.

IV.3.1.3 La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de réplication du WNV en cellules épithéliales

Dans notre démarche d'analyse de l'effet du remodelage du réseau d'actine, dépendant de sNS1^{WNV-IS98}, sur l'infection des cellules épithéliales par le WNV, nous avons réalisé des expériences de cinétique de croissance virale. Les cellules VeroE6 ont ainsi été pré-incubées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} puis infectées à différentes MOI de WNV. La production virale dans le surnageant au cours du temps a ensuite été quantifiée par titration en dilution limite (Figure 62).

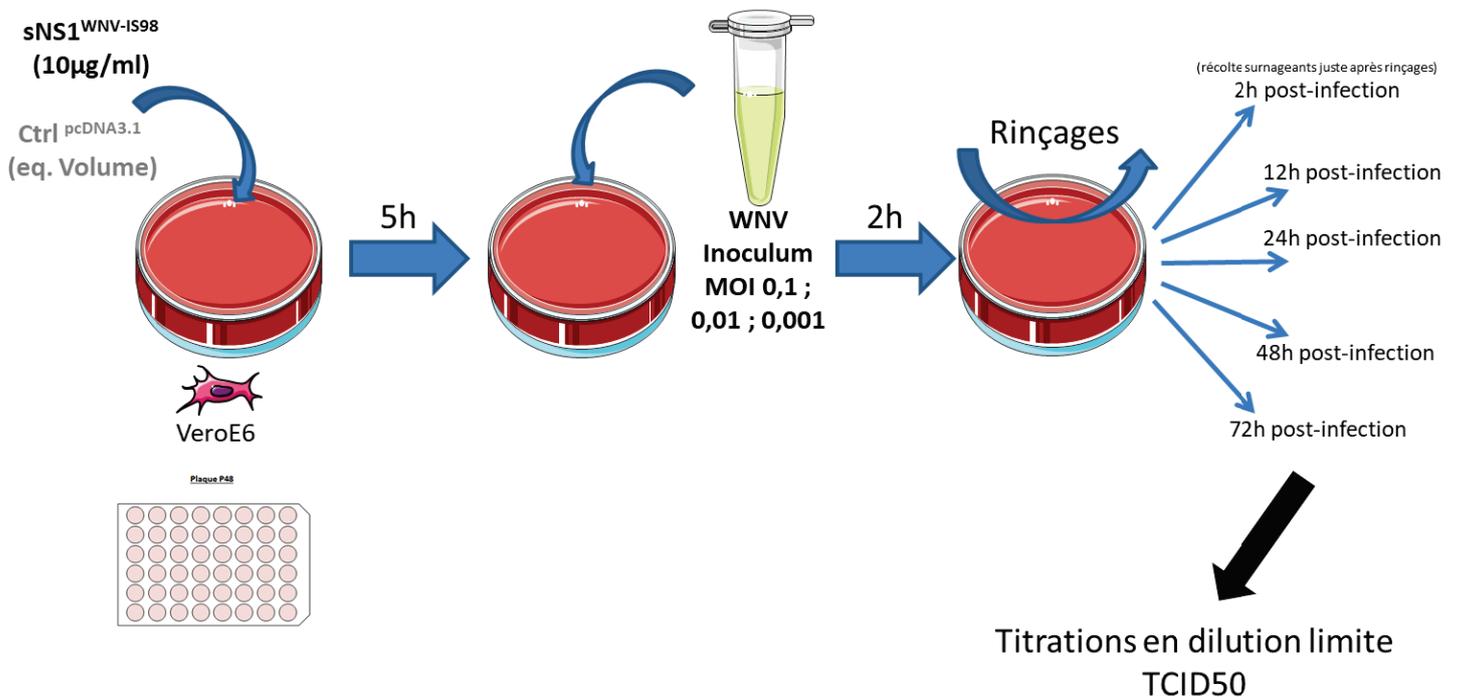


Figure 62 : Représentation schématique du plan expérimental d'étude du rôle de sNS1^{WNV-IS98} dans la cinétique de réplication du WNV en cellules épithéliales.

D'après les résultats obtenus, nous n'avons pas constaté de changements de vitesse de réplication et production virale dans les cellules épithéliales, en fonctions des différentes conditions. La pré-incubation des cellules VeroE6 avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} n'entraîne pas d'effet sur la cinétique de réplication du WNV (Figure 63). En effet, en comparant les

courbes de réplication du WNV pour la condition sNS1^{WNV-IS98} avec les conditions contrôles, celles-ci sont similaires. La réplication du WNV étant très rapide dans les cellules VeroE6, nous avons également utilisé une faible dose infectieuse (MOI 0,001). La cinétique de croissance du WNV après incubation avec sNS1^{WNV-IS98} était également non impactée dans cette condition.

De manière surprenante, le remodelage transitoire du cytosquelette d'actine médié par la protéine sNS1^{WNV-IS98} ne semble pas moduler la cinétique de croissance du WNV en cellules épithéliales. L'ensemble de ces résultats suggèrent en particulier que la protéine sNS1^{WNV-IS98} sécrétée au cours de l'infection n'est pas impliquée de façon directe dans l'infection des cellules épithéliales par le WNV.

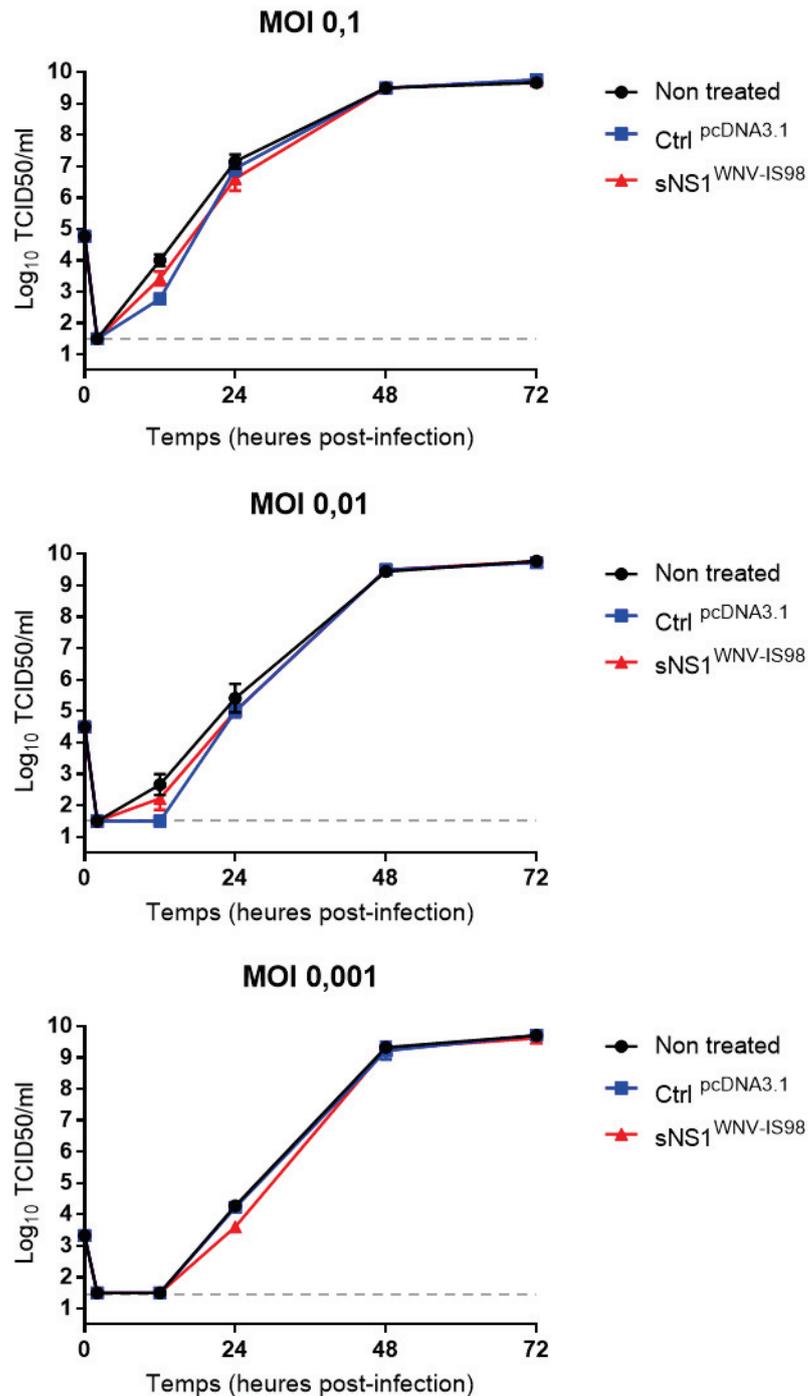
VeroE6

Figure 63 : Le pré-traitement des cellules avec sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de réplication virale en cellules épithéliales. Les cellules VeroE6 ont été pré-incubées avec sNS1^{WNV-IS98} avant d'être infectées à MOI 0,1 ; 0,01 ; 0,001 par le WNV. La cinétique de croissance virale suivie au cours du temps n'est pas modifiée lorsque les cellules sont traitées avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport aux conditions contrôles (Non traitées ou traitées avec Ctrl pcDNA3.1). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes en triplicats. Les analyses statistiques à chaque temps entre chaque condition ont été réalisées à l'aide d'un test de Mann Whitney. La ligne grise en pointillés représente la limite de détection de la technique utilisée.

IV.3.2 La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de croissance du WNV en cellules gliales et neuronales

Bien que nous n'ayons pas observé de modification du cytosquelette par la protéine sNS1^{WNV-IS98} dans nos modèles de cellules gliales et neuronales, nous avons tout de même réalisé des expériences en contexte infectieux. En effet, contrairement aux cellules VeroE6, les cellules U87MG et SH-SY5Y sont capables de déclencher une réponse cellulaire vis-à-vis d'une infection virale. La protéine sNS1^{WNV-IS98} interagissant avec les cellules SH-SY5Y, nous avons souhaité évaluer si cette interaction pouvait impacter la cinétique de réplication du WNV. Une analyse comparative avec les cellules U87MG, qui n'interagissent pas avec sNS1^{WNV-IS98} ou très faiblement, a été menée. Pour cela, nous avons suivi un plan d'expérience similaire aux cellules VeroE6. A savoir, les cellules ont été pré-incubées avec sNS1^{WNV-IS98} avant infection à différentes MOI par le WNV (**Figure 65**). Nous avons également traité les cellules en simultanée avec l'infection (**Figure 64**).

Lorsque les cellules U87MG ont été traitées et infectées en simultanément, aucune variation de la vitesse de réplication du WNV n'est observée dans la condition avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport à la condition avec Ctrl^{pcDNA3.1} (**Figure 66 A**). Ce sont les mêmes observations en cellules neuronales SH-SY5Y. Le titre viral détecté à chaque temps après infection, sur 24h, ne présente pas de différence significative avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport au contrôle (**Figure 66 B**). La protéine sNS1^{WNV-IS98} ne semble donc pas influencer la cinétique de croissance du WNV en cellules gliales et neuronales lorsqu'elle est incubée sur les cellules simultanément avec le virus.

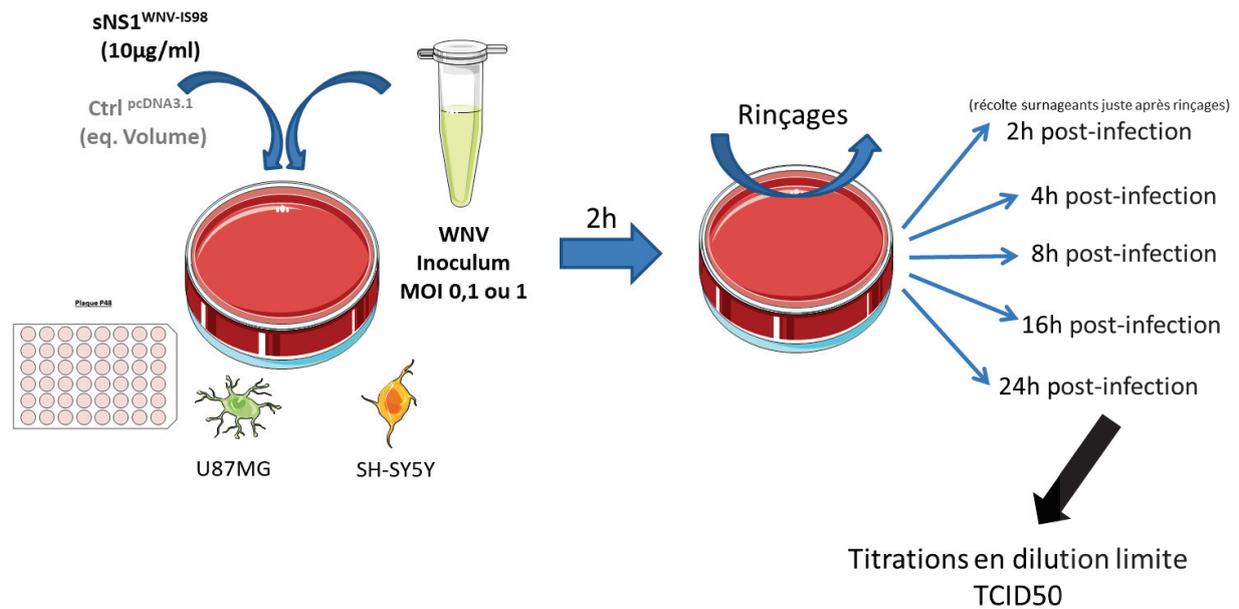


Figure 64 : Représentation schématique du plan expérimental d'étude du rôle de $sNS1^{WNV-IS98}$ dans la cinétique de réplication du WNV en cellules gliales et neuronales. Traitement des cellules simultanément avec l'infection.

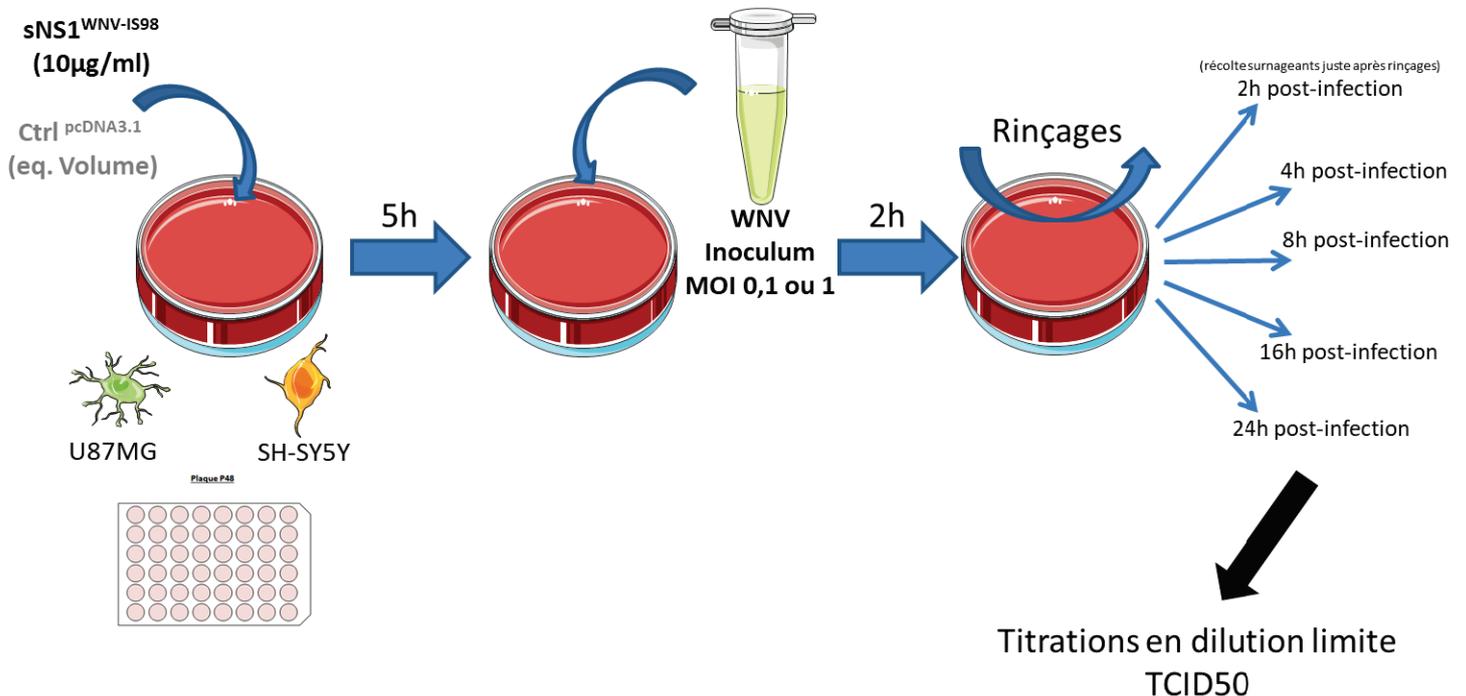


Figure 65 : Représentation schématique du plan expérimental d'étude du rôle de $sNS1^{WNV-IS98}$ dans la cinétique de réplication du WNV en cellules gliales et neuronales. Pré-traitement des cellules avant infection.

En parallèle, la protéine sNS1^{WNV-IS98} a donc été incubée sur les cellules U87MG et SH-SY5Y pendant 5h avant infection par le WNV. Cette fois encore, nous avons observé la même tendance dans chaque type cellulaire. La cinétique de croissance du WNV ne varie pas dans les cellules U87MG prétraitées et ce, à MOI 0,1 et MOI 1 (**Figure 67 A**). Dans le cas des cellules SH-SY5Y, les courbes de vitesse de réplication du WNV sont également similaires dans les deux conditions avec les deux MOI utilisées (**Figure 67 B**). Ces observations semblent mettre en avant l'absence d'une implication de sNS1^{WNV-IS98} dans la vitesse de réplication du WNV en cellules gliales et neuronales. Cependant, nous ne pouvons pas déterminer si la réponse de ces cellules, vis-à-vis de l'infection, est impactée par un traitement avec la protéine sNS1^{WNV-IS98}.

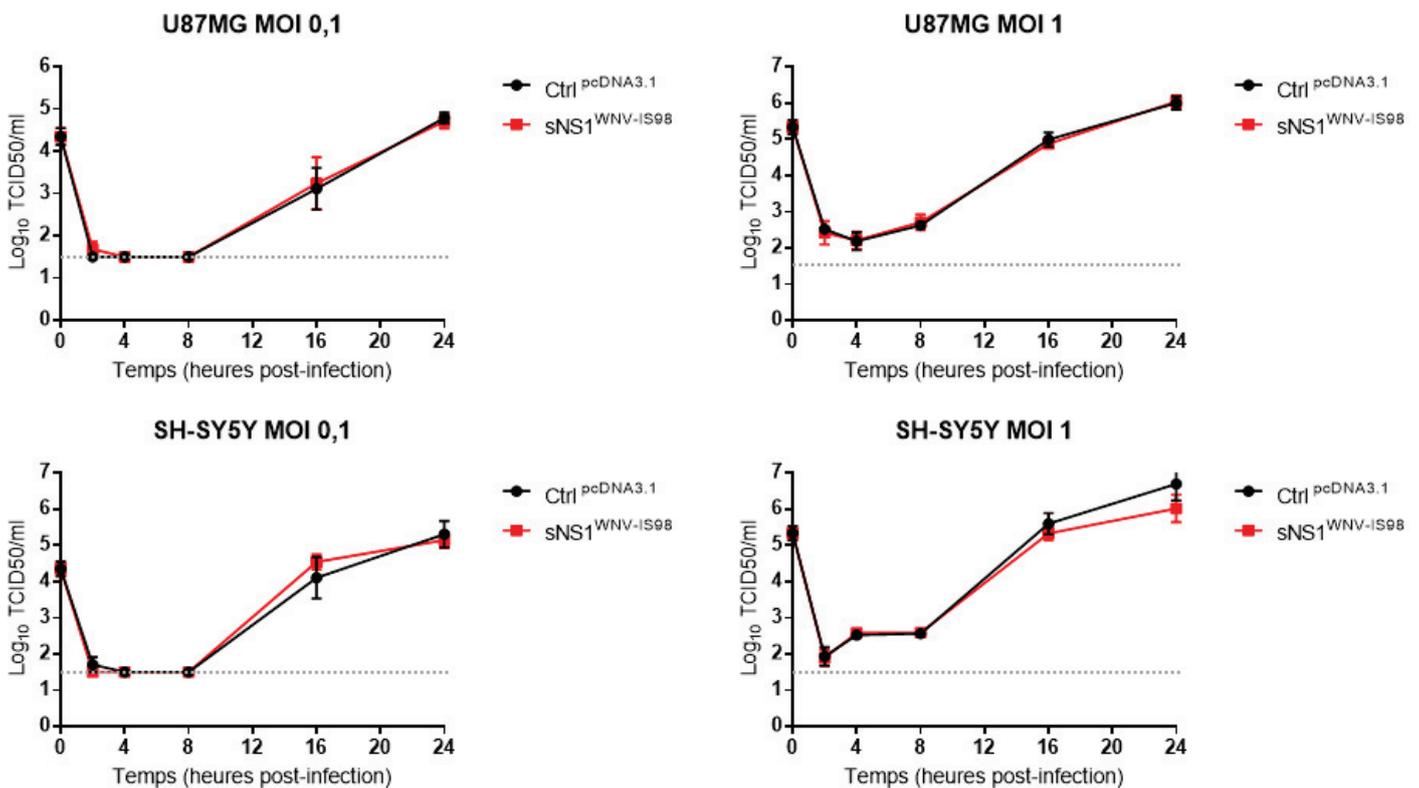


Figure 66 : Le traitement des cellules avec sNS1^{WNV-IS98} en simultanée avec l'infection n'influence pas la cinétique de réplication virale en cellules gliales et neuronales. Les cellules ont été traitées et infectées en simultanée par sNS1^{WNV-IS98} et le WNV à MOI 0,1 ou 1. Il n'y a pas de modification de la vitesse de croissance du WNV sur 24h lorsque les cellules sont traitées avec sNS1^{WNV-IS98} par rapport au contrôle. A, expériences en cellules U87MG. B, expériences en cellules SH-SY5Y. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes en duplicats. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Mann-Whitney. La ligne grise en pointillés représente la limite de détection de la technique utilisée.

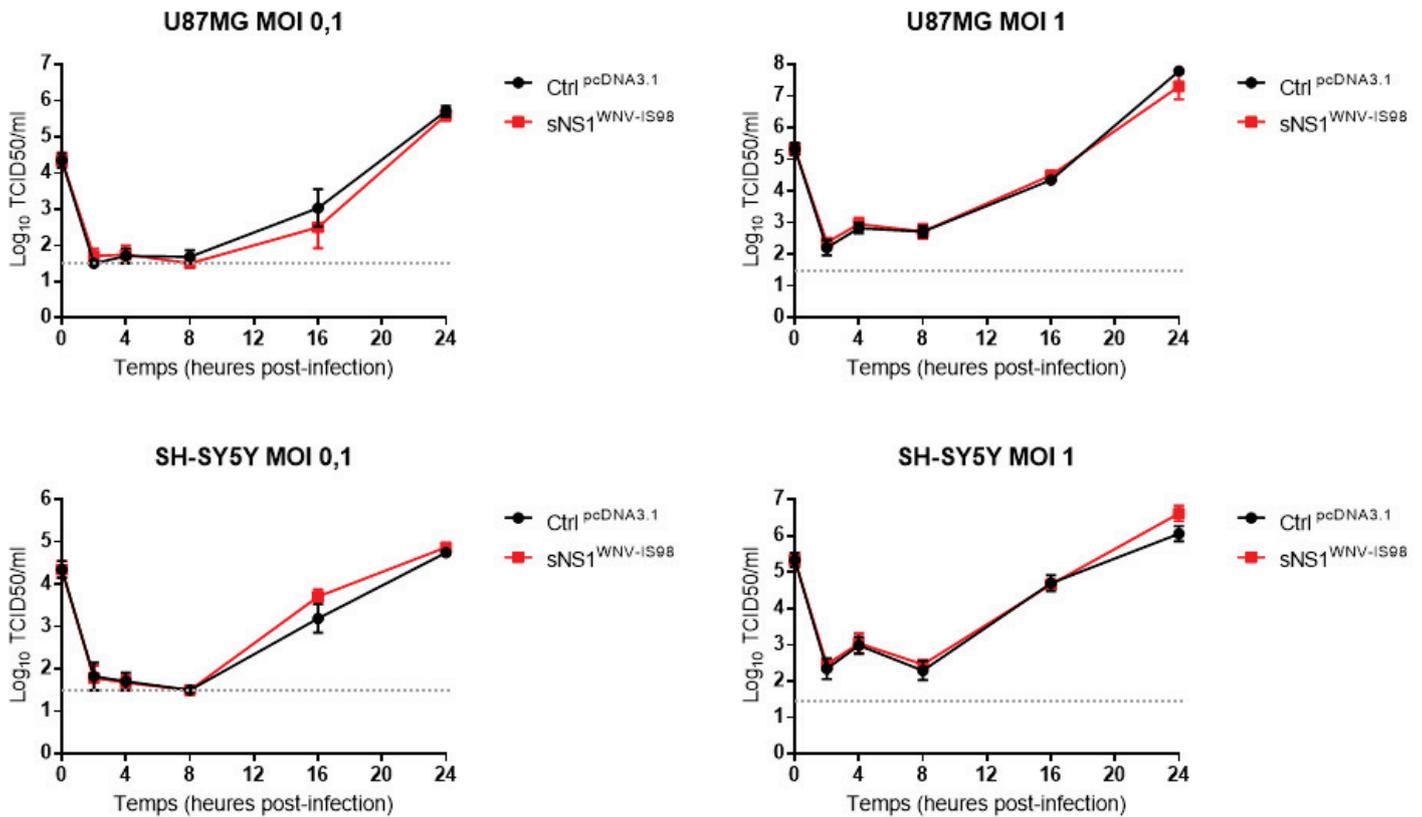


Figure 67 : Le pré-traitement des cellules avec sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas la cinétique de réplication virale en cellules gliales et neuronales. Les cellules ont été préalablement traitées pendant 5h puis infectées avec le WNV à MOI 0,1 ou 1. Aucune différence significative n'est observée entre les cellules U87MG traitées avec sNS1^{WNV-IS98} et le contrôle (A). La vitesse de croissance du WNV ne varie également pas dans les cellules SH-SY5Y entre les deux conditions de traitement (B). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes en duplicats. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Mann-Whitney. La ligne grise en pointillés représente la limite de détection de la technique utilisée.

V. La forme sécrétée sNS1^{WNV-IS98} semble activer une réponse cellulaire médiée par IRF3 dans les cellules neuronales

V.1 Contexte

L'immunité innée et sa modulation jouent un rôle important dans la pathogénèse des *Flavivirus* et le contrôle de l'infection (Fernandez-Garcia et al., 2009; Suthar et al., 2013b). La réponse cellulaire impliquant le facteur de transcription IRF3 est en particulier impliquée lors de l'infection par un *Flavivirus* tel que WNV (Daffis et al., 2007; Errett et al., 2013; Lazear et al., 2013b). Cette protéine IRF3 est activée par phosphorylation suite à la reconnaissance de déterminants viraux (protéine virale, ARN viral simple ou double brin) par des récepteurs de la famille des TLRs (TLR4, TLR3) ou des RLRs (RIG-I, MDA5) et à l'activation des voies de signalisations (Kawasaki and Kawai, 2014; Reikine et al., 2014). L'activation de la protéine IRF3 implique sa translocation dans le noyau de la cellule afin d'exercer sa fonction de facteur de transcription de gènes de la réponse antivirale tels que l'interféron de type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires. La protéine NS1 des *Flavivirus* est en particulier impliquée dans la modulation de l'activation de IRF3 au cours de l'infection. Une inhibition de l'activation de IRF3 est observée dans les étapes précoces de l'infection par DENV ou WNV, à la suite de l'interaction de NS1 avec les récepteurs RIG-I et MDA5 de la voie des RLRs (Dalrymple et al., 2015; Zhang et al., 2017). Le facteur IRF3 n'est alors plus transloqué dans le noyau après induction par du Poly I:C, un inducteur des voies TLR3 et RLR (Wilson et al., 2008). Cette inhibition peut ainsi limiter la réponse antivirale de la cellule afin de permettre la réplication du virus. Par ailleurs, la forme sécrétée sNS1 semble moduler également la réponse médiée par la voie de signalisation dépendante de TLR3 (Crook et al., 2014). Le rôle de sNS1 est cependant difficile à définir de manière certaine puisque les résultats sont variables. En effet, certaines études décrivent une inhibition de la voie, donc de l'activation de IRF3 après induction, tandis que d'autres mettent en évidence une activation de la voie par sNS1 (Alayli and Scholle, 2016; Crook et al., 2014). De plus, le rôle de la protéine sNS1 pourrait également être dépendant du virus et du type cellulaire. Dans notre cas, nous souhaitons investiguer le rôle de la protéine sNS1^{WNV-IS98} au niveau des cellules gliales et

neuronales. Les résultats en contexte infectieux n'ont pas démontré d'effet de la protéine sNS1^{WNV-IS98} sur l'efficacité d'infection et la cinétique de réplication du WNV. Cependant, nous ne pouvons exclure une interaction de sNS1^{WNV-IS98} avec certaines voies et facteurs de l'immunité innée cellulaire, impliquant une réponse dépendante de IRF3.

V.2 Matériel et Méthodes

a. Cellules

Les cellules d'astroglioblastome humain, U87MG (CelluloNet, SFR Biosciences Lyon), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les cellules de neuroblastome humain, SH-SY5Y (CelluloNet, SFR Biosciences Lyon) étaient maintenues dans du milieu DMEM/F12 Nutrient Mix 1 :1 (GlutaMAX, Gibco) avec 2% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Test de translocation (activation) de IRF3 dans le noyau des cellules gliales et neuronales

Les cellules U87MG et SH-SY5Y ont étéensemencées à une densité de 2.10⁵ cellules par puit en LabTek 8 puits (Nunc). Le lendemain, les cellules ont été incubées avec Poly I:C (50µg/ml) ou avec de la protéine sNS1^{WNV-IS98} (10µg/ml) ou un volume équivalent de Ctrl^{pcDNA3.1} ou bien transfectées avec Poly I:C (2µg) à la Lipofectamine 2000 (Life technologies) pendant 3h. Après incubation, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 min à TA. La protéine IRF3 a ensuite été détectée par immunomarquage fluorescent.

c. Immunomarquage fluorescent de la protéine IRF3

Après fixation, les cellules ont été perméabilisées pendant 15 min avec du PBS 0,5% Triton X100 à TA. Elles ont ensuite été incubées avec du PBS 0,1% Triton X100 + 5% SVF pendant 30 min à TA pour saturation. Après rinçage, les cellules ont été incubées sur la nuit à +4°C dans du PBS 0,1% Triton X100 contenant l'anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine IRF3. Le lendemain, après 3x rinçages au PBS 0,1% Triton X100, les cellules ont été incubées pendant 1h à TA avec l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de lapin et conjugué à AlexaFluor488 dilué dans du PBS 0,1% Triton X100. Les cellules ont été rincées 3x avec du PBS 0,1% Triton X100 puis incubées 15 min avec une solution de 4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dihydrochloride (DAPI) afin de marquer les noyaux. Enfin, après lavages au PBS, les LabTek étaient montées avec lamelles grâce au liquide de montage VectaMount AQ (Vector). Les observations ont été faites en microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope AxioVert 135 (Zeiss). Les anticorps, leur référence ainsi que la dilution utilisée, sont listés dans le **Tableau 11**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-IRF3	Lapin	Sc-9082/Santa Cruz	1/200
Anti-IgG de lapin	Chèvre	A11034/Invitrogen	1/500
AlexaFluor488			

Tableau 11 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine IRF3 par immunofluorescence indirecte.

V.3 Résultats

V.3.1 La protéine sNS1^{WNV-IS98} induit l'activation du facteur de transcription IRF3 dans les cellules neuronales

Afin d'investiguer la potentielle implication de la forme sécrétée de la protéine NS1 du WNV dans l'activation d'une réponse cellulaire médiée par IRF3, les cellules U87MG et SH-SY5Y ont été incubées avec 10µg/ml de protéine sNS1^{WNV-IS98} purifiée. Un traitement avec Ctrl^{pcDNA3.1} est utilisé comme contrôle négatif. Les cellules ont été incubées ou transfectées avec du Poly I:C (50µg/ml ou 2µg, respectivement) en guise de contrôles positifs. En effet, le Poly I:C, molécule mimant les ARN double brin, est un inducteur d'une réponse cellulaire en étant reconnu par les systèmes TLR3 (apport sous forme soluble) et RLRs (apport par transfection) qui conduisent à la phosphorylation du facteur de transcription IRF3. Une fois activé (forme phosphorylée) la protéine IRF3 est transloquée dans le noyau.

Les cellules U87MG incubées avec le contrôle Ctrl^{pcDNA3.1} ne présentent pas de localisation de la protéine IRF3 dans le noyau, le validant comme contrôle négatif (**Figure 68**). En revanche, le traitement avec le contrôle positif Poly I:C (incubé ou transfecté) induit une translocation du facteur IRF3 dans le noyau. Dans le cas des cellules U87MG traitées avec la protéine sNS1^{WNV-IS98}, aucune activation de IRF3 n'est observée (**Figure 68**). Ceci nous amène alors à conclure que la protéine sNS1^{WNV-IS98} n'est pas capable d'induire l'activation de la protéine IRF3, et donc d'une réponse cellulaire médiée par ce facteur, dans les cellules d'astroglioblastome humain U87MG. Ces résultats sont ainsi en corrélation avec la faible internalisation (ou l'absence d'internalisation) de sNS1^{WNV-IS98} dans ce type cellulaire.

En ce qui concerne les cellules neuronales SH-SY5Y, nous avons constaté que la molécule Poly I:C apportée sous forme soluble est capable d'induire une translocation plus efficace de IRF3 dans le noyau que lorsqu'elle est transfectée (**Figure 69**). Ceci pouvant s'expliquer par la faible efficacité de transfection dans cette lignée cellulaire. De manière intéressante, nous avons observé une importante translocation nucléaire du facteur IRF3 à la suite du traitement des cellules SH-SY5Y par la protéine sNS1^{WNV-IS98} (**Figure 69**). Ces

résultats, même si préliminaires, suggèrent que la forme sécrétée de la protéine NS1 du WNV est capable d'induire une activation du facteur de transcription IRF3 en cellules neuronales SH-SY5Y. Il est ainsi possible que suite à cette activation, une réponse cellulaire soit mise en place.

Néanmoins, les résultats obtenus en contexte infectieux ne montrent pas d'effet sur la cinétique de croissance du WNV. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que durant l'infection, le virus pourrait induire une inhibition de la réponse cellulaire déclenchée au préalable par la protéine sNS1^{WNV-1S98}. Bien qu'encourageant, ces résultats nécessitent d'être confirmés par répétition de l'expérience, en marquant la protéine sNS1^{WNV-1S98} en plus de IRF3 afin de voir s'il y a colocalisation des deux protéines dans les cellules.

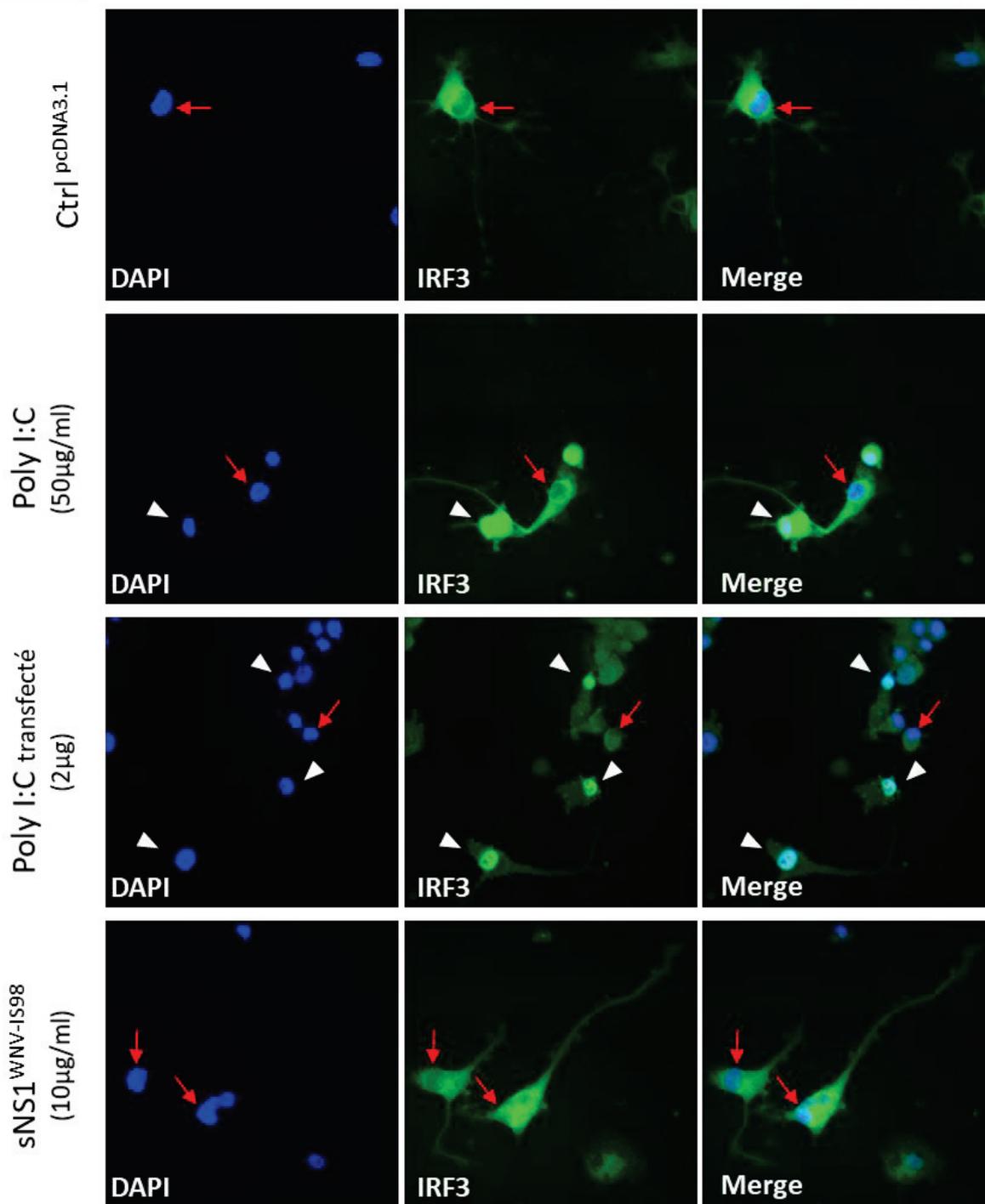
U87MG

Figure 68 : La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'induit pas la translocation de IRF3 dans le noyau de cellules d'astroglioblastome humain. Le facteur IRF3 (vert) a été détecté au niveau intracellulaire par immunomarquage fluorescent. La protéine IRF3 est transloquée dans le noyau (têtes de flèche blanches). La translocation de IRF3 n'a pas lieu (flèches rouges). Les résultats sont représentatifs d'une expérience. Les images sont représentatives d'une expérience en duplicats.

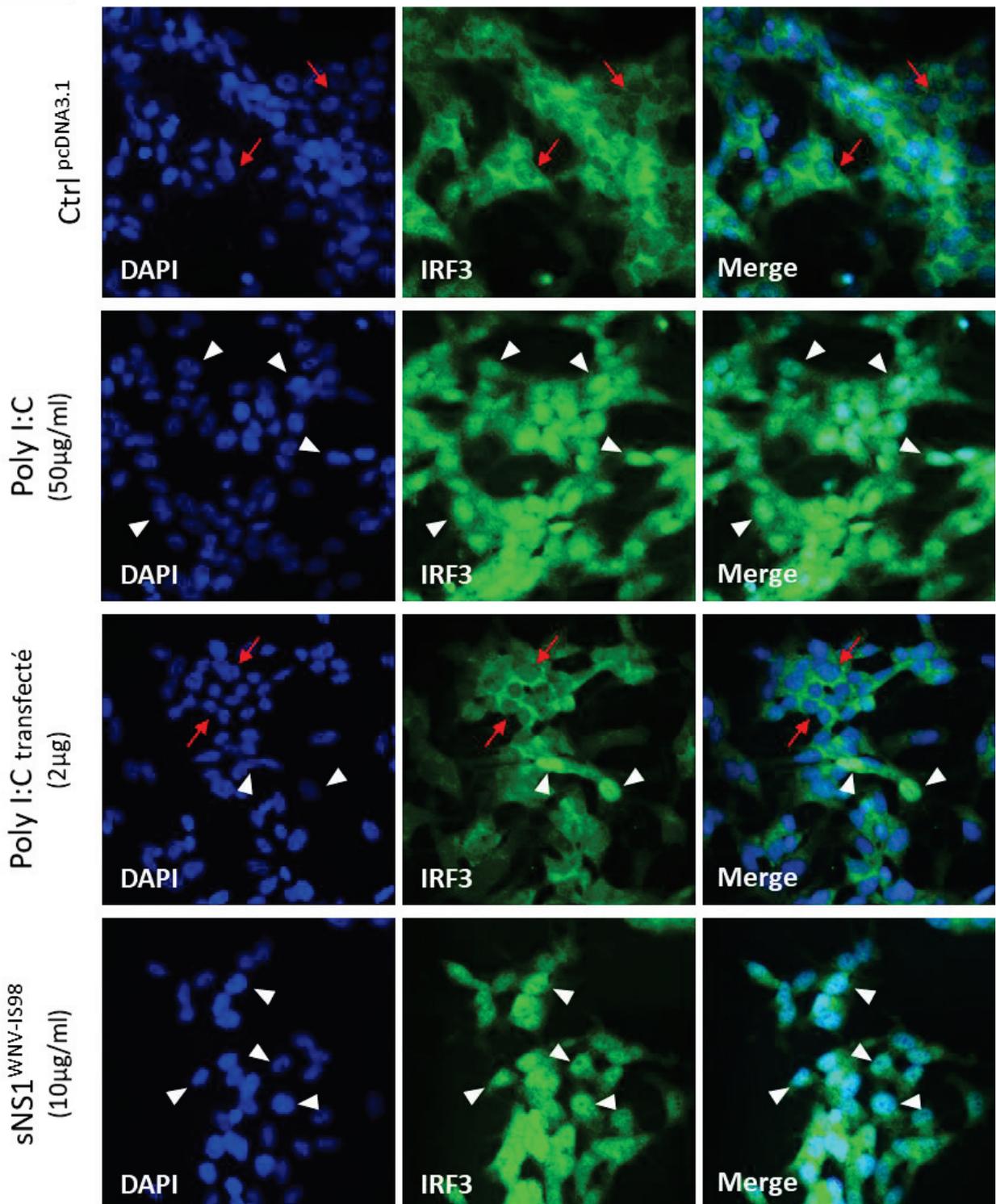
SH-SY5Y

Figure 69 : La protéine sNS1^{WNV-Is98} active la translocation de IRF3 dans le noyau de cellules neuronales (neuroblastome humain). Le facteur IRF3 (vert) a été détecté au niveau intracellulaire par immunomarquage fluorescent. La protéine IRF3 est transloquée dans le noyau (têtes de flèche blanches). La translocation de IRF3 n'a pas lieu (flèches rouges). Les résultats sont représentatifs d'une expérience. Les images sont représentatives d'une expérience en duplicats.

VI. Formation de structures de type filopodes dans les cellules épithéliales exprimant la protéine NS1 du virus West Nile

VI.1 Matériel et méthodes

a. Cellules

Les cellules épithéliales de singe vert, VeroE6 (ATCC® CRL-1586™), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Observations en immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 5.10⁴ cellules par puit en Labtek 8 puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 500ng de plasmide pcDNA-NS1^{WNV-IS98}. 24h après transfection, les cellules ont été fixées pendant 15 min avec du paraformaldéhyde 4% à TA. Après fixation, les cellules ont été perméabilisées pendant 15 min avec du PBS 0,5% Triton X100 à TA. Elles ont ensuite été incubées avec du PBS 0,1% Triton X100 + 5% SVF pendant 30 min à TA pour saturation. Après rinçage, les cellules ont été incubées sur la nuit à +4°C dans du PBS 0,1% Triton X100 contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine NS1 de *Flavivirus*. Pour le marquage des microtubules, un anticorps primaire de lapin anti- α -Tubuline a été utilisé. Le lendemain, après 3x rinçages au PBS 0,1% Triton X100, les cellules ont été incubées pendant 1h à TA avec l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de souris et conjugué à AlexaFluor488 et avec la phalloïdine couplée à la rhodamine (marquage F-actine) ou avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à AlexaFluor633 (α -Tubuline), dilués dans du PBS 0,1% Triton X100. Les cellules ont été rincées 3x avec du PBS 0,1% Triton X100 puis incubées 15 min avec une solution de 4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dihydrochloride (DAPI) afin de

marquer les noyaux. Enfin, après lavages au PBS, les LabTek étaient montées avec lamelles grâce au liquide de montage VectaMount AQ (Vector). Les observations ont été faites en microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope AxioVert 135 (Zeiss). Des observations ont également été faites en microscopie confocale à fluorescence avec un microscope Leica SP5. Les anticorps, leur référence ainsi que la dilution utilisée, sont listés dans le **Tableau 12**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-NS1 Flavivirus	Souris	Ab214337/Abcam	1/250
Anti-α Tubuline	Lapin	Ab15246/Abcam	1/250
Anti-IgG de souris AlexaFluor488	Chèvre	A11029/Invitrogen	1/500
Anti-IgG de lapin AlexaFluor633	Chèvre	A21070/Invitrogen	1/500
Phalloïdine - Rhodamine		R415/Invitrogen	1/500

Tableau 12 : Anticorps et leur condition d'utilisation pour le marquage intracellulaire de la protéine NS1^{WNV-IS98} et du cytosquelette par immunofluorescence indirecte.

VI.2 Résultats

Au cours des analyses de l'expression de la protéine NS1^{WNV-IS98} en cellules de mammifères après transfection, nous avons remarqué des structures dans lesquelles la protéine virale était localisée. En effet, les cellules exprimant la protéine NS1^{WNV-IS98} présentaient des structures sous forme d'important prolongements constitués de protéines du cytosquelette telles que les microfilaments d'actine et les microtubules (**Figures 70-72**). Ces structures observables semblent être de type filopodes. De manière intéressante, la protéine NS1^{WNV-IS98} est détectée au sein de ces structures filopodiales (**Figures 70-72**). C'est en particulier la visualisation de la protéine virale qui a permis de mettre en évidence ces prolongements, qui sont parfois difficilement observables du simple fait de la densité et du contact cellulaires (**Figures 70-72**). De plus, certaines de ces structures filopodiales semblent être en contact avec des cellules significativement éloignées de la cellule exprimant la

protéine NS1^{WNV-IS98}. Afin de vérifier que ce type de structure n'est pas normalement présent en l'absence de NS1^{WNV-IS98}, nous souhaitons transfecter les cellules avec un gène codant une protéine fluorescente telle que la GFP, dans le but de d'observer la morphologie des cellules. En effet, la protéine GFP étant localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme, nous pourrions observer la morphologie des cellules et donc vérifier l'absence de structures comparables à celles observées lorsque que NS1^{WNV-IS98} est exprimée.

Bien que ces observations soient issues de résultats préliminaires, on peut émettre l'hypothèse d'un rôle de la protéine NS1^{WNV-IS98} dans l'induction de la formation de structures filopodiales. Dans ce contexte, on pourrait alors suggérer une transmission de protéines NS1^{WNV-IS98}, telles que les formes hexamériques, de cellule à cellule, sans l'étape de sécrétion dans le milieu extracellulaire. La protéine sNS1^{WNV-IS98} étant décrite comme fortement immunogène, un passage de cellule à cellule via une structure de type filopode comme voie alternative, représenterait une forme de mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire.

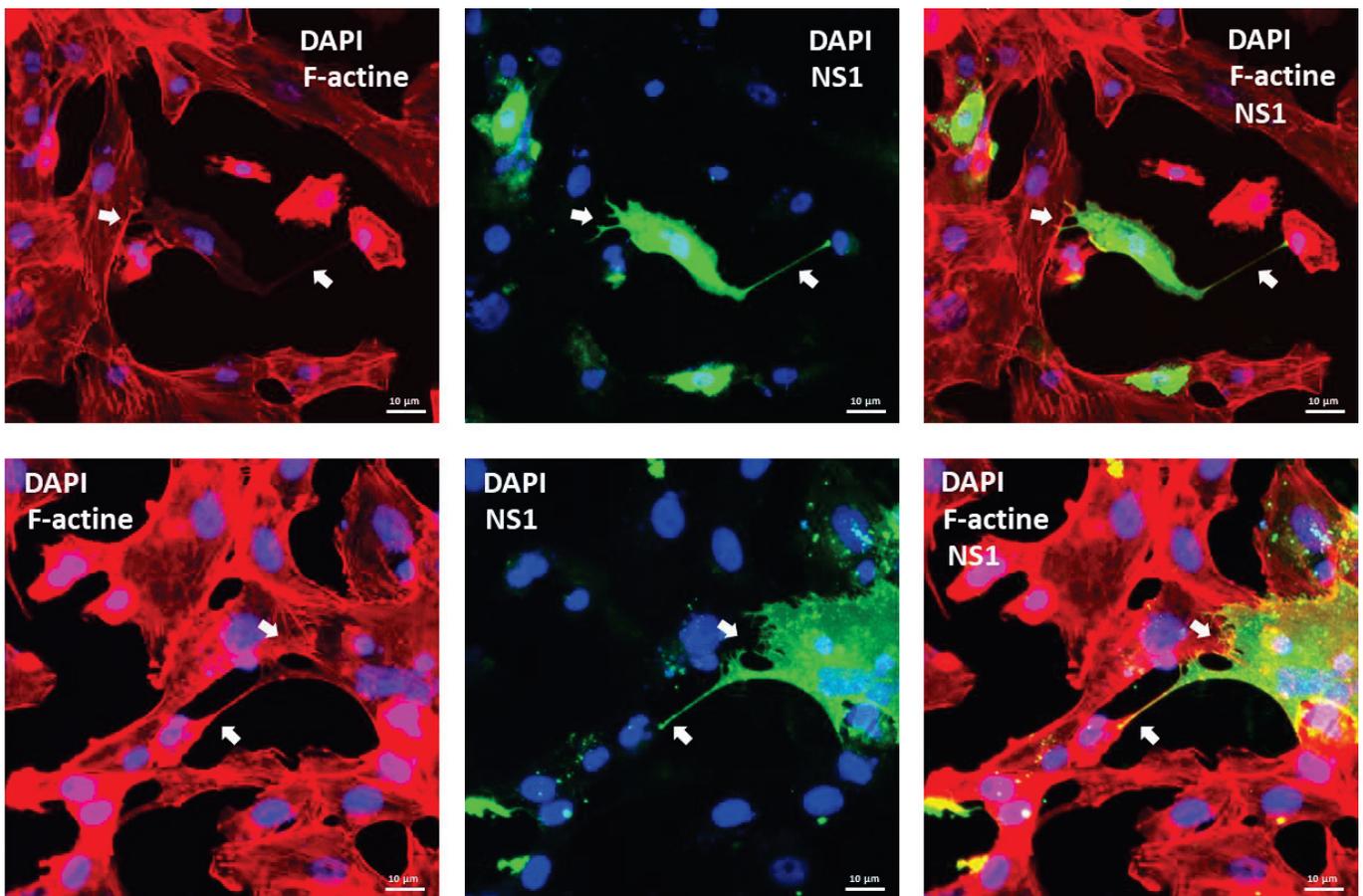


Figure 70 : Filopodes observés par immunofluorescence indirecte en cellules épithéliales exprimant la protéine NS1^{WNV-IS98}. On note la présence d'importants prolongements cellulaires (filopodes) à partir de cellules VeroE6 exprimants la protéine NS1^{WNV-IS98}. La protéine NS1^{WNV-IS98} colocalise avec les prolongements. Observations réalisées en microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope AxioVert 135 (Zeiss).

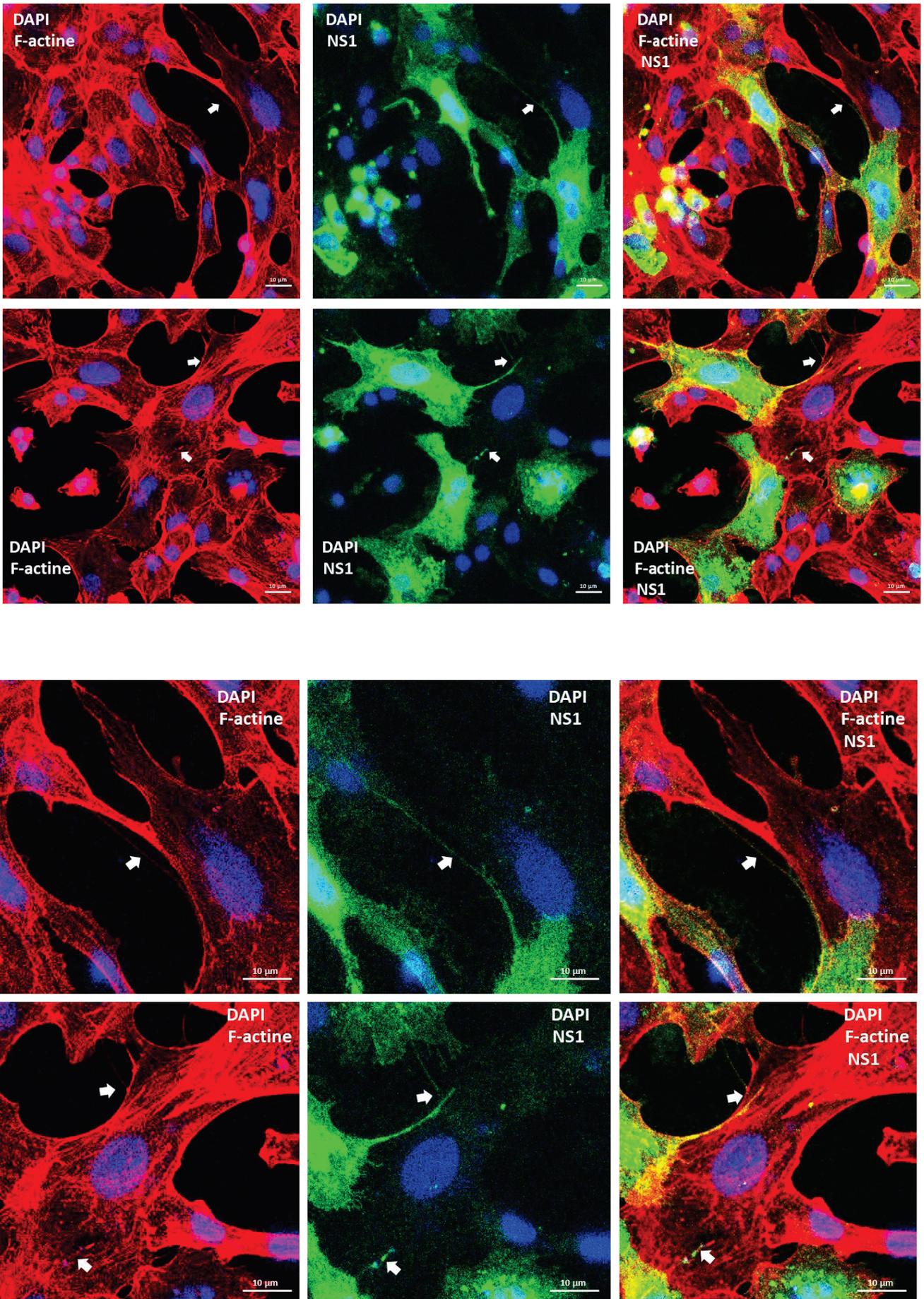


Figure 71 : Filopodes observés par immunofluorescence indirecte en cellules épithéliales exprimant la protéine NS1^{WNV-IS98}. On note la présence d'importants prolongements cellulaires (filopodes) à partir de cellules VeroE6 exprimants la protéine NS1^{WNV-IS98}. La protéine NS1^{WNV-IS98} co-localise avec ces structures filopodiales. Le deuxième panel est un grossissement plus important des champs présentés dans le premier panel. Observations réalisées en microscopie confocale à fluorescence.

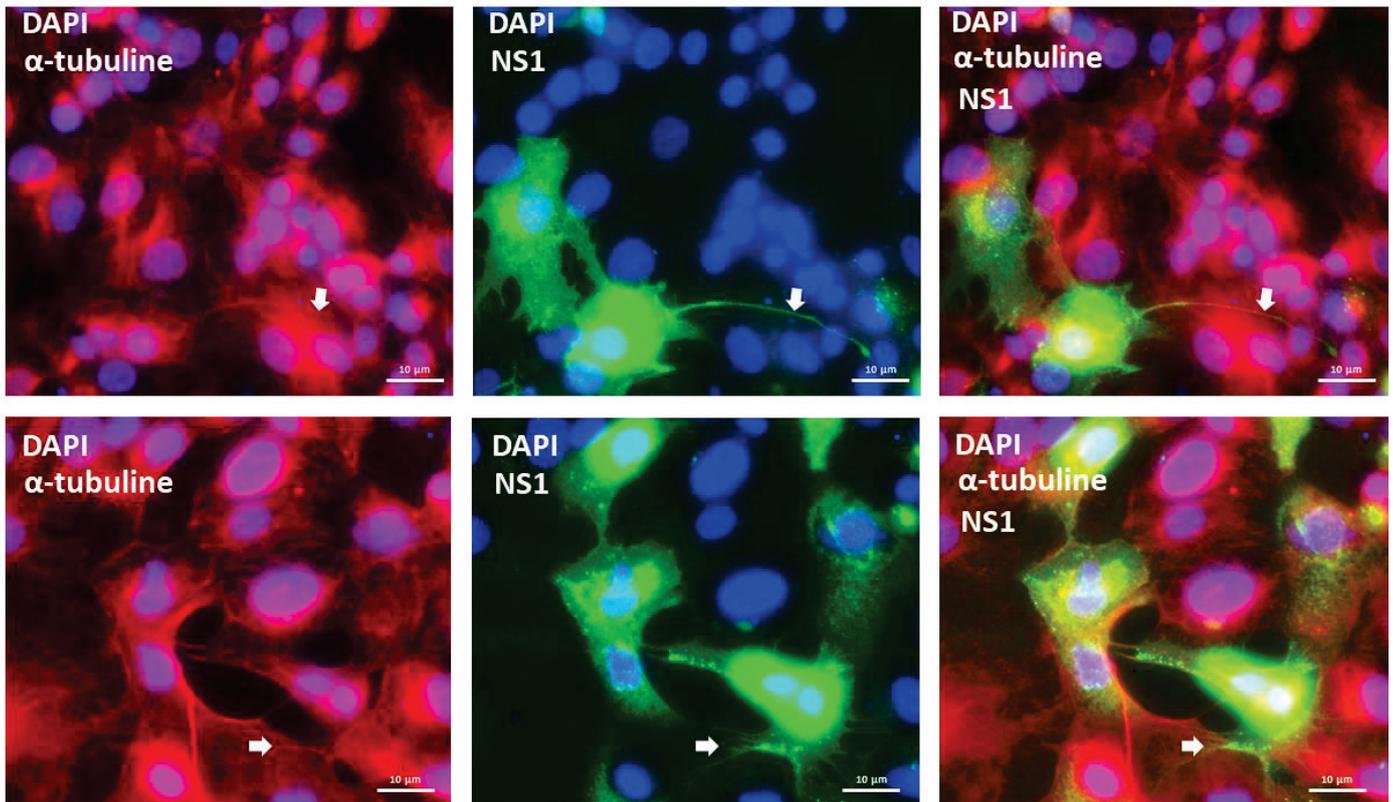


Figure 72 : Filopodes observés par immunofluorescence indirecte en cellules épithéliales exprimant la protéine NS1^{WNV-IS98}. On note la présence d'importants prolongements cellulaires (filopodes) à partir de cellules VeroE6 exprimants la protéine NS1^{WNV-IS98}. La protéine NS1^{WNV-IS98} colocalise avec les prolongements. Observations réalisées en microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope AxioVert 135 (Zeiss).

Discussion

Au cours de l'infection par un *Flavivirus*, tel que le WNV, la protéine sNS1 est sécrétée dans le milieu extracellulaire et dans la circulation sanguine de l'hôte infecté. Cette protéine multifonctionnelle est impliquée dans la pathogenèse du virus au cours de l'infection. La protéine sNS1 est alors définie comme un facteur de virulence important dans le développement de maladies dues aux *Flavivirus*.

De manière intéressante, la sécrétion de la protéine NS1 n'est pas dépendante de l'activité des autres protéines virales. En effet, sNS1 transite via la voie sécrétoire de la machinerie cellulaire. Grâce à cette propriété, il est possible de produire la protéine sNS1 en système recombinant. Des études ont utilisé le système Baculovirus-cellules d'insecte afin de produire la protéine sNS1 recombinante (Akey et al., 2014; Chung et al., 2006a). Dans ce contexte, la production de protéine sNS1 de *Flavivirus* était essentiellement à visée d'études cristallographiques (Akey et al., 2014). Cependant, en cellules d'insecte, la glycosylation des protéines est moins complexe qu'en cellules de mammifère (Shi and Jarvis, 2007). Or, dans cette étude, nous souhaitons investiguer des fonctions potentielles de la glycoprotéine sNS1 au cours de l'infection d'un hôte mammifère. C'est pourquoi, malgré que le système recombinant de production en cellules d'insecte soit plus performant, nous avons préféré le système cellules de mammifère. Ainsi, la protéine sNS1 produite était plus pertinente d'un point de vue physiologique avec nos objectifs. Nous avons donc produit la forme sNS1^{WNV-IS98} en cellules humaines, HEK-293T, exprimant la protéine NS1 de la souche méditerranéenne WNV IS98-ST1 codée par la construction pNS1^{WNV-IS98}. La protéine sNS1, alors présente dans le surnageant de culture, a été purifiée par affinité pour le Nickel grâce à l'étiquette Histidine (6xHis) portée en région C-terminale. Les analyses en Western Blot et en microscopie électronique ont permis de valider l'oligomérisation de la protéine sNS1^{WNV-IS98} recombinante pour former un hexamère de 10 nm de diamètre. Cette structure hexamérique, dite fonctionnelle, est caractéristique de la protéine sNS1 du WNV et de l'ensemble des *Flavivirus* (Akey et al., 2014; Gutsche et al., 2011). Ces observations valident ainsi notre construction plasmidique et nos systèmes de production et purification de la

protéine sNS1^{WNV-IS98}. De plus, à notre connaissance, il s'agit de la seule protéine sNS1 recombinante produite à partir d'une souche européenne de WNV, la souche WNV-IS98-ST1.

La production de la forme hexamérique sNS1 ayant été confirmée, nous avons tout d'abord évalué son interaction avec différentes cellules cibles. En effet, la protéine sNS1 est capable de se fixer à la surface d'une grande diversité de types cellulaires et d'être rapidement internalisée (Alcon-LePoder et al., 2005; Avirutnan et al., 2007; Crook et al., 2014). Néanmoins, une grande variabilité est observée dans l'affinité de l'interaction entre sNS1 et les cellules, de manière dépendante du type cellulaire mais aussi au sein d'un même type avec des origines tissulaires différentes. De plus, l'essentiel de ces études concernent la protéine sNS1 de DENV. Dans le cadre de notre projet, nous avons évalué la capacité d'interaction de la protéine sNS1 du WNV avec les cellules épithéliales VeroE6, les cellules gliales U87MG et les cellules neuronales SH-SY5Y. Si les cellules VeroE6 sont une lignée cellulaire modèle couramment utilisée, les cellules U87MG et SH-SY5Y représentent un modèle pertinent dans le cadre de l'étude fonctionnelle d'une protéine d'un virus neurotrope comme le WNV. Nous avons pu constater que la protéine sNS1^{WNV-IS98} se fixe et est internalisée à la fois dans les cellules épithéliales VeroE6 et dans les cellules neuronales SH-SY5Y. La quantité de protéine sNS1^{WNV-IS98} fixée et internalisée semble plus importante avec les cellules VeroE6 que les cellules SH-SY5Y. En revanche, la protéine ne semble pas interagir avec les cellules gliales U87MG ou bien de manière trop faible pour être détectée par cytométrie en flux. Ces résultats confirment que l'interaction de la protéine sNS1 avec les cellules est dépendante du type cellulaire. La variabilité d'interaction suggère la reconnaissance de sNS1 par une ou plusieurs molécules de surfaces, telles que les héparanes sulfates ou la chondroïtine, dont les niveaux d'expression varient en fonction du type cellulaire et du tissu d'origine (Avirutnan et al., 2007). Ainsi, la protéine virale produite au cours de l'infection peut avoir une fonction sur certaines cellules mais pas sur d'autres ou bien exercer une fonction particulière qui sera différente suivant la cellule cible.

Au cours de l'infection par WNV, le cytosquelette de la cellule est remodelé (Chu and Ng, 2004; Foo and Chee, 2015). Ce remodelage intervient au cours de certaines étapes importantes du cycle infectieux du virus telles que l'entrée, la réplication, l'assemblage ou la sortie des virions. Nous avons investigué l'hypothèse d'un rôle de la protéine sNS1 dans la modification de la dynamique du cytosquelette. Si le réseau de microtubules ne subit aucune

modification en cellules épithéliales après un traitement par la protéine sNS1^{WNV-IS98}, les microfilaments d'actine sont eux déstabilisés. En revanche, aucune réorganisation des réseaux de microfilaments d'actine ni de microtubules n'est induite par la protéine sNS1^{WNV-IS98} dans les cellules gliales et neuronales. Le remodelage du réseau de filaments d'actine induit est un effet rapide et transitoire, observable à partir de 2h après traitement des cellules avec sNS1 jusqu'à 8h. La plus grande proportion de cellules présentant un remodelage est observable à 6h post-traitement. Notons que l'interaction de sNS1^{WNV-IS98} avec les cellules épithéliales et la déstabilisation induite des microfilaments d'actine ne sont pas associées à une cytotoxicité. S'il semble difficile de déterminer l'impact sur la cellule de ce remodelage du réseau d'actine, plusieurs hypothèses peuvent être évoquées. La première suggère un effet direct de la déstabilisation de l'actine sur la capacité d'infection d'une cellule épithéliale par le WNV. D'un point de vue stratégie virale, le remodelage du réseau d'actine induit par l'interaction de la protéine sNS1 avec la cellule pourrait faciliter l'entrée du WNV dans la cellule hôte. Les étapes suivantes du cycle infectieux du WNV peuvent également être facilitées par cet effet. D'autre part, le rôle de ce phénotype peut être plus indirect. De manière intéressante, la protéine Tat du virus HIV-1, qui est également sécrétée dans le milieu extracellulaire pendant l'infection, induit un remodelage rapide du réseau de microfilaments d'actine dans les cellules endothéliales non infectées ([Bagashev and Sawaya, 2013](#); [Wu et al., 2004](#)). La protéine Tat est aussi responsable d'une modulation de l'expression de protéines des jonctions serrées des cellules endothéliales ([Xu et al., 2012](#)). Or, il est démontré que ce type de déstabilisation du cytosquelette en lien avec l'altération des jonctions serrées est corrélé avec une perturbation de la perméabilité des barrières endothéliales et épithéliales ([Ivanov et al., 2010](#); [Prasain and Stevens, 2009](#)). Au niveau du SNC, outre la barrière de cellules endothéliales constituant la BHE, d'autres barrières existent, telles que la barrière de cellules épithéliales située au niveau des plexus choroïdes. Ces structures jouent un rôle semblable à la BHE, mais en séparant la circulation sanguine et le liquide cébrospinal. Les plexus choroïdes ont notamment été évoqués comme potentielle porte d'entrée du WNV dans le SNC ([Suen et al., 2014](#)). Ainsi, l'interaction de la protéine sNS1^{WNV-IS98} avec les cellules épithéliales pourrait entraîner la déstabilisation du réseau d'actine par la protéine sNS1^{WNV-IS98} mais aussi une altération des protéines de jonctions serrées (Occludine, Claudines, ZO-1). Ces mécanismes médiés par sNS1^{WNV-IS98} pourraient alors être à l'origine d'une perméabilisation de cette barrière, facilitant le

passage du WNV dans le SNC au niveau des plexus choroïdes (**Figure 73**). Nos cellules épithéliales provenant de reins de singe, sont différentes des cellules épithéliales constituant la barrière au niveau des plexus choroïdes. Néanmoins, ces résultats constituent une première approche dans cette hypothèse concernant la protéine sNS1 du WNV et un potentiel rôle dans la perméabilisation d'une barrière épithéliale facilitant l'entrée du virus dans le SNC. Il serait intéressant de tester cette hypothèse sur des cellules primaires de la barrière des plexus choroïdes d'origine humaine ou bien murine. Un test sur cellules endothéliales de la BHE ou sur cellules épithéliales polarisées serait aussi pertinent. Enfin, une approche *in vivo* en modèle murin serait également à envisager.

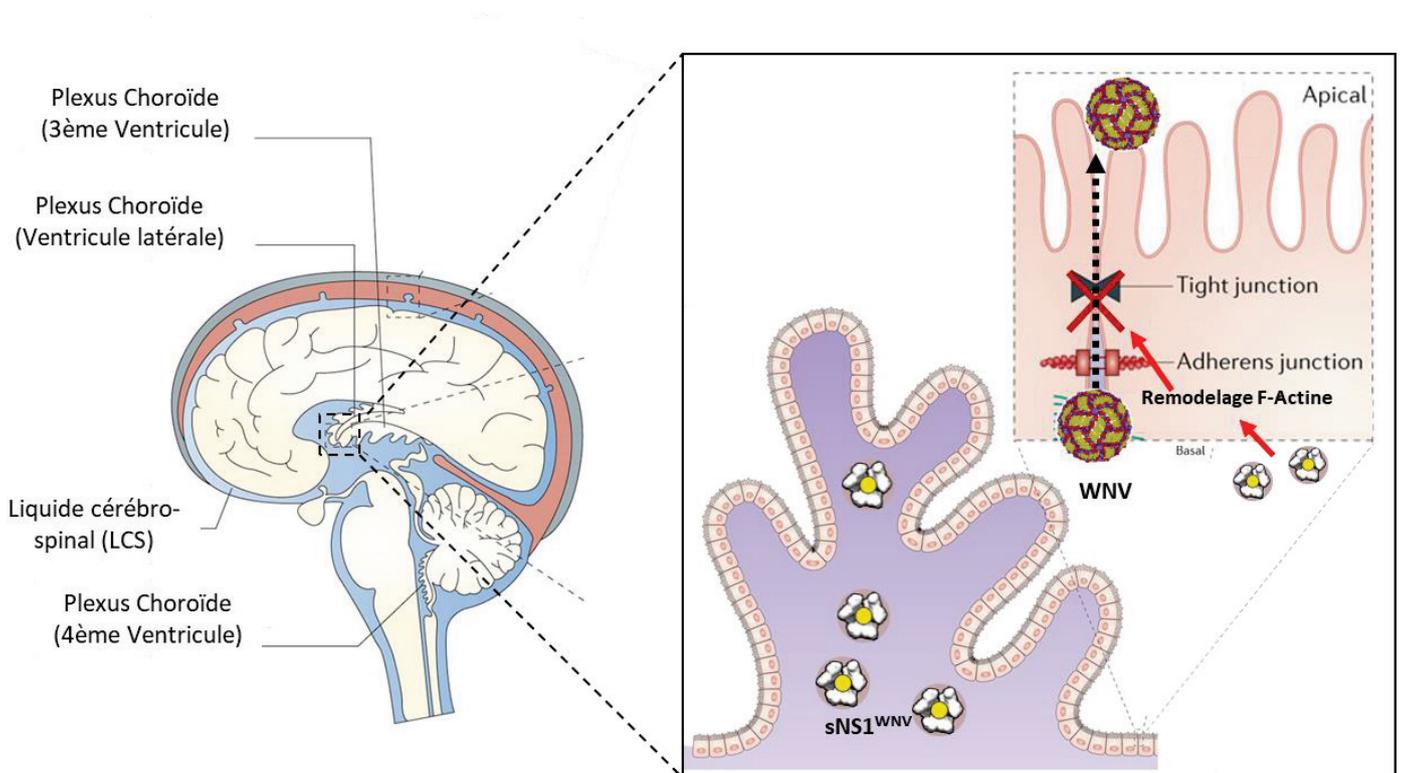


Figure 73 : Modèle du rôle potentiel de la protéine sNS1^{WNV-IS98} dans la déstabilisation de la barrière épithéliale des Plexus Choroïdes permettant l'entrée du WNV dans le SNC.

Dans le cadre de cette étude, nous avons formulé l'hypothèse d'un rôle direct de la forme sNS1 dans les étapes du cycle infectieux du WNV. En effet, la sécrétion de la protéine sNS1 étant conservée chez tous les *Flavivirus*, il est possible que celle-ci confère de manière directe ou indirecte une meilleure valeur adaptative (fitness) au virus. De façon inattendue et contrairement à ce qui est décrit pour DENV, nous n'avons pas observé de différences

significatives entre la présence et l'absence de sNS1 lors de l'infection par le WNV (Alayli and Scholle, 2016; Alcon-LePoder et al., 2005). De même, un pré-traitement des cellules avec la protéine sNS1^{WNV-IS98} n'influence pas l'entrée ni la cinétique de réplication et production virale dans les différents types cellulaires. L'utilisation d'une concentration de 10µg/ml de sNS1^{WNV-IS98}, physiologiquement pertinente, n'a pas d'effet sur l'infection des cellules par le WNV. La protéine sNS1^{WNV-IS98} n'est donc pas impliquée directement dans les étapes du cycle infectieux du WNV. La synthèse et la sécrétion de protéines sNS1 par les cellules infectées étant rapides, il est possible qu'un potentiel effet additionnel de sNS1^{WNV-IS98} purifiée sur la production virale ne soit pas observable par titration. D'autre part, ces résultats suggèrent que le remodelage du cytosquelette d'actine, induit par sNS1^{WNV-IS98} dans les cellules épithéliales, n'est pas impliqué directement dans l'infection par le virus West Nile. En effet, ni l'efficacité d'entrée du virus, ni les effets cytopathiques induits par celui-ci, ne sont dépendants de la protéine sNS1. De même, la dissémination du virus caractérisée par la taille des foyers d'infections ne varie pas en présence ou en absence de protéine sNS1^{WNV-IS98}.

De fait, nous avons le cas étonnant d'une protéine virale, dont la structure et les mécanismes de sécrétion sont hautement conservés chez tous les *Flavivirus*, qui n'aurait aucune fonction directe sur la biologie du virus. Néanmoins, la conservation évolutive de la forme sécrétée de la protéine NS1 au sein du genre suggère une utilité importante pour les virus. L'hypothèse tend ainsi vers un rôle indirect de la protéine non-structurale sNS1 au cours de l'infection de l'hôte. Les récents travaux qui s'intéressent à la compréhension des mécanismes dépendants de sNS1 s'orientent par ailleurs dans ce sens. La protéine sNS1 a été mise en évidence dans de nombreuses interactions avec le système immunitaire de l'hôte infecté, notamment avec la réponse innée (Alayli and Scholle, 2016; Avirutnan et al., 2011; Beatty et al., 2015; Crook et al., 2014; Modhiran et al., 2015). Dans ce contexte, nous avons évalué la mise en place d'une réponse immunitaire innée dans les cellules gliales et neuronales à la suite d'une interaction avec la protéine sNS1^{WNV-IS98}. Les cellules gliales U87MG et neuronales SH-SY5Y sont immunocompétentes et représentent ainsi des modèles cellulaires pertinents pour cette analyse. Des études ont montré des interactions entre la protéine sNS1 et les systèmes TLRs et RLRs de la réponse innée cellulaire. Les voies de signalisations dépendantes de ces systèmes peuvent alors être inhibées ou bien activées par sNS1, traduisant une modulation des réponses inflammatoires et antivirales de l'hôte.

Étant donné qu'une grande partie de ces voies de signalisation font intervenir le facteur de transcription IRF3, nous avons investigué son activation dans les cellules gliales et neuronales. Nous avons ainsi pu constater que le traitement des cellules SH-SY5Y par la protéine sNS1^{WNV-IS98} induisait une translocation (activation) de IRF3 dans le noyau. Aucune translocation de IRF3 n'est observée dans les cellules gliales U87MG traitées avec sNS1^{WNV-IS98} tandis qu'elle est induite par le contrôle positif polyI:C. La protéine sNS1 n'interagissant pas avec les cellules U87MG, ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus dans la partie II du chapitre 1. De manière intéressante, la proportion de cellules neuronales avec une activation de IRF3 semble similaire entre les cellules incubées avec sNS1^{WNV-IS98} et les cellules traitées avec du polyI:C. En effet, la translocation de IRF3 dans le noyau est plus importante lorsque les cellules SH-SY5Y sont traitées que lorsqu'elles sont transfectées avec le polyI:C. Or, la transfection du polyI:C permet d'activer la voie de signalisation dépendante de RIG-I et/ou MDA5 (RLRs) tandis que la molécule présente sous forme soluble dans le milieu de culture interagit (après internalisation) avec le récepteur TLR3 situé dans l'endosome. Comme la protéine sNS1 est internalisée dans les cellules neuronales, potentiellement par endocytose, elle peut interagir avec TLR3 dans l'endosome. De fait, les résultats suggèrent que la protéine sNS1^{WNV-IS98} est capable d'induire la translocation de IRF3 suite à une interaction avec le récepteur TLR3. Le facteur de transcription IRF3 activé, la production de molécules pro-inflammatoire et antivirales est alors possible. Il serait nécessaire d'analyser cette réponse par une mesure quantitative de l'expression des gènes codant les molécules pro-inflammatoires (RT-qPCR) ou bien de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (ELISA). De même, les voies de signalisations mises en jeu font aussi intervenir le facteur NF- κ B. C'est pourquoi nous envisageons de tester son activation ou non par la protéine sNS1^{WNV-IS98} dans les cellules neuronales. Ainsi, nous pourrions affiner l'étude du mécanisme mis en jeu dans l'interaction avec la protéine virale du WNV.

L'interaction de la forme sécrétée sNS1 des *Flavivirus* avec les récepteurs TLRs, tels que TLR3, a été assez peu étudiée. Les études se sont avant tout intéressées à la protéine NS1 intracellulaire et son rôle dans ces mécanismes. Dans ce contexte, la protéine NS1 intracellulaire de WNV a été mise en évidence à la fois dans la modulation des voies de signalisations dépendantes de TLR3 et des RLRs (RIG-I et MDA5). Elle est responsable de l'inhibition de ces voies via l'interaction direct avec les récepteurs RIG-I et MDA5, entraînant

leur dégradation (Zhang et al., 2017). La protéine NS1 bloque ainsi l'activation de la réponse interféron de type I médiée par IRF3 et le système des RLRs. Une inhibition de la réponse médiée par TLR3 a également été associée à NS1. Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine NS1 de DENV. Il est intéressant de noter que ces mécanismes d'inhibition de la réponse cellulaire interviennent durant les étapes précoces la réplication du virus dans les cellules infectées (Fredericksen and Gale, 2006; Muller and Young, 2013; Rossini et al., 2013). En effet, dans les étapes tardives du cycle, la réponse immunitaire innée n'est plus inhibée. L'inhibition momentanée de ces mécanismes par la protéine NS1 facilite donc la réplication du génome viral sans qu'elle soit altérée par la réponse antivirale. NS1 joue un rôle important dans la protection des étapes précoces du cycle infectieux des *Flavivirus*, dont le WNV. Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une activation du facteur de transcription IRF3 dans les cellules neuronales, suite à l'interaction potentielle de la forme sécrétée sNS1 avec TLR3. Nous constatons ici que contrairement à la forme intracellulaire, la protéine NS1 sécrétée active une réponse cellulaire. Nous formulons l'hypothèse que dans le cas d'une infection, la protéine sNS1 et la forme intracellulaire NS1 ont des fonctions antagonistes. La protéine sNS1 du WNV peut activer une réponse antivirale dans les cellules non infectées dans lesquelles, une fois infectée, la protéine NS1 intracellulaire peut l'inhiber. Cependant, il est difficile de déterminer si l'activation d'une réponse cellulaire fait partie intégrante de la biologie du virus et donc de la protéine sNS1 ou bien s'il s'agit d'un mécanisme mis en place par la cellule afin de se défendre vis-à-vis de l'infection par WNV.

La réponse immunitaire étant modulée, dérégulée et parfois incontrôlée à cause de la protéine sNS1, celle-ci participe à la pathogenèse observée dans les formes sévères d'infection par un *Flavivirus* (Avirutnan et al., 2006; Beatty et al., 2015; Modhiran et al., 2015). En effet, la protéine sNS1 de DENV induit une importante production de molécules pro-inflammatoires qui sont à l'origine de la perméabilisation de la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins. La production de cytokines pro-inflammatoires est dépendante de l'interaction de sNS1 avec le récepteur TLR4 à la surface des cellules immunitaires sanguines. Les cellules immunitaires alors activées, sécrètent des cytokines en grande quantité dans la circulation sanguine et ces molécules vont entraîner une hyperperméabilité des cellules endothéliales. Des effets pathogènes directs de la protéine sNS1 de DENV sur les cellules endothéliales ont récemment été décrits (Glasner et al., 2017). Ceux-ci sont indépendants

des cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules endothéliales puisque celles-ci sont peu stimulées par sNS1. Dans le cas de la protéine sNS1 du WNV, l'activation du facteur de transcription IRF3 par sNS1^{WNV-1598} que nous avons mise en évidence dans les cellules neuronales peut entraîner la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces molécules peuvent alors induire une perméabilisation des cellules épithéliales ou endothéliales constituant les barrières du SNC, facilitant ainsi l'afflux de particules virales dans le tissu (**Figure 74**). De même, les effecteurs immunitaires sécrétés peuvent être à l'origine de l'induction de la mort neuronale observée dans les lésions cérébrales durant les manifestations cliniques sévères telles que les encéphalites et méningites (**Figure 74**). En se basant sur la littérature existante et nos résultats, nous constatons que les fonctions de la protéine sécrétée sNS1 sont très diverses et impliquées dans des régulations fines de mécanismes importants pour l'hôte. Il est essentiel de noter que la pathogenèse observée durant l'infection par WNV ou d'autres *Flavivirus* est en grande partie liée à une dérégulation et parfois à une activation excessive des mécanismes de défense de l'hôte. On parle alors d'immunopathogenèse ([Chen et al., 2015](#); [Watterson et al., 2016](#)). De manière intéressante, d'autres protéines virales issues de virus éloignés, ont des fonctions similaires à la protéine sNS1. La protéine Tat de HIV et la protéine shed-GP du virus Ebola, toutes deux sécrétées durant l'infection, sont capables d'interagir avec des récepteurs de l'immunité innée et de déclencher une production massive de molécules pro-inflammatoires ([Bagashev and Sawaya, 2013](#); [Escudero-Pérez et al., 2014](#)). Molécules qui induisent ensuite des lésions du SNC (Tat^{HIV}) ou des fuites vasculaires rencontrées dans les fièvres hémorragiques dues au virus Ebola (Shed-GP^{EBOV}). Ainsi, il semblerait que même si les virus et leurs protéines sont très différents, il existe des similitudes fonctionnelles. On suppose alors qu'un grand nombre de virus partage des stratégies virales communes.

Des résultats préliminaires ont mis en évidence la formation de structures de type filopodes ou nanotubes dans les cellules exprimant la protéine NS1 du WNV. Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés par différentes approches, ils suggèrent une fonction nouvelle de la protéine NS1. NS1 pourrait alors être potentiellement impliquée dans le ou les mécanismes liés au cytosquelette qui induisent la formation de ces prolongements. Ces structures peuvent également être présentes naturellement, puisqu'elles participent à la communication intercellulaire ([Wittig et al., 2012](#)). Nos résultats mettent cependant en

évidence la présence de protéine NS1 dans ces structures. En tenant compte des propriétés immunogènes de la protéine sNS1 et de ses importantes interactions avec le système immunitaires une fois sécrétée, il est tout à fait possible qu'il existe un mécanisme alternatif pour le transfert de la protéine aux cellules naïves voisines. Un passage de sNS1 de cellule à cellule par l'intermédiaire de filopodes ou nanotubes est envisageable. La protéine virale serait ainsi transférée à d'autres cellules en échappant à la reconnaissance par le système immunitaire. Un transfert de matériel génomique ou bien de particules virales néoformées est également possible. De manière intéressante, ce type de mécanismes et l'utilisation de structures semblables pour le transfert de protéines virales ont été décrit dans le cadre d'une infection par les virus Influenza (Kumar et al., 2017). Il serait donc pertinent de continuer, par la suite, l'investigation de cette hypothèse concernant le virus West Nile et sa protéine NS1.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence de nouvelles fonctions de la protéine sNS1^{WNV-IS98} qui ne sont pas impliquées directement dans les étapes du cycle infectieux du WNV. La protéine sNS1^{WNV-IS98} semblerait intervenir dans des mécanismes déterminant l'atteinte du SNC par le WNV et la pathologie de la maladie associée. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette étude apporte des éléments de réponse et de nouvelles hypothèses quant aux fonctions de la protéine sNS1 du virus West Nile au cours des formes sévères d'infection.

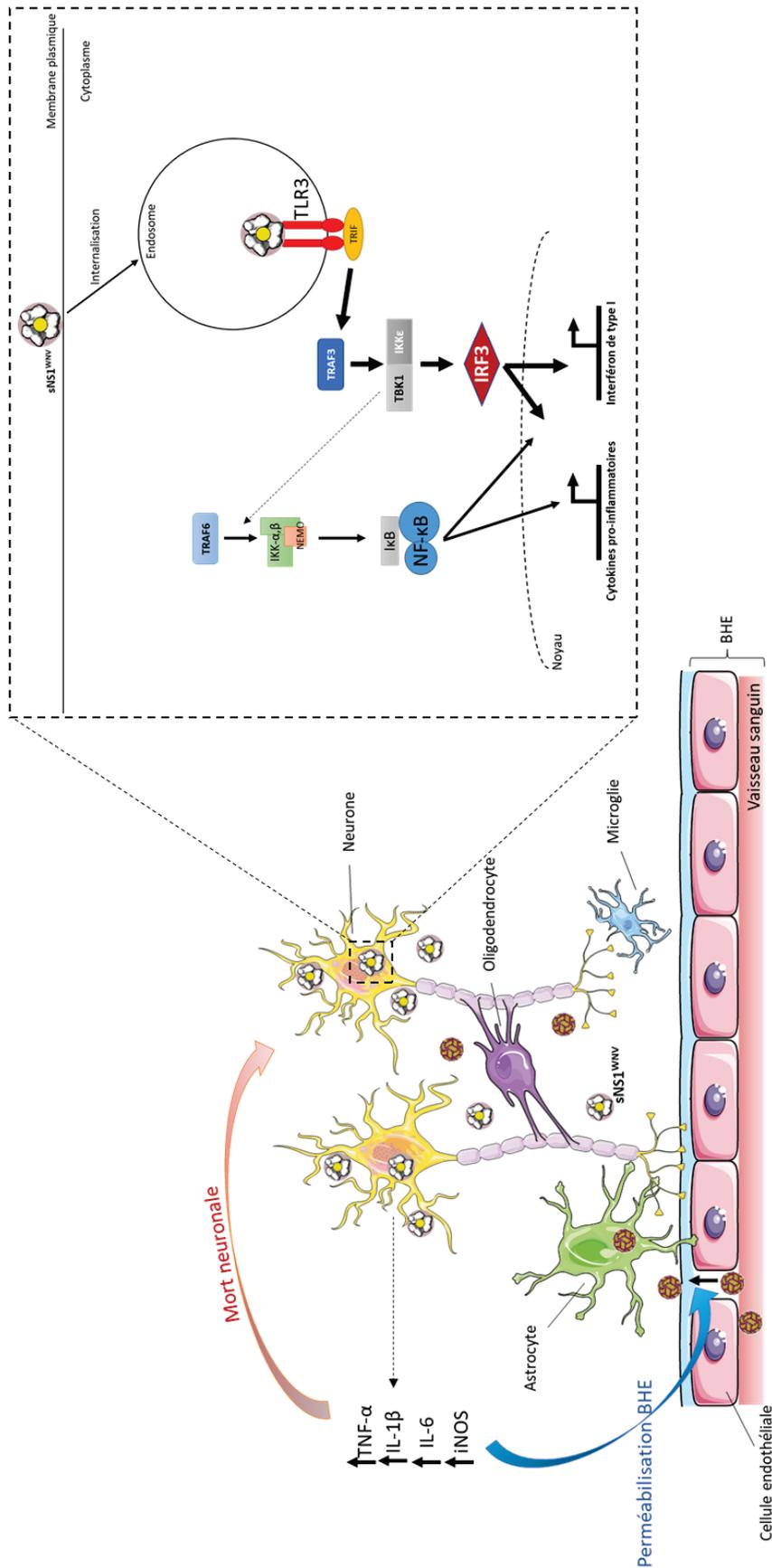


Figure 74 : Modèle de la fonction de sNS1^{WNV-1S98} dans l'activation des mécanismes de la réponse innée potentiellement liée à la mort neuronale et à la déstabilisation de la BHE lors de l'infection du SNC par WNV.

Chapitre 2

**Criblage de nouvelles molécules
dirigées contre le WNV à visées
diagnostic et antivirale**

I. Construction d'une plateforme de pseudotypage de la protéine d'enveloppe E du WNV

I.1 Contexte

Le pseudotypage consiste à incorporer une protéine de surface hétérologue, à la surface d'une particule virale. Un virus présente ainsi les protéines de surface d'un autre virus. Cette technique, couramment employée, permet d'étudier les propriétés et les fonctions des protéines virales de surface durant l'infection et en particulier l'entrée du virus dans la cellule hôte (Steffen and Simmons, 2016). D'autre part, certaines méthodes de diagnostic sont basées sur la séroneutralisation virale (Beck et al., 2013). Le sérum d'individus susceptibles d'être infectés par un virus, donc pouvant contenir des anticorps neutralisants contre ce dernier, est testé *in vitro* à différentes dilutions et un virus sauvage est utilisé pour infecter. Si une neutralisation par le sérum contenant les anticorps est observée, alors l'échantillon de sérum est considéré comme positif en test de neutralisation (PRNT) pour le virus donné. Certains virus nécessitant une manipulation en laboratoire de confinement de niveau 3 ou 4 (BSL3-4), un système de virus pseudotypés manipulables en niveau 2 est un atout. Cependant, les stratégies de pseudotypage des protéines d'enveloppe de certains virus, tels que les *Flavivirus* dont le WNV, sont confrontées à des verrous biologiques. En effet, les systèmes communément utilisés (système lentivirus et rétrovirus, système rhabdovirus) sont basés sur des virus dont le bourgeonnement a lieu à la membrane plasmique essentiellement (Steffen and Simmons, 2016). Or, dans le cas du WNV, la protéine d'enveloppe est localisée au RE, lieu de bourgeonnement du WNV. Nous sommes donc face à une incompatibilité des systèmes. Dans le cadre de notre projet, nous avons proposé une stratégie visant à relocaliser la protéine d'enveloppe E du WNV à la membrane plasmique de la cellule afin de rendre possible son incorporation par un système de pseudotypage. Ainsi, nous souhaitons développer une plateforme de pseudotypage de la protéine E du WNV dans le but d'une application en diagnostic (test de séroneutralisation) et comme cible pour le criblage de molécules antivirales dirigées contre la protéine E.

I.2 Matériel et méthodes

a. Cellules

Les cellules d'insectes Sf9 (cellules d'ovaires de *Spodoptera frugiperda*) (ATCC® CRL-1711™) étaient entretenues dans du milieu insectes Grace contenant de la L-Glutamine (Grace's insect medium, + L-Glutamine, Gibco) supplémenté de 10% SVF (Gibco), et d'un mélange Pénicilline (100U/ml)/Streptomycine (100µg/ml) (Gibco). Les cultures étaient incubées à 28°C, sans CO₂.

Les cellules HEK-293T (ATCC® CRL-3216™), étaient maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Gibco) avec 10% de SVF (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Virus

Pour produire des pseudovirus en système cellules mammifères, un virus VSVΔG, codant les gènes rapporteurs *Luc* et *GFP*, a été utilisé. Ce virus VSV est délété du gène codant la glycoprotéine d'enveloppe G (VSVg) qui est remplacé par des gènes rapporteurs codant la protéine Luciférase et la protéine GFP. Ce virus, lorsqu'il bourgeonne, peut ainsi incorporer une glycoprotéine hétérologue qui permettra l'infection de cellules cibles. Ce pseudovirus, étant délété du gène codant sa propre glycoprotéine, ne pourra pas conduire à la production de nouveau virions infectieux dans les cellules cibles infectées. Ces virions étant dépourvus de protéine de surface. On parle alors de « single round infectious particles ».

c. Construction d'un vecteur d'expression codant la glycoprotéine d'enveloppe E du WNV

Le gène *E* a d'abord été amplifié par PCR à partir du plasmide pJET1.2-E^{WNV-IS98} (ANSES, Maison-Alfort) en utilisant l'amorce 1 : 5' **GGAGATCTCATGTTAACTGC** 3' comme amorce "sens", et l'amorce 2 : 5' **GGAATTCTCGAGCTATTAAGCGTGAC** 3' comme amorce "anti-sens". L'amorce 1 (extrémité N-terminale du gène) contient un site BglII et l'amorce 2

(extrémité C-terminale) un site *EcoRI*. Le fragment de PCR E^{WNV} obtenu a ensuite été cloné dans le vecteur pBluescript SKII (Receveur 1) linéarisé par *EcoRV* (Fermentas) pour l'obtention d'extrémités franches permettant l'insertion de notre fragment via la ligase T4 DNA (Thermo Scientific) (**Figure 75**). Le plasmide obtenu a ensuite été digéré par les enzymes *BglIII* (Fermentas) et *XhoI* (Fermentas) afin de récupérer le fragment E^{WNV-IS98}. Il a ensuite été inséré dans le plasmide d'expression en système cellules d'insectes pIB/V5-His préalablement linéarisé par *BamHI-XhoI* (Fermentas), mettant à profit la compatibilité des extrémités *BglIII* et *BamHI* pour la ligation. Cette construction a été abrégée pIB-E^{WNV-IS98}. D'autre part, l'insert E^{WNV-IS98} a été récupéré dans le plasmide receveur 1 par digestion *BglIII-EcoRI* afin de le cloner en fusion avec le peptide signal (SP) du récepteur membranaire humain CD16 (séquence peptidique d'adressage à la membrane plasmique : MWQLLLPTALLLVLSAGMRTEDL) dans pBluescript SKII-SP, qui porte ce peptide signal (Receveur2). Après digestion par *BamHI-XhoI*, le fragment SP-E^{WNV-IS98} a été cloné dans pIB/V5-His (Receveur 3) préalablement linéarisé *BamHI-XhoI*. La construction obtenue est abrégée pIB-SP-E^{WNV-IS98}. En parallèle, les fragments E^{WNV-IS98} et SP-E^{WNV-IS98} ont été clonés dans le vecteur d'expression mammifère pcDNA3.1 préalablement linéarisé par le couple d'enzymes *BamHI-XhoI*. Les constructions obtenues ont été référencées comme pcDNA-E^{WNV-IS98} et pcDNA-SP-E^{WNV-IS98} (**Figure 76**).

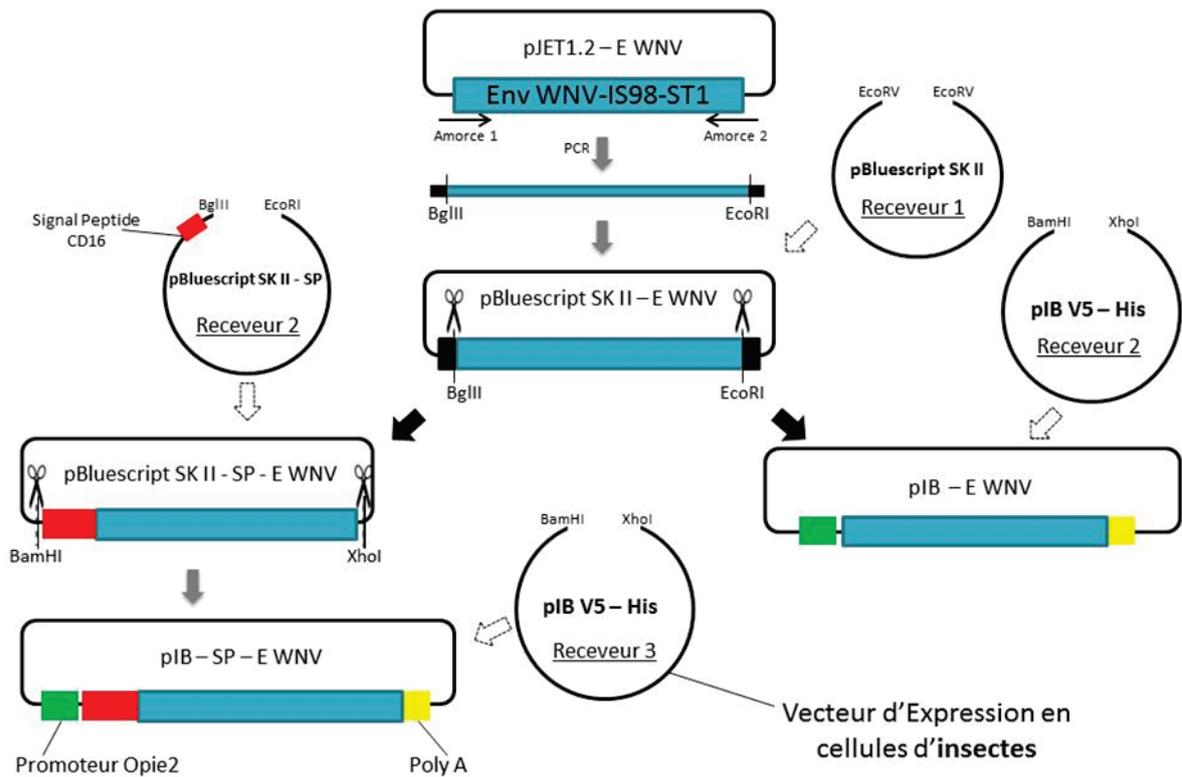


Figure 75 : Représentation schématique de la stratégie de clonage du gène E en vecteur d'expression insecte.



Figure 76 : Plasmides exprimant le gène E de l'enveloppe du WNV en cellules de mammifères.

d. Etablissement d'une lignée stable de cellules Sf9 exprimant la protéine E^{WNV-IS98}

Les cellules Sf9 ont été ensemencées en plaque 6 puits (Nunc) et incubées à 28°C. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec les constructions pIB-E^{WNV-IS98} et pIB-SP-E^{WNV-IS98} (5µg) à l'aide du transfectant DOTAP (Sigma-Aldrich) suivant les recommandations

du fournisseur. Après 4h d'incubation, le milieu des cellules a été remplacé par 2mL de milieu insectes Grace 15% SVF, et la plaque incubée à 28°C durant la nuit. 24h post-transfection, le milieu a été changé (2 mL de milieu insectes Grace 15% SVF) et l'antibiotique Blastidine (Life Technologies) a été ajouté à une concentration de 15 µg/ml pour la sélection des cellules positives via le gène de résistance à la Blastidine porté par les constructions plasmidiques. Les lignées stables obtenues après environ 10 ou 15 jours (Sf9-E^{WNV}, Sf9-SP-E^{WNV}) ont ensuite été maintenues dans du milieu de Grace 15% SVF additionné de 10 µg/ml de Blastidine.

e. Western Blot

Les protéines totales extraites des cellules sont additionnées de tampon Laemmli 5X contenant du β-Mercaptoéthanol puis chauffées à 95°C pendant 5 min afin d'être dénaturées. Les échantillons ont été séparés sur gel SDS-PAGE, 10% polyacrylamide. La migration des protéines s'effectue à voltage constant de 110V dans du tampon de migration dans un système Protean 3TM (Bio-Rad). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Le transfert s'effectue dans une cassette du système TransBlot (Bio-Rad) 2,5A, 25V, 10 min. Les sites non spécifiques des membranes ont été saturés en incubant les membranes pendant 1h dans une solution (TNT) contenant 5% de lait écrémé. Puis les membranes ont été incubées avec un anticorps primaire, dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué dans du TNT contenant 1-2% de lait écrémé, sur la nuit à +4°C ou pendant 4h à TA, sous agitation. Les membranes sont ensuite lavées par des bains successifs de TNT puis incubées 1h sous agitation avec un anticorps secondaire, conjugué à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline, dirigé contre l'anticorps primaire. Après minimum 3 lavages au TNT, les membranes ont été révélées soit à l'aide du kit SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) et du système Cawomat, soit par réaction enzymatique colorée, à l'aide du substrat de l'enzyme peroxydase OPD peroxidase (Sigma-Aldrich) ou avec le substrat de la phosphatase alcaline (BCIP + NBT), selon les recommandations des fournisseurs.

Les anticorps utilisés, leur référence et leur dilution sont listés dans le **Tableau 13**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-E^{DIII} WNV (serum)	Lapin	Sérum/ANSES	1/2000
Anti-IgG de lapin couplé HRP	Chèvre	A0549/Sigma-Aldrich	1/10000
Anti-IgG de lapin couplé Phosphatase Alcaline	Chèvre	A3687/Sigma-Aldrich	1/5000

Tableau 13 : Anticorps et leur condition d'utilisation en Western Blot pour la détection intracellulaire de l'expression de la protéine E^{WNV-IS98}.

f. Détection de la protéine E^{WNV-IS98} par Immunofluorescence indirecte

Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 min à TA, avant d'être perméabilisées ou non avec une solution de PBS 0,5% Triton X100 pendant 15 min à TA. La saturation a été réalisée avec du PBS 0,1% Triton X100 + 5% FBS pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine d'enveloppe E du WNV, sur la nuit à +4°C. Le lendemain, les cellules ont été rincées 3x au PBS 0,1% Triton X100 puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorochrome AlexaFluor 488 dans du PBS 0,1% Triton X100 pendant 1h à TA. Après 3 rinçages au PBS 0,1% Triton X100, les cellules ont été incubées pendant 15 min avec une solution de 4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dihydrochloride (DAPI) afin de marquer les noyaux. Enfin, après lavages au PBS, les LabTek étaient montées avec lamelles grâce au liquide de montage VectaMount AQ (Vector). Les observations ont été faites en microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope AxioVert 135 (Zeiss). Les anticorps, leur référence ainsi que la dilution utilisée, sont listés dans le **Tableau 14**.

Anticorps	Hôte de production	Référence/fournisseur	Dilution
Anti-E ^{WNV}	Souris	Clone 3.67G/Millipore	1/200
Anti-IgG de souris AlexaFluor488	Chèvre	A11029/Invitrogen	1/500

Tableau 14 : Anticorps et leur condition d'utilisation en immunofluorescence indirecte pour la détection de la protéine E^{WNV-IS98}.

g. Production de VLP-E^{WNV-IS98} en système cellules mammifères-HIV

Les cellules HEK-293T ont étéensemencées à une densité de 4.10^6 cellules en boîte de Petri ou de 5.10^5 cellules par puits en plaque 6 puits. Le lendemain, les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les constructions pcDNA-E^{WNV-IS98} ou pcDNA-SP-E^{WNV-IS98} et avec le plasmide codant les protéines Gag-Pol de HIV-1 et un gène rapporteur *Luciférase* (pNL4-3-Luc) à l'aide de Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Un plasmide codant la glycoprotéine VSVg a été utilisé comme contrôle positif du pseudotypage. 6h après transfection, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu frais (DMEM, 10% SVF) et ont été incubées pendant 48h à 37°C, 5% CO₂. Après incubation, les surnageants ont été récoltés, filtrés sur membranes de 0,45µm puis concentrés ou non (Figure 77).

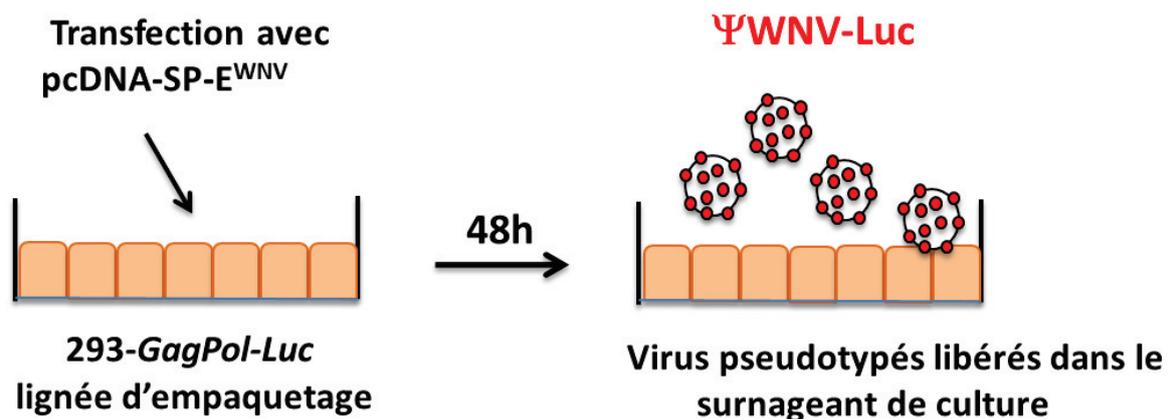


Figure 77 : Représentation schématique de la production de vecteur lentiviral pseudotypé.

h. Production de pseudotypes- $E^{WNV-IS98}$ en système cellules mammifères-VSV

Les cellules HEK-293T ont étéensemencées à une densité de 4.10^6 cellules en boîte de Petri ou de 5.10^5 cellules par puit en plaque 6 puits. Le lendemain, les cellules HEK-293T ont été transfectés avec les constructions pcDNA- $E^{WNV-IS98}$ ou pcDNA-SP- $E^{WNV-IS98}$ à l'aide de Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Un plasmide codant la glycoprotéine VSVg a été utilisé comme contrôle positif du pseudotypage. Après 6h d'incubation, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu frais (DMEM, 10% SVF) et incubées à 37°C, 5% CO₂. 24h après transfection, les cellules ont été infectées avec le virus VSVΔG (Rhabdovirus) codant la Luciférase et la GFP, pendant 36h. Les surnageants ont ensuite été récoltés, filtrés sur membranes de 0,45μm puis concentrés ou non (**Figure 78**).

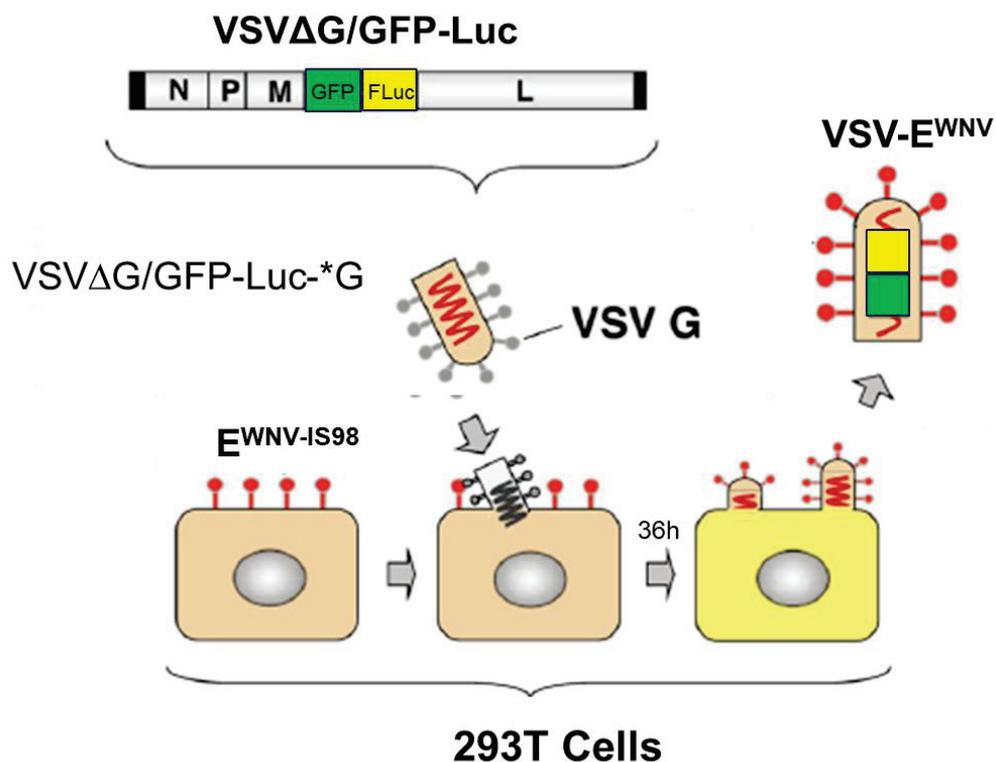


Figure 78 : Représentation schématique de la production de virus VSV pseudotypés.

i. Purification des VLP et des pseudotypes

Les VLP ou les pseudotypes produits en système cellules mammifères ont été purifiés et concentrés par centrifugation à l'aide d'unité d'ultrafiltration sur double membrane contenant des pores d'exclusion de 100 kDa (Vivaspin 20, 100 kDa MWCO, Sartorius). Les recommandations du fournisseur ont été suivies. Après concentration, les surnageants contenant les VLP ou les pseudotypes ont été stockés à +4°C jusqu'à utilisation pour infection de cellules cibles (maximum 3 jours).

j. Infection de cellules cibles avec les VLP ou les pseudotypes produits en système mammifère.

Les cellules cibles (HEK-293T, VeroE6, U87MG et SH-SY5Y) ont étéensemencées à une densité d'environ $5-6 \cdot 10^4$ cellules par puits en plaque 48 puits. Le lendemain, les cellules ont été infectées avec différents volumes de surnageant contenant les VLP ou les virus VSV Δ G pseudotypés (concentrés ou non) puis incubées pendant 24, 48 ou 72h. Après incubation, les cellules infectées ont été soit récoltées puis lysées, afin de tester l'activité luciférase, soit observées en microscopie à fluorescence ou analysées par cytométrie en flux afin de détecter les cellules GFP positives.

I.3 Résultats

I.3.1 La protéine E^{WNV-IS98} est exprimée dans les lignées stables Sf9-E^{WNV} et Sf9-SP-E^{WNV}

Chacune des constructions plasmidiques a été transfectée indépendamment en cellules d'insectes Sf9. Les plasmides d'expression portant un gène de résistance à la Blastidicine, nous avons sélectionné, via cet antibiotique toxique pour les cellules sauvages, les clones positifs à la transfection. Après environ 15 jours de sélection, nous avons analysé par Western Blot l'expression de la protéine E^{WNV-IS98} dans les cellules résistantes. La glycoprotéine E^{WNV-IS98} est exprimée dans les deux lignées cellulaires stables, Sf9-E^{WNV} et Sf9-SP-E^{WNV} (**Figure 79**). Cependant, le niveau d'expression est nettement supérieur dans la lignée Sf9-SP-E^{WNV} par rapport à la lignée Sf9-E^{WNV}. De plus, la protéine E^{WNV-IS98} fusionnée avec SP migre avec une masse moléculaire apparente plus élevée que E^{WNV-IS98} dépourvue de peptide signal. Ceci correspondant aux valeurs théoriques \pm SP (3 kDa). Le peptide signal, ainsi, ne semble pas être clivé au sein de la cellule. Ces résultats suggèrent que l'expression de E^{WNV-IS98} dans les cellules Sf9-SP-E^{WNV} est plus stable que dans la lignée Sf9-E^{WNV}. Nous avons supposé qu'étant dépourvue de peptide signal (y compris celui de la polyprotéine virale), la protéine E^{WNV-IS98} exprimée dans les cellules Sf9-E^{WNV} pouvait être rapidement dégradée par la voie du protéasome. En effet, la protéine aurait en théorie une localisation cytoplasmique sans fonction particulière dans la cellule, conduisant à sa dégradation. Ceci contrairement à la protéine d'enveloppe exprimée dans la lignée Sf9-SP-E^{WNV}, qui grâce au peptide signal du récepteur membranaire humain CD16 est supposée être adressée à la membrane plasmique des cellules.

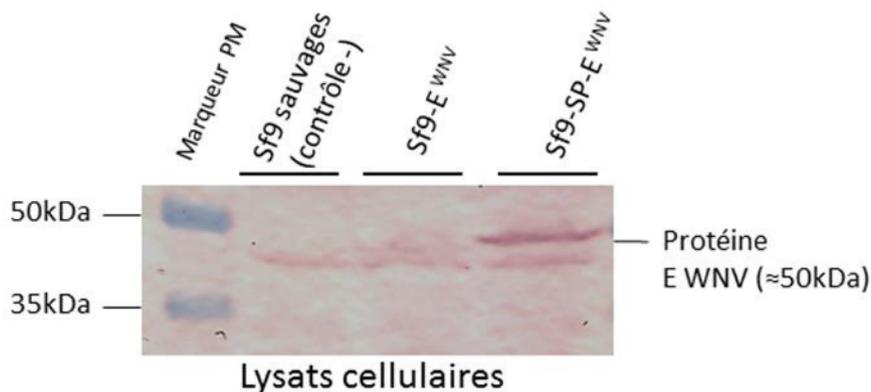


Figure 79 : Expression de la protéine $E^{WNV-IS98}$ dans les lignées stables $Sf9-E^{WNV}$ et $Sf9-SP-E^{WNV}$. Influence de la présence du peptide signal (SP) à l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine E du virus WNV ($SP-E^{WNV}$) sur la stabilité intracellulaire de cette glycoprotéine, comparée à la forme E^{WNV} , dépourvue de SP. Les deux lignées sélectionnées $Sf9-E^{WNV}$ et $Sf9-SP-E^{WNV}$ expriment la protéine $E^{WNV-IS98}$. Le signal est cependant plus important dans les cellules $Sf9-SP-E^{WNV}$ par rapport aux cellules $Sf9-E^{WNV}$. Aucun signal n'est détecté dans les cellules Sf9 contrôles. La protéine $E^{WNV-IS98}$ a été détectée (bandes à 48-50 kDa) par un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine d'enveloppe E du WNV. L'anticorps secondaire utilisé étant conjugué à l'enzyme peroxydase (HRP), la révélation colorée a été réalisée avec le substrat OPD peroxydase (Sigma-Aldrich).

1.3.2 La protéine $E^{WNV-IS98}$ est localisée à la membrane plasmique des cellules $Sf9-SP-E^{WNV}$

Afin de valider notre hypothèse et notre stratégie quant au rôle du peptide signal SP dans l'adressage membranaire, nous avons analysé la localisation cellulaire de la glycoprotéine $E^{WNV-IS98}$ dans les deux lignées obtenues. Le marquage de la glycoprotéine $E^{WNV-IS98}$ a été effectué par immunofluorescence indirecte sans perméabilisation des cellules. Les cellules Sf9 témoins non transfectées ne présentent aucune fluorescence spécifique de la protéine $E^{WNV-IS98}$ en microscopie confocale (**Figure 80**). Les cellules $Sf9-E^{WNV}$ présentent un faible marquage, de type ponctiforme, au niveau de la membrane plasmique. Cette faible détection de la protéine $E^{WNV-IS98}$, en absence de perméabilisation, suggère que peu de protéines d'enveloppe du WNV sont présentes à la surface cellulaire. En comparaison, un signal important est observable à la surface des cellules $Sf9-SP-E^{WNV}$. Nous avons, en effet, pu constater la présence d'un liseré (en vert) qui délimite le contour des cellules (**Figure 80**).

Cette détection de la protéine $E^{WNV-IS98}$ sans perméabilisation traduit une localisation à la surface cellulaire, au niveau de la membrane plasmique, des cellules exprimant la construction pcDNA-SP- E^{WNV} . Les résultats obtenus ont ainsi mis en évidence une localisation membranaire et une présentation en surface de la protéine d'enveloppe E du WNV dans les cellules Sf9 exprimant la construction pIB-SP- E^{WNV} . Le peptide signal du récepteur membranaire humain CD16, lorsqu'il est en fusion avec l'extrémité N-terminale de la protéine $E^{WNV-IS98}$, permet son adressage à la membrane plasmique de la cellule. Les cellules Sf9-SP- E^{WNV} représentent alors un système potentiel pour le pseudotypage de la protéine d'enveloppe du WNV.

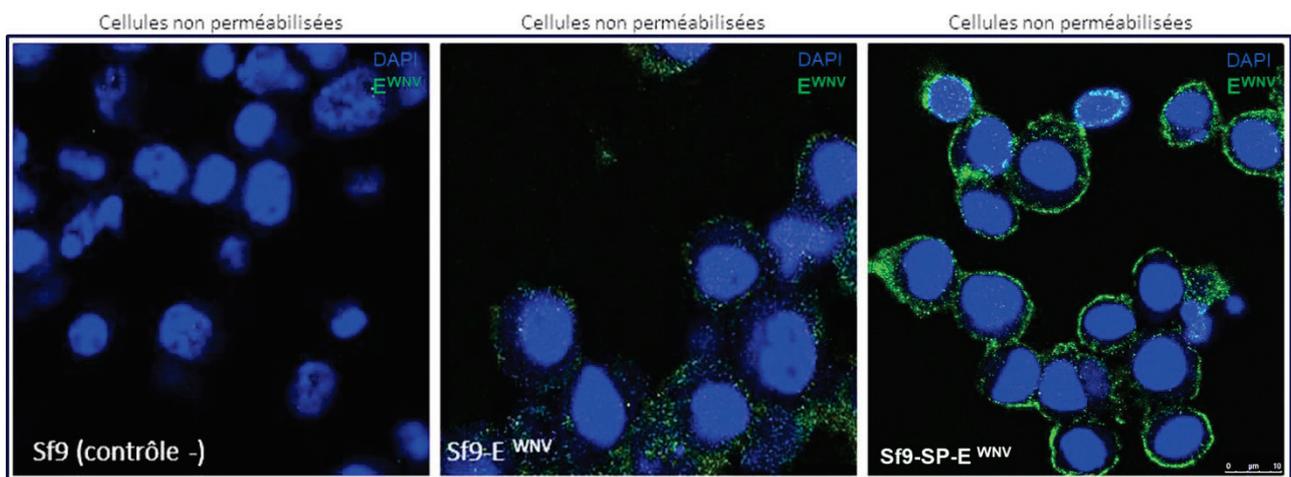


Figure 80 : Localisation de $E^{WNV-IS98}$ à la surface des lignées stables Sf9- E^{WNV} et Sf9-SP- E^{WNV} par immunofluorescence indirecte. La protéine E du WNV a été détectée par immunomarquage, sans perméabilisation, des cellules Sf9 exprimant de manière constitutive la protéine $E^{WNV-IS98}$. La protéine $E^{WNV-IS98}$ est faiblement détectée à la surface des cellules Sf9- E^{WNV} . Elle est accessible en grande quantité à la surface des cellules Sf9-SP- E^{WNV} .

1.3.3 Pseudotypage de la protéine d'enveloppe $E^{\text{WNV-IS98}}$ en système cellules de mammifères

1.3.3.1 Expression de $E^{\text{WNV-IS98}}$ dans les cellules de mammifères transfectées

Après la preuve de concept obtenue en cellules d'insectes, nous souhaitons étendre ce système en cellules de mammifères. En effet, contrairement aux cellules d'insectes, nous disposons de différents systèmes de virus rapporteurs compatibles en cellules de mammifères. Notre objectif était alors de démontrer l'infectiosité de particules virales pseudotypées avec l'enveloppe du WNV dans un but d'application potentielle en test de séroneutralisation virale.

Nous avons tout d'abord vérifié par Western Blot l'expression en cellules HEK-293T de la protéine $E^{\text{WNV-IS98}}$ codée par les constructions pcDNA- E^{WNV} et pcDNA-SP- E^{WNV} . Un profil similaire au système cellules d'insectes a été observé. La protéine $E^{\text{WNV-IS98}}$ était exprimée dans les cellules HEK-293T transfectées par les deux constructions, mais avec un signal plus important dans le lysat des cellules transfectées avec pcDNA-SP- E^{WNV} (**Figure 81**). Des observations similaires ont été réalisées par immunofluorescence indirect (**Figure 82**). Une fois encore, le faible niveau d'expression de $E^{\text{WNV-IS98}}$ dans les cellules contenant pcDNA- E^{WNV} peut s'expliquer par une dégradation rapide de la protéine d'enveloppe. Tandis que la fusion de $E^{\text{WNV-IS98}}$ avec le peptide signal du récepteur CD16 permettrait son adressage à la membrane plasmique des cellules.

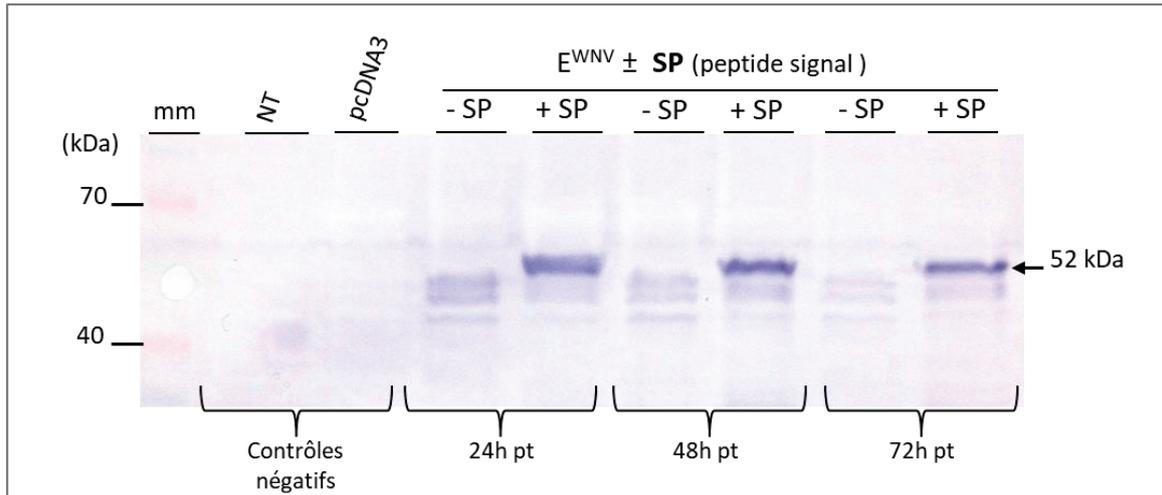


Figure 81 : Analyse par Western Blot de l'expression de la protéine $E^{WNV-IS98}$ dans les cellules HEK-293T. Influence de la présence du peptide signal (SP) à l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine E du virus WNV ($SP-E^{WNV}$) sur la stabilité intracellulaire de cette glycoprotéine, comparée à la forme E^{WNV} , dépourvue de SP. Profil d'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de lysats de cellules récoltées à des temps successifs, montrant la persistance dans le temps de la glycoprotéine $SP-E^{WNV}$, forme de masse moléculaire 52 kDa (flèche). La protéine $E^{WNV-IS98}$ a été détectée par un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine d'enveloppe E du WNV. L'anticorps secondaire utilisé étant conjugué à l'enzyme phosphatase alcaline, la révélation colorée a été réalisée suite à l'ajout du substrat BCIP+NBT (Sigma-Aldrich).

24h pt

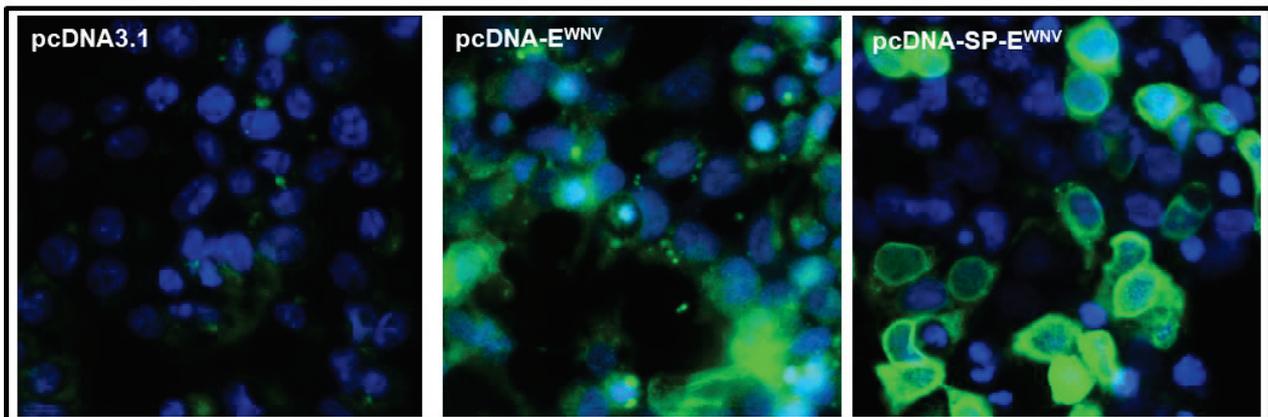


Figure 82 : Observations par immunofluorescence indirecte de l'expression de la protéine $E^{WNV-IS98}$ dans les cellules HEK-293T. Les cellules HEK-293T ont été transfectées par le plasmide codant la protéine $E^{WNV-IS98}$ ou le vecteur vide comme contrôle négatif. La protéine $E^{WNV-IS98}$ est détectée dans les cellules perméabilisées, 24h après transfection avec $pcDNA-E^{WNV}$ et $pcDNA-SP-E^{WNV}$. La localisation de $E^{WNV-IS98}$ est plus diffuse dans les cellules exprimant $pcDNA-E^{WNV}$ par rapport à $pcDNA-SP-E^{WNV}$ où on observe un marquage intense autour du noyau ainsi qu'à la membrane plasmique. Un anticorps souris dirigé contre la protéine $E^{WNV-IS98}$ et un secondaire conjugué à AlexaFluor 488 ont été utilisés.

I.3.4 Incorporation de la protéine $E^{WNV-IS98}$ dans les VLP lentivirales en système cellules mammifères

Après ultracentrifugation sur coussin de saccharose, le contenu protéique des VLP- E^{WNV} resuspendues a été analysé par Western Blot. Nous avons pu observer que la protéine $E^{WNV-IS98}$ était détectée dans les VLP issues des cellules HEK-293T exprimant la construction pcDNA-SP- E^{WNV} (**Figure 83**). A contrario, la protéine $E^{WNV-IS98}$ n'était pas détectable dans les VLP produites dans les cellules HEK-293T transfectées avec pcDNA- E^{WNV} . Ces résultats sont similaires avec ce que nous avons observé en système cellules d'insectes. Ils permettent ainsi de valider à nouveau l'utilisation du peptide signal du récepteur CD16 (SP) en fusion avec la protéine $E^{WNV-IS98}$ afin de pseudotyper des particules lentivirales ou rhabovirales avec la protéine d'enveloppe du WNV.

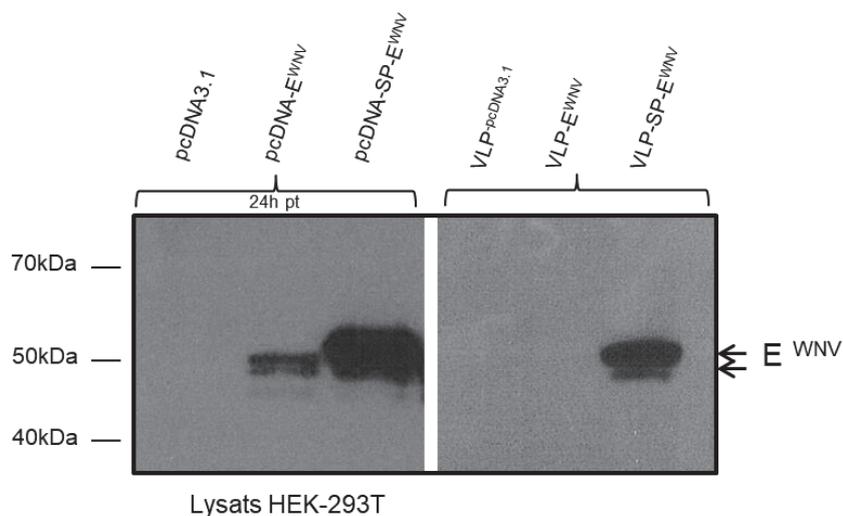


Figure 83 : Détection de la protéine $E^{WNV-IS98}$ après ultracentrifugation des VLP. La protéine $E^{WNV-IS98}$ est exprimée dans les cellules HEK-293T transfectées avec pcDNA- E^{WNV} et pcDNA-SP- E^{WNV} . Mais la protéine $E^{WNV-IS98}$ est seulement détectée dans les VLP issues des cellules transfectées avec pcDNA-SP- E^{WNV} (VLP-SP- E^{WNV}). La protéine $E^{WNV-IS98}$ a été révélée par chimioluminescence après incubation avec un anticorps anti- E^{WNV} .

I.3.5 Infection des cellules cibles avec les VLP lentivirales ou les pseudotypes VSV

Nous avons, dans un premier temps, utilisé un système lentiviral GagPol^{HIV-1}, exprimant le gène rapporteur *luciférase*, afin de produire les VLP pseudotypées avec la glycoprotéine d'enveloppe E du WNV. Nous avons ensuite infecté les différentes cellules cibles avec le surnageant afin de tester l'infectiosité de ces VLP-E^{WNV}. Malgré l'essai de différentes conditions, (quantité de plasmide enveloppe transfectée, temps avant récolte des VLP, concentration ou non des VLP, volume d'infection avec les VLP, temps d'infection), la détection d'une activité luciférase n'a pas été possible après infection avec les VLP-E^{WNV}. L'infection par le contrôle positif VLP-^{VSVg} permettait quant à elle la détection d'un important signal d'activité luciférase. Notons tout de même que nous avons parfois réussi à obtenir un signal significatif après infection des cellules cibles (VeroE6) avec les VLP-SP-E^{WNV} (**Figure 84**). Néanmoins, ces résultats étaient variables et la reproductibilité plus faible qu'attendue.

Dans un second temps, un système lentiviral GagPol^{HIV-1} exprimant la protéine fluorescente GFP a été utilisé. L'expression de la GFP, suite à l'infection par les VLP, permettant une observation des cellules infectées directement par microscopie à fluorescence. Nous avons fait le même constant qu'avec le système précédent, aucune cellule infectée (GFP positive) n'était observable après infection avec les VLP-E^{WNV}, contrairement au contrôle positif VLP-^{VSVg}. Ces résultats semblent suggérer que les VLP pseudotypées avec la protéine E^{WNV-IS98} ne sont pas, ou trop peu, infectieuses. Il est possible que la conformation de E^{WNV-IS98} à la surface des VLP ne soit pas optimale pour conférer une bonne capacité d'infection des cellules cibles.

Enfin, nous avons réalisé des expériences avec un système VSV (rhabdovirus), délété de sa propre glycoprotéine VSVg, portant les gènes rapporteurs *GFP* et *luciférase* (VSVΔG-GFP-Luc). Ce système est décrit pour être plus efficace pour certaines protéines d'enveloppe, notamment celles d'arbovirus. Le système est d'ailleurs utilisé avec succès pour le pseudotypage de la protéine d'enveloppe du RVFV. Cependant, les différentes expériences d'infection se sont soldées par un échec. L'activité luciférase ainsi qu'un signal GFP n'ont pas été détectés de manière significative dans les cellules cibles.

Ces résultats, surprenants en soi, nous amènent à penser que le système de pseudotypage nécessite d'être optimisé. Nous sommes actuellement en train de réfléchir quant à une stratégie afin d'optimiser le système afin d'aboutir à son utilisation dans le but d'étudier certains aspects de l'entrée du WNV dans la cellule mais aussi et surtout d'obtenir un outil utilisable en séroneutralisation en laboratoire confiné de niveau 2 (BSL2), au lieu de BSL3 actuellement avec le virus sauvage.

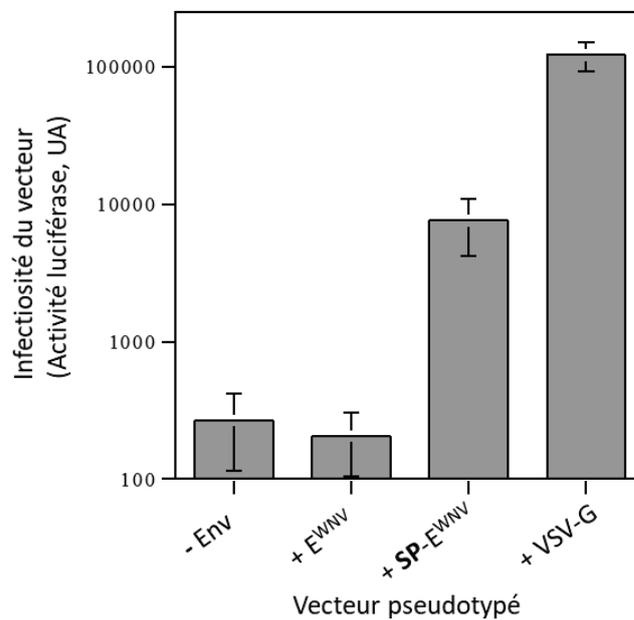


Figure 84 : Test de l'infectiosité des VLP rétrovirales en cellules VeroE6. Pseudotypage d'un vecteur rétroviral exprimant la luciférase par les glycoprotéines E^{WNV}, SP-E^{WNV} ou VSV-G : influence de la nature de cette glycoprotéine sur l'infectiosité du vecteur, mesurée par l'activité de l'enzyme luciférase transférée par le vecteur dans les cellules cibles, et exprimée en unités arbitraires (UA).

II. Criblage de la banque de molécules α -Rep contre les protéines virales E et sNS1

II.1 Contexte

Les protéines α Rep, pour alpha-repeat proteins, sont une nouvelle famille de molécules artificielles constituées de motifs hélice- α répétés à l'instar d'autres molécules telles que les DARPins (Design Ankyrin Repeat Proteins) (**Figure 85**). Les DARPins sont dérivées des molécules naturelles ankyrines (**Figure 85**) (Binz et al., 2003; Forrer et al., 2003). Les ankyrines sont de petites protéines ubiquitaires à motif répétés (structure en hélice- α) impliquées dans de nombreuses interactions protéine-protéine au niveau intracellulaire. Les protéines α Rep sont quant à elles basées sur d'autres molécules naturelles de ce type, les protéines HEAT repeats, retrouvées à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes. Les molécules dérivées de ces protéines ont été ingénierés afin d'exposer une surface d'interaction capable de se lier à une cible d'intérêt (Urvoas et al., 2010, 2012). Ces travaux ont été réalisés dans l'unité du Pr Philippe Minard (UMR-8619 CNRS, IBBMC, Université Paris Sud, Orsay) et leur application fait, depuis, l'objet d'une collaboration. Ces molécules ont été nommées α Rep du fait de leur structure constituée d'une paire d'hélice- α (un module) (**Figure 86 A**). Néanmoins, les protéines α Rep peuvent être constituées d'un enchainement de plusieurs modules, de 1 à 12 (**Figure 86 B**). Les protéines α Rep miment des anticorps, sans en avoir certaines de leurs limitations. En effet, elles sont facilement productibles en système bactérien et ne sont pas dépendantes de ponts disulfure. De plus, elles possèdent des propriétés hautement thermostables, puisque leur structure et leur conformation sont conservées jusqu'à plus de 70°C (Urvoas et al., 2010). Enfin, elles sont décrites pour avoir des propriétés d'interaction avec la structure tridimensionnelle d'une protéine cible. Contrairement aux anticorps qui interagissent avec des motifs spécifiques au sein d'une séquence peptidique.

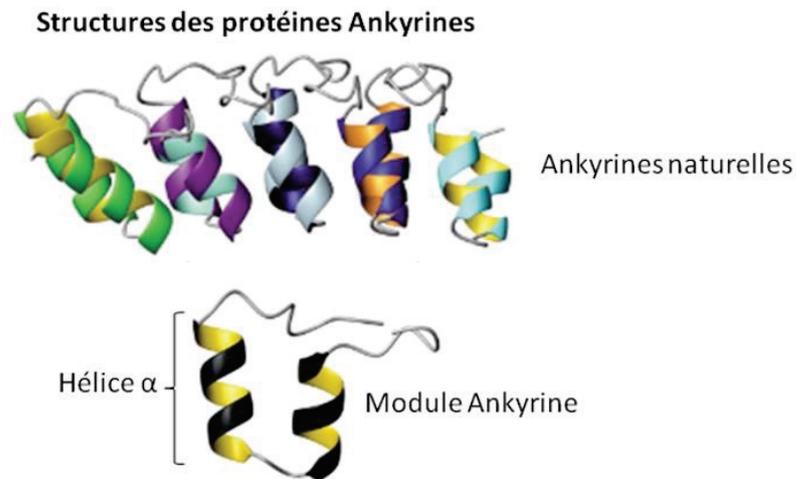


Figure 85 : Représentation de la structure des ankyrines et DARPin.

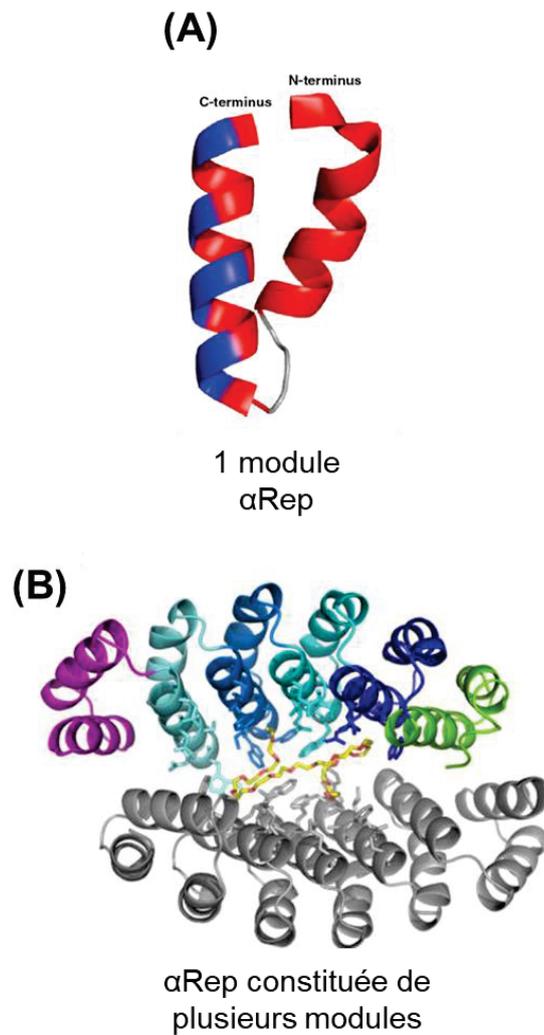


Figure 86 : Représentation de la structure des protéines α Rep.

Du fait de leurs propriétés d'interactions protéine-protéine, elles représentent des molécules d'intérêt vis-à-vis de cibles virales telles que la protéine d'enveloppe $E^{WNV-IS98}$ et de la protéine $sNS1^{WNV-IS98}$. De façon intéressante, les molécules ont déjà démontré leurs propriétés antivirales vis-à-vis du modèle HIV, faisant d'elles une nouvelle classe d'inhibiteurs d'infections virales (Hadpech et al., 2017; Khamaikawin et al., 2015). Une molécule α Rep dirigée contre la protéine d'enveloppe E du WNV pourrait alors se fixer sur la protéine $E^{WNV-IS98}$ à la surface des particules virales et potentiellement inhiber son attachement à la cellule hôte, donc l'infection. D'autre part, des molécules α Rep interagissant avec la protéine $sNS1$ pourraient être envisagées comme remplacement des anticorps dans le cadre d'une approche de diagnostic. La protéine $sNS1$ étant un marqueur précoce d'une infection par un *Flavivirus*, sa détection dans le sang dans le cadre d'un test de diagnostic est déjà appliquée. Cependant, la production de ce type de kit de diagnostic, du fait de la production d'anticorps spécifiques, a un coût élevé.

La technologie du phage display permet un criblage rapide et à haut débit (de l'ordre du milliard de clones) de phages recombinants portant une bibliothèque de peptides aléatoires, tels que les α Rep, pour une cible prédéfinie (Guellouz et al., 2013; Pande et al., 2010; Steiner et al., 2008). Ces protéines sont présentées à une extrémité du phage, constituant la région d'attachement à la surface de son hôte bactérien, ou dans notre cas, à une cible virale.

Le criblage de la banque de molécules α Rep contre les cibles virales E et $sNS1$ du WNV ont pu être réalisées dans le cadre d'un projet collaboratif international avec la Thaïlande (programme franco-thaï PHC SIAM) impliquant les universités de Phayao, de Chiang Mai et Mahidol à Bangkok.

II.2 Matériel et méthodes

a. Criblage de la banque de molécules α -Rep par Phage Display

La bibliothèque de phages recombinants codant les α Rep, d'une taille et diversité d'environ $2 \cdot 10^9$ molécules différentes, provient de l'équipe du Pr Philippe Minard (UMR-8619 CNRS, IBBMC, Université Paris Sud, Orsay), où les α Rep ont été ingénierées. La

bibliothèque α Rep a été criblée grâce à la technologie du phage display (**Figure 87**). En bref, les cellules Sf9-SPE^{WNV} (5.10^4 cellules par puits + 50 μ L PBS) ou la protéine sNS1^{WNV-IS98} (5 μ g) ont été incubées dans des immuno-modules à 8 puits (Immuno modules Maxisorp, Nunc) durant la nuit afin de permettre l'adhésion des cellules ou de la protéine sNS1 au fond des puits. Des puits contrôles contenant les cellules Sf9 sauvages sans glycoprotéine à la surface ou du Ctrl^{pcDNA3.1} ont aussi été préparés. Les puits ont été saturés avec une solution de TBS-Tween 0.1%, 2% de BSA pendant 1 h à TA. Après décongélation de la bibliothèque, et resuspension dans du TBS-T stérile contenant de la BSA à 20%, les phages ont été inoculés dans les puits et placés sous agitation pendant 2h à 37°C. Après 15 lavages successifs avec du TBS-T, suivis de 15 lavages avec du TBS, les phages ont été élués dans du tampon d'éluion acide (0.1M glycine, pH 2.5). Les phages issus du dernier lavage (50 μ L) ont été inoculés à une culture bactérienne de XL1-Blue, qui a étéensemencée sur grande boîte de Petri contenant une gélose imprégnée de milieu LB + Ampicilline, afin d'isoler les clones de phages apportant la résistance à l'antibiotique. Chaque colonie (correspondant à un clone de phages) a été récupérée le lendemain et suspendue dans 10 mL de LB, dont 300 μ L ont été ajoutés à 100 mL de LB + Amp + Tetra + Glucose et incubés sous agitation pendant 4 h à 37°C (DO= 0.6-1.0). 4 mL de phage *helper* (M13K07, Kan^r) ont été ajoutés à la culture bactérienne et placés à 37°C, pendant 30 min (sans agitation pour permettre la formation des pili), puis 30 min sous agitation légère. Une fois la culture centrifugée, le culot a été resuspendu dans 200mL de LB+Amp+Kan+IPTG (induction de la production de α -Rep), et la suspension incubée durant la nuit sous rotation à 200rpm. Pour les autres cycles, le surnageant (qui contient les phages) de la culture obtenue après une nuit est utilisé pour ajouter sur des puits ayant adsorbés les cellules Sf9-SP-E^{WNV} ou la protéine sNS1^{WNV-IS98}. 3 cycles de sélection ont ainsi été réalisés.

b. Analyse de la spécificité des clones α -Rep isolés pour la protéine E^{WNV-IS98} ou sNS1^{WNV-IS98} par ELISA indirect.

Dans la population de colonies isolées, environ 500 colonies ont été prises au hasard et mises en culture en plaques 96 puits (Nunc) dans du bouillon de culture 2XYT+Amp+1% glucose afin de les amplifier. Les témoins négatifs ont consisté en des puits contenant soit

uniquement du milieu de culture seul, soit du milieu + XL1-B. Ces plaques constituaient les plaques de références de chacun des clones testés (Master Plates 1 à 6). Les phages correspondant à chaque clone de α -Rep ont ensuite été amplifiés et produits via l'ajout de phages *helper* (M13K07, Kan^r) puis, après centrifugation, le surnageant viral (contenant les phages) de chaque clone a été déposé sur plaques de 96 puits (Maxisorp, Nunc) ayant préalablement adsorbé des VLP-E^{WNV-IS98} ou de la protéine sNS1^{WNV-IS98}, puis saturés par de la serum albumine bovine (BSA) dans du PBS-0.1%Tween 20 (PBS-T). Après 5 rinçages avec du PBS-T, un anticorps de souris anti-phage M13 couplé à la peroxydase (HRP-Anti-M13 Monoclonal mouse conjugate, GE Healthcare) a été ajouté à une dilution de 1/5000 dans les puits et incubé 1h à TA. Après 5 rinçages au PBS-T, le substrat OPD peroxydase (Sigma) a été ajouté dans les puits. La densité optique a été finalement mesurée à 405nm (DO=Absorbance à 405nm) au bout de 2h (Victor Multilabel Plate Reader, Perkin Elmer).

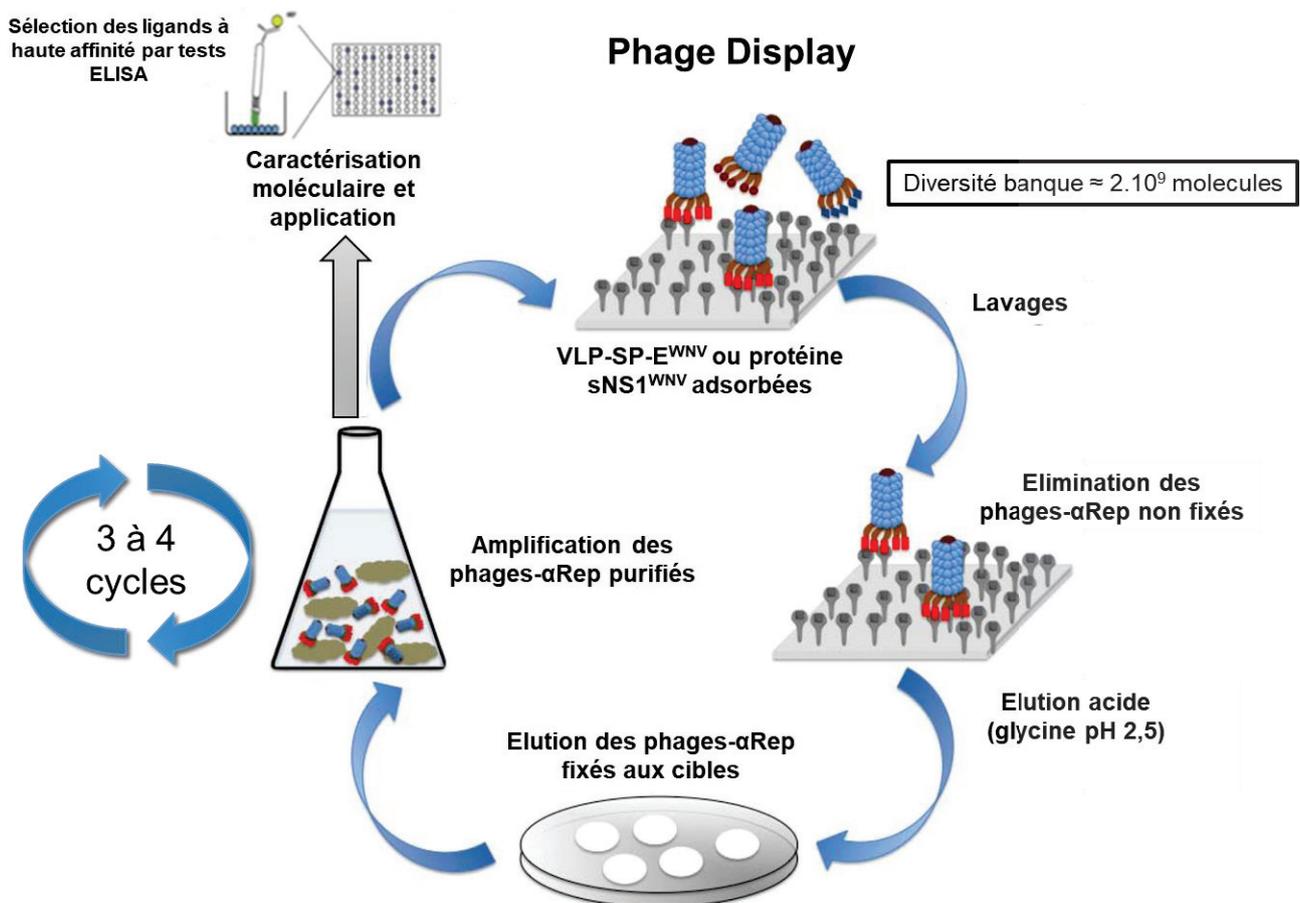


Figure 87 : Représentation schématique de la stratégie de criblage de la banque de molécule α Rep par Phage Display.

c. Western Blot

Les protéines totales extraites sont additionnées de tampon Laemmli 5X (avec β -Mercaptoéthanol) puis chauffées à 95°C pendant 5 min afin d'être dénaturées. Les échantillons ont été séparés sur gel SDS-PAGE, 10% polyacrylamide. La migration des protéines s'effectue à voltage constant de 110V dans du tampon de migration dans un système Protean 3TM (Bio-Rad). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Le transfert s'effectue dans une cassette du système TransBlot (Bio-Rad) 2,5A, 25V, 10 min. Les sites non spécifiques des membranes ont été saturés en incubant les membranes pendant 1h dans une solution (TNT) contenant 5% de lait écrémé. Puis les membranes ont été incubées avec un anticorps primaire de souris dirigé contre l'étiquette Histidine (penta His antibody, Qiagen) dilué dans du TNT contenant 1-2% de lait écrémé sur la nuit à +4°C, sous agitation. Les membranes sont ensuite lavées par des bains successifs de TNT puis incubées 1h sous agitation avec l'anticorps secondaire, conjugué à la peroxydase, dirigé contre l'anticorps primaire (anti-IgG de souris, HRP, Sigma-Aldrich). Après minimum 3 lavages au TNT, les membranes ont été révélées à l'aide du kit SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) et du système Cawomat. Les dilutions des anticorps utilisés sont identiques à celles du Tableau 5.

II.3 Résultats

II.3.1 Criblage de la banque de molécules α Rep contre la protéine d'enveloppe E du WNV

Nous avons utilisé la technologie du phage display afin de cribler la banque de phages recombinants, qui codent les molécules α Rep, contre la protéine d'enveloppe E^{WNV-IS98}. Pour cela, notre plateforme de pseudotypage de E^{WNV-IS98} en cellules d'insectes a été utilisée. La banque de phages a été criblée sur les cellules Sf9-SP-E^{WNV} (**Figure 88**). Trois cycles de sélection ont été réalisés. La population totale de protéines α Rep retenues sur les cellules Sf9-SP-E^{WNV} après le troisième et dernier cycle de sélection s'élevait à environ 4-5.10⁴ clones.

Les clones ainsi isolés constituent notre stock de clones de molécules α Rep ligands de la protéine $E^{WNV-1S98}$. C'est parmi cette population que nous avons analysé les clones ayant la plus forte affinité de liaison pour les cellules Sf9-SP- E^{WNV} . Par test ELISA indirect, nous avons sélectionné les phages recombinants porteurs d' α Rep les plus affines et les plus spécifiques vis à vis du composant viral E^{WNV} (**Figure 88**).

Environ 500 clones α Rep ont été testés par cette méthode. Les valeurs d'absorbances à 405nm des puits contenant les cellules Sf9-SP- E^{WNV} ont été comparées et normalisées avec celles des puits contenant des cellules Sf9 sans glycoprotéine à la surface (contrôle). Ces valeurs étaient représentatives de l'affinité d'un clone α Rep pour l'enveloppe virale $E^{WNV-1S98}$ (**Figure 88**). Nous avons ainsi mis en évidence quatre clones ayant une affinité élevée pour la protéine $E^{WNV-1S98}$ présentée à la surface des cellules Sf9-SP- E^{WNV} . Ces clones ont été nommés α RepE-6B6, α RepE-5F4, α RepE-5C3 et α RepE-5F5. Les séquences α Rep de ces clones ont été amplifiées par PCR sur l'ADN des phages correspondants, puis clonées dans des vecteurs d'expression en système bactérien et en système mammifère. Après séquençage, nous avons pu déterminer que le clone α RepE-6B6 était constitué de 8 modules, les clones α RepE-5C3 et α RepE-5F4 de 6 modules en hélice- α tandis que le clone 5F5 était, lui, constitué de 3 modules (**Figure 89**). Depuis, leur caractérisation moléculaire et biochimique est en cours. Une fois celle-ci effectuée et disposant de systèmes d'expression bactérien et mammifère, nous souhaitons produire et purifier ces protéines α Rep isolées afin d'évaluer leur potentielle activité antivirale vis-à-vis d'une infection par WNV.

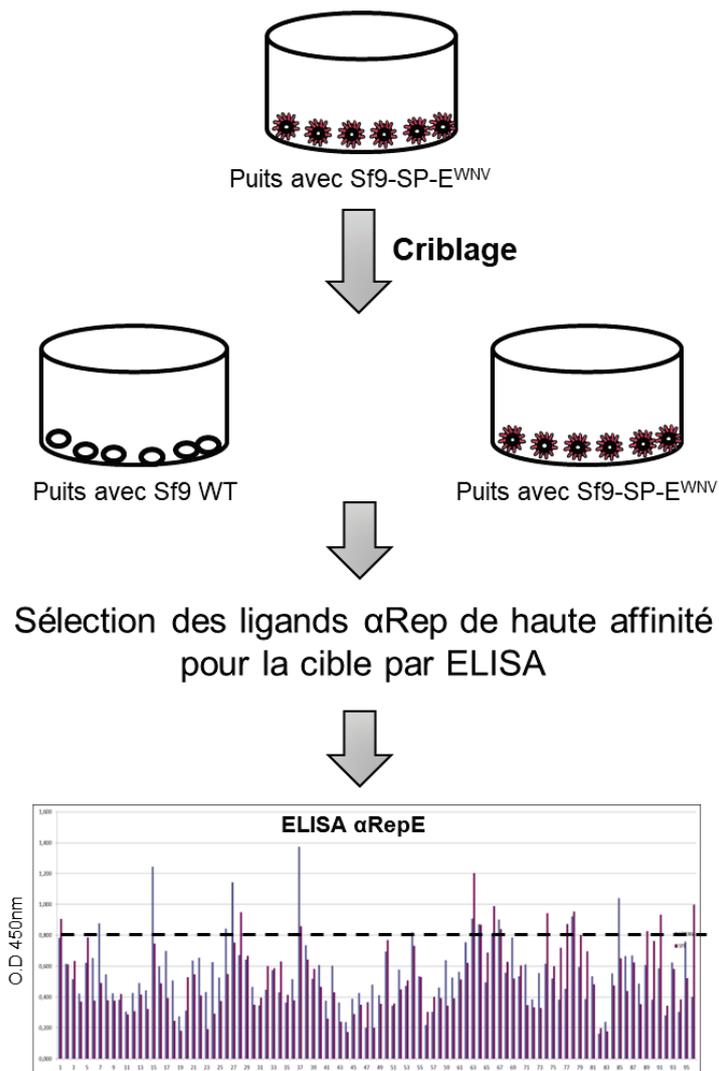


Figure 88 : Schéma du plan expérimental du criblage des molécules αRep contre la protéine E^{WNV-1S98} présentée à la surface des cellules Sf9-SP-E^{WNV}. Le graphique est un exemple des résultats obtenus par ELISA indirect pour tester l'affinité des αReps portés par les phages sélectionnés

α Rep^{WNV}_5F5 170 aa; 3 modules

MRGSHHHHHTDPEKVEYIKNLQDDSLPVRFI~~AA~~NALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDARVRLSAAALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDWRVRQTAAEALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDKQVRFSAAYALGEI
 GGERVRAAMEKLAETGTGFARKVAVNYLETHKSLIS

} 3 Modules

 α Rep^{WNV}_5C3 263 aa; 6 modules

MRGSHHHHHTDPEKVEYIKNLQDDSQIVRIIAADALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDTDVRFSAASALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDDG~~F~~VRLTAAKALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDDYSVRR~~AA~~EALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDDL~~V~~VRTAAEALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDLG~~V~~RR~~AA~~FALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDLG~~V~~RR~~SA~~ANTLGEI
 GGERVRASMEKLAETGTGFARKVAVNNLETHRSLIS

} 6 Modules

 α Rep^{WNV}_5F4 254 aa; 6 modules

MRGSHHHHHTDPEKVEYIKNLQDDSD-----GTIEDRI
 GDERAVEPLIKALKDEDPYVRIE~~AA~~DALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDPWVRE~~DA~~EALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDPYVRKEAALALRKI
 GDERAVEPLIKALKDEDDVRVRLTAAEALGKI
 GDERAVEPLIKD--DEDYSVRR~~W~~AAEALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDDWL~~V~~RRVAAEALGKI
 GGERVRAAMEKLAETGTGFARKVAVNYLETHKSLIS

} 6 Modules

 α Rep^{WNV}_6B6 325 aa; 8 modules

MRGSHHHHHTDPEKVEYIKNLQDDSQEVRVFAAYALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDSNVRV~~AAAA~~ALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDDG~~F~~VRR~~QA~~AKALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDDRYVRIR~~AA~~LALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDDERVRLEAARALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDDRFVRRQTAAEALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDDRFVRR~~TA~~ALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDDAYVRLEAALALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDDREVRRAAARALGEI
 GGERVRAAMEKLAETGTGFARKVAVNYLETHKSLIS

} 8 Modules

Figure 89 : Caractérisation moléculaire des clones α Rep^{WNV} par séquençage.

II.3.2 Criblage de la banque de molécules α Rep contre la protéine sNS1 du WNV

La banque de molécules α Rep a également été criblée contre la protéine sNS1^{WNV-IS98}. Dans ce cadre, la protéine sNS1^{WNV-IS98} purifiée a été utilisée et la purification Ctrl^{pcDNA3.1} a servi comme contrôle (**Figure 90**). Trois cycles de sélection ont également été réalisés. La population totale de protéines α Rep retenues dans les puits contenant la protéine sNS1^{WNV-IS98} adsorbée, après le troisième et dernier cycle de sélection s'élevait à environ $1-2 \cdot 10^4$ clones. Parmi cette population de clones α Rep, nous avons analysé par ELISA les clones ayant la plus forte affinité de liaison pour la protéine virale sNS1^{WNV-IS98} (**Figure 90**).

Environ 500 clones α Rep ont été testés par cette méthode. Les valeurs d'absorbances à 405nm des puits contenant la protéine sNS1^{WNV-IS98} ont été comparées et normalisées avec celles des puits contenant le surnageant Ctrl^{pcDNA3.1} purifié. Nous avons ainsi mis en évidence trois clones ayant une affinité élevée pour la protéine sNS1^{WNV-IS98}. Ces clones ont été nommés α RepsNS1-1F6, α RepsNS1-5B9 et α RepsNS1-5E3. Les séquences α Rep de ces clones ont été amplifiées par PCR sur l'ADN des phages correspondant, puis clonées dans des vecteurs d'expression en système bactérien et en système mammifère. Après séquençage, nous avons pu déterminer que le clone α RepsNS1-1F6 était constitué de 8 modules, le clone α RepsNS1-5B9 de 9 modules et enfin le clone α RepsNS1-5E3 est quant à lui constitué de 10 modules (**Figure 91**). Leur expression en cellules de mammifères ainsi que la détermination de leur poids moléculaire ont été vérifiées lors d'une analyse par Western Blot (**Figure 92**).

Des analyses pour tester l'affinité pour la protéine sNS1 des α Rep isolées, produites et purifiées sont en cours (**Figure 93**). En effet, grâce à différentes méthodes ELISA, nous allons pouvoir déterminer si une des molécules possède une plus forte affinité pour sNS1^{WNV-IS98} que les autres. Nous souhaiterions également pouvoir analyser la structure de ces α RepsNS1 par cristallographie. En parallèle, nous sommes en train de tester nos molécules α RepsNS1 sur des échantillons de sérum provenant de chevaux infectés par le WNV. Ceci dans le but d'étudier si les α Rep anti-sNS1^{WNV-IS98} sont capables de fixer et détecter ainsi la protéine sNS1 circulante dans le sang, donc présente dans le sérum, à la suite d'une infection par WNV. Nous pourrions ainsi apporter la preuve de concept d'une

potentielle utilisation de ce nouveau type de molécules, dans une approche de diagnostic de l'infection à WNV.

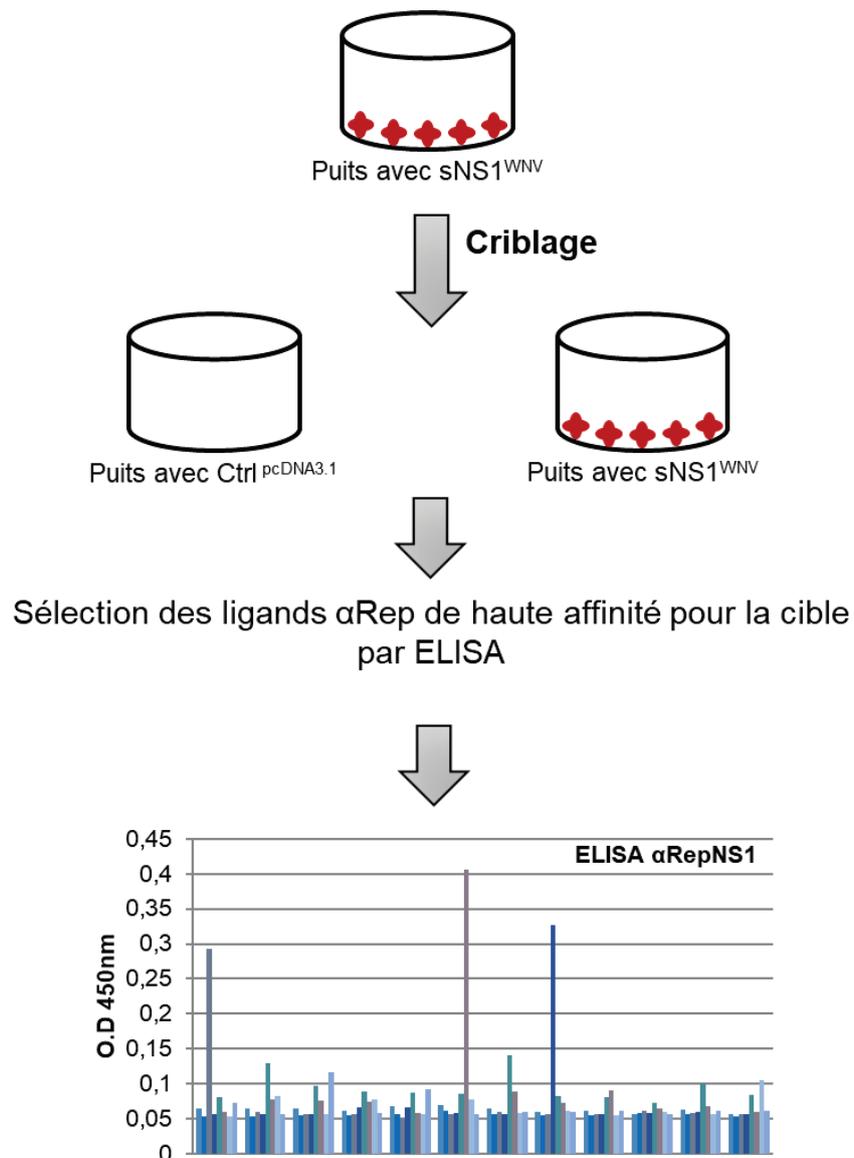


Figure 90 : Schéma du plan expérimental du criblage des molécules αRep contre la protéine sNS1^{WNV-IS98}. Le graphique est un exemple des résultats obtenus par ELISA indirect pour tester l'affinité des αReps portées par les phages sélectionnés.

α RepNS1^{WNV}_1F6 325 aa ; 8 modules

MRGSHHHHHHTDPEKVE MYIKNLQDDSGRVRVNAANALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDSAVREAAAEALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDWLVRRAAAAALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDRYVRIEAAALALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEGYVRQSAASALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDSQVRVAALALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDEDEVWRRAAYALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDEGYVREEAALALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEYVRLTAAEALGQI
 GGERVRAAMEKLAETGTGFARKVAVNYLETHKSLIS

} 8 Modules

 α RepNS1^{WNV}_5B9 355 aa ; 9 modules

MRGSHHHHHHTDPEKVE MYIKNLQDDSDMVRVNAAIALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEYVRWSAAAALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEPYVRISAARALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEGFVRQSAAEALGKI
 GDERAVEPLIKAQDEDEGFVRFSAAYALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEPYVRISAADALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEGYVRSAAALALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDEPDVRSSAALALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDERFVRFSAAEALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDEPDVRLTAADALGKI
 GGERVRAAMEKLAETGTGFARKVAVNYLETHKSLIS

} 9 Modules

 α RepNS1^{WNV}_5E3 385 aa ; 10 modules

MRGSHHHHHHTDPEKVE MYIKNLQDDSAKVRNIAANALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEYVRQSAAEALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDEGYVRVAAAARALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDEATVRLSAAEALGQI
 GDERAVEPLIKALKDEDEYSVRRAAAAALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDRYVRWSAADALGEI
 GDERAVEPLIKALKDEDEPRVRSSAALALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEGYVRSSAALALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEVVREAAAYALGEI
 GDERAV--LIKALKDEDELAVRRVAALALGKI
 GDERAVEPLIKALKDEDEAFVRKDAASALGEI
 GGERVRAAMEKLAETGTGFARKVAVNYLETHKSLIS

} 10 Modules

Figure 91 : Caractérisation moléculaire des clones α RepsNS1^{WNV} par séquençage.

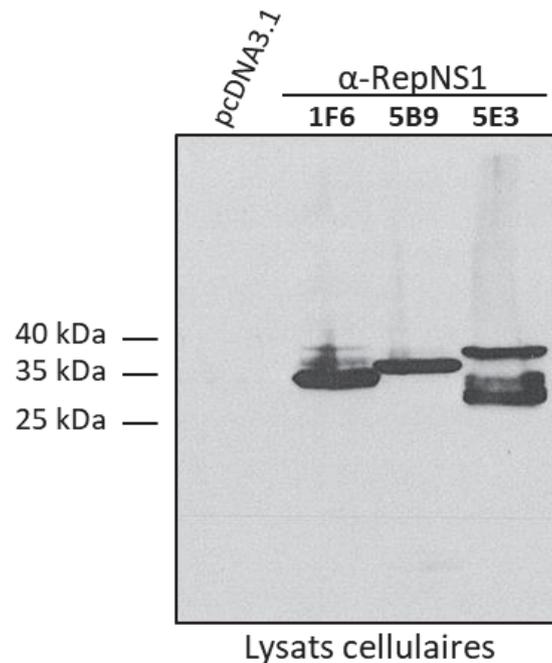


Figure 92 : Expression des protéines α RepNS1 en cellules de HEK-293T. Les trois clones α RepNS1 sont détectables après transfection en cellules HEK-293T. Elles présentent des poids moléculaires différents correspondant à leurs différentes longueurs en acide aminés déterminées après séquençage. La protéine α RepNS1-1F6 a un poids moléculaire d'environ 34 kDa, le clone α RepNS1-5B9 d'environ 37 kDa et le clone α RepNS1-5E3 d'environ 39 kDa.

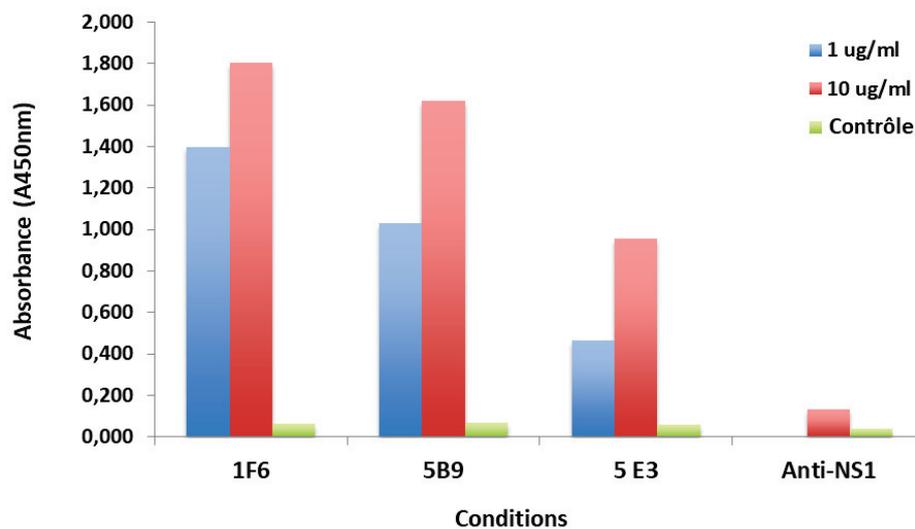


Figure 93 : Analyse par méthode ELISA de l'affinité de fixation des molécules α Rep pour la protéine sNS1^{WNV-IS98}.

Discussion

Avec l'augmentation de l'incidence du WNV ces dernières années, à la fois en Europe, sur le pourtour méditerranéen et sur le continent américain, les connaissances sur la biologie du virus se sont accrues. Cependant, un vaccin humain ou un traitement antiviral spécifique des infections à WNV demeurent encore inexistantes. De plus, le risque d'émergence et de diffusion du WNV à de nouveaux territoires est aggravé par l'expansion territoriale de vecteurs compétents et de facteurs anthropiques, représentant une menace importante. C'est pourquoi la mise au point de nouvelles stratégies antivirales et de diagnostic contre les infections à WNV s'avère nécessaire.

Dans cet axe, nous souhaitons réaliser un criblage de molécules contre les protéines virales E et sNS1 du virus West Nile. Comme il est plus pertinent de cibler une protéine virale dans son environnement naturel ou dans un environnement similaire, l'utilisation de cellules exprimant la protéine E^{WNV-IS98} à la surface pour cibler la protéine d'enveloppe E a été préférée. Cependant, le WNV étant un pathogène de classe 3, sa manipulation dans le cadre du criblage à partir d'une banque de molécules portées par des phages recombinants était bien trop compliquée et coûteuse à mettre en place. C'est pourquoi nous avons pour objectif de développer une plateforme de pseudotypage de la protéine d'enveloppe E du WNV. La protéine E du WNV serait alors présentée à la surface membranaire de cellules dans un environnement similaire à la surface d'une particule virale. Le pseudotypage de protéines d'enveloppes virales est une stratégie couramment employée pour étudier le rôle des protéines de surfaces dans le tropisme d'un virus mais aussi pour cribler des molécules à potentiel antiviral (Steffen and Simmons, 2016). Les systèmes de pseudotypage les plus courants sont basés sur des rétrovirus ou des lentivirus dont le gène codant la protéine d'enveloppe rétrovirale ou lentivirale a été délété. Le système Rhabdovirus, notamment basé sur le virus VSV, est aussi utilisé avec une délétion du gène d'enveloppe VSVg. Ces systèmes présentent l'avantage de ne pas être productifs après l'infection de cellules cibles. En effet, si le génome viral est capable de se répliquer, l'absence du gène codant leur propre protéine d'enveloppe abolit toute production de particules virales infectieuses. Les virus pseudotypés (ou pseudotypes, VLP) ne sont capables de faire qu'un seul cycle d'infection

(single round infectious particles). Ainsi, ceux-ci sont manipulables de manière plus aisée et à moindre coût en conditions BSL2.

Si le pseudotypage de nombreuses protéines d'enveloppes de plusieurs virus différents a été décrit, le pseudotypage de la protéine d'enveloppe des *Flavivirus* reste encore un verrou technologique. En effet, les systèmes de pseudotypage sont basés sur des virus dont le bourgeonnement a lieu à la membrane plasmique de la cellule. La protéine d'enveloppe des *Flavivirus* étant localisée à la membrane du RE, il y a une incompatibilité de localisation qui conduit à la formation de pseudo-particules dépourvues de la glycoprotéine d'intérêt. Le premier objectif dans cet axe consistait donc à développer une plateforme de pseudotypage de la protéine d'enveloppe E du WNV en permettant sa relocalisation à la membrane plasmique de la cellule. La protéine E du WNV a ainsi été clonée en fusion au niveau N-terminal avec le peptide signal du récepteur membranaire CD16. Ce peptide signal est impliqué dans l'adressage du récepteur CD16 à la membrane plasmique de la cellule. Comme cela avait été démontré pour le domaine DIII de la protéine E du WNV (Chua et al., 2013), nous avons observé une localisation de la protéine E du WNV à la membrane plasmique dans les cellules d'insecte Sf9 exprimant de manière stable la construction SP-E^{WNV-IS98}. De manière intéressante, l'expression de la protéine E^{WNV-IS98} dépourvue du peptide signal n'a pas permis de détecter la protéine à la membrane plasmique et E^{WNV-IS98} semblait rapidement dégradée dans le cytoplasme de la cellule. Le peptide signal de CD16 permet donc, en fusion avec la protéine E^{WNV-IS98} son adressage à la membrane plasmique de la cellule. La stratégie a été étendue et appliquée en système mammifère, par surexpression transitoire de la construction pcDNA-SP-E^{WNV} en cellules HEK-293T. L'expression de la fusion SP-E^{WNV} est à nouveau plus stable que la protéine d'enveloppe seule qui semble rapidement dégradée dans le cytoplasme de la cellule. En utilisant le système lentiviral de pseudotypage en cellules de mammifère, l'analyse du contenu protéique des VLP issues des cellules 293T-SP-E^{WNV} a permis de valider l'incorporation et la présentation de la glycoprotéine E^{WNV-IS98} à la surface des VLPs. Nos travaux ont ainsi permis de développer une plateforme à la fois en cellules d'insectes et en cellules de mammifères compatible avec les systèmes de pseudotypage existants afin de présenter la protéine E du WNV à la surface de pseudo-particules virales. Ces résultats représentent la levée d'un verrou technologique important dans le pseudotypage des *Flavivirus*.

En cellules de mammifères, il existe plusieurs systèmes de pseudotypage de virus rapporteurs (Bartosch et al., 2003; Hu et al., 2007; Lennemann et al., 2017). Ceux-ci nous ont permis de tester l'infectiosité des particules pseudotypées avec la glycoprotéine d'enveloppe E du WNV. La finalité de cette approche est d'utiliser des virus pseudotypés avec la protéine d'enveloppe E du WNV à la place du WNV sauvage dans des tests de séroneutralisation virale. Si les résultats obtenus avec les différents systèmes (lentivirus, virus VSVΔG codant les gènes rapporteurs *GFP* et/ou *Luciférase*) souffrent d'une grande variabilité à l'origine d'une faible reproductibilité, ils n'en restent pas moins encourageants. En effet, une activité luciférase significative a été détectée à plusieurs reprises dans les cellules cibles infectées par les VLP-SP-E^{WNV} (système GagPol^{HIV-1}-Luciférase). L'incorporation d'une quantité plus faible de protéines E^{WNV-IS98}, à la surface des particules VLP, qu'à la surface des virions du WNV peut entraîner une baisse de l'efficacité d'infection. Dans un souci de mise au point d'un protocole standardisé, nous avons testé un grand nombre de paramètres différents tels que la quantité de plasmides codant la protéine d'enveloppe du WNV transfectée, l'agent transfectant, le temps d'incubation après transfection, la concentration ou non des particules produites, pouvant influencer l'efficacité d'infection. D'autre part, la conformation de la glycoprotéine E du WNV à la surface des particules sauvages est notamment dépendante du clivage de prM en M. Ici, ayant l'expression de E en absence de prM il est possible que la protéine d'enveloppe adressée à la membrane plasmique de la cellule ne soit pas dans une conformation strictement identique à la surface d'un virion sauvage WNV bien que dans un environnement similaire. De fait, l'infectiosité des particules VLP peut être moindre par rapport aux particules de WNV sauvages. C'est pourquoi, avant d'être utilisé et appliqué dans des tests de neutralisation virale, le système de pseudotypage de la protéine E du WNV en cellule mammifère nécessite d'être optimisé. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de cette étude sont encourageants. La plateforme de pseudotypage que nous avons mis en place ici permettrait alors l'étude du WNV et d'autres *Flavivirus*. En effet, nous aurions donc à disposition un outil, manipulable en conditions BSL2, permettant d'étudier le rôle de la protéine E dans le tropisme du WNV, les interactions avec des récepteurs de surface potentiels et les étapes précoces de son cycle infectieux.

Dans le cadre d'une collaboration étroite avec trois équipes thaïlandaises (programme collaboratif franco-thaï PHC-SIAM), impliquant les universités de Phayao, de

Chiang Mai et Mahidol de Bangkok, nous avons pu réaliser les criblages contre la protéine d'enveloppe E et la protéine sNS1 du WNV.

La banque de molécules α Rep a été criblée par « phage display » contre la protéine $E^{\text{WNV-IS98}}$ en utilisant les cellules d'insectes Sf9-SP- E^{WNV} . La technologie du « phage display » s'est imposée comme un puissant outil à haut débit pour la sélection et l'isolement de protéines α Rep ligands d'une cible virale. Nous avons ainsi isolé 4 clones présentant une forte affinité pour la cible virale. La caractérisation moléculaire a permis d'identifier une molécule à 3 modules répétés, deux molécules à 6 modules et 1 molécule à 8 modules. L'affinité et l'interaction de ces α Rep avec la protéine $E^{\text{WNV-IS98}}$ seront analysées de manière plus précise afin de les caractériser plus finement. Par la suite, nous souhaitons évaluer l'activité potentielle de ces protéines α Rep contre le WNV. En effet, comme les α Rep interagissent avec la protéine d'enveloppe E du WNV, leurs propriétés mimant les anticorps peuvent inhiber l'attachement des particules virales à la surface cellulaire. Elles pourraient alors avoir une activité neutralisante vis-à-vis du virus. Les protéines α Rep représenteraient donc des molécules antivirales candidates nouvelles pour le développement, à long terme, d'une thérapie contre le WNV.

Le choix d'une stratégie de criblage de molécules artificielles α Rep comme antiviraux potentiels, susceptible d'inhiber les infections à WNV, est justifié par d'autres travaux de l'équipe auxquels j'ai participé lors de mon Master 2 et en début de thèse. Ceux-ci avaient notamment pu mettre en évidence que certaines α Rep avaient une activité antivirale contre le HIV-1. En effet, en ciblant une région de la polyprotéine virale Gag du HIV-1, constituée du domaine C-terminal de la capsid (CA), du linker SP1 et de la nucléocapside NC de HIV-1, des molécules α Rep ont pu être isolées (Hadpech et al., 2017). Parmi celles-ci, deux molécules à forte affinité pour les domaines ZF1 et ZF2 de la nucléocapside NC présentent une activité antivirale contre le HIV-1 dans les étapes tardives du cycle infectieux. En effet, les molécules α Rep4E3 (7 modules répétés) et α Rep9A8 (6 modules répétés) interfèrent négativement avec les mécanismes d'encapsidation du génome viral, d'assemblage et de maturation des particules virales filles (Hadpech et al., 2017). Ces molécules à motifs répétés, de type α Rep, représentent donc une nouvelle classe d'inhibiteurs d'infections virales. Ici, l'intérêt de cibler la glycoprotéine d'enveloppe E du WNV est basé sur son implication dans les étapes précoces du cycle viral qui pourraient ainsi être bloquées. De

plus, une des propriétés caractéristiques des α Rep qui diffère des anticorps, est qu'elles reconnaissent des structures tri-dimensionnelles (3D) peu accessibles chez les protéines cibles. En tenant compte de l'importante similarité de structures des protéines d'enveloppe E chez l'ensemble des *Flavivirus*, on peut envisager et espérer qu'une molécule α Rep puisse interagir avec plusieurs protéines E différentes. On parlerait alors d'une molécule à large spectre.

En parallèle, la banque de molécules α Rep a aussi été criblée contre un second déterminant du WNV, la protéine sNS1. Nous avons utilisé la protéine sNS1^{WNV-IS98} produite et purifiée dans le chapitre 1 comme cible virale. Trois clones α Rep anti-sNS1^{WNV-IS98} différents, de 8, 9 et 10 modules ont alors été isolés à partir du criblage. Nous avons pu vérifier leur expression dans des systèmes d'expression mammifère et bactérien afin de les produire et de les purifier. Grâce à la continuité du projet collaboratif avec trois universités en Thaïlande, nous sommes en train de caractériser plus précisément l'affinité d'interaction entre les différentes molécules α Rep et la protéine sNS1^{WNV-IS98} par différentes méthodes ELISA. Ici, notre objectif est d'utiliser les propriétés d'interactions des α Rep avec la cible virale afin de détecter sa présence dans un échantillon. En effet, des tests de diagnostic d'infections par un *Flavivirus* tels que DENV ou WNV sont basés sur détection de la protéine sNS1 circulante dans le sang par des anticorps anti-sNS1 (Pal et al., 2014). Or, au même titre que les anticorps anti-sNS1 se fixent sur la protéine virale cible, les molécules α Rep anti-sNS1 se fixent de manière spécifique sur la protéine sNS1. Nous pourrions alors envisager une application des α Rep, en substituant les anticorps, dans le développement d'un test de diagnostic de l'infection par WNV basé sur la détection de la protéine sNS1 dans les échantillons. De même, les molécules peuvent être utilisées dans une méthode de MAC-ELISA ou GAC-ELISA pour détecter la présence d'anticorps anti-sNS1 dans les échantillons. Les avantages de protéines α Rep en comparaison aux anticorps sont multiples. Tout d'abord, leur production est plus aisée et moins coûteuse puisqu'elle est possible en système bactérien. D'autre part, les α Rep présentent une importante thermostabilité. Enfin, les séquences des molécules sont maîtrisées, ce qui permet de les modifier afin d'augmenter et optimiser les propriétés d'interactions spécifiques avec la protéine cible. La structure protéique de sNS1 étant également très conservée chez les *Flavivirus*, il serait possible de développer d'autres α Rep contre la protéine sNS1 des autres *Flavivirus* en ne modifiant que

les régions variables des α Rep impliquées dans l'interaction. De plus, grâce à la stabilité des molécules α Rep, nous pouvons envisager de développer à moyen terme un test rapide sur bandelette de papier pour le diagnostic d'infection virale à WNV. Ce test, à faible coût de production, pourrait alors être utilisable sur le terrain, notamment dans le domaine vétérinaire, au cours d'épidémies ou pour suivre la circulation du virus.

Publication

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Alpha-helicoidal HEAT-like Repeat Proteins (α Rep) Selected as Interactors of HIV-1 Nucleocapsid Negatively Interfere with Viral Genome Packaging and Virus Maturation

Sudarat Hadpech^{1,2,3,4}, Sawitree Nangola⁵, Koollawat Chupradit^{1,2}, Kanda Fanhchaksai^{1,2}, Wilhelm Furnon⁴, Agathe Urvoas⁶, Marie Valerio-Lepiniec⁶, Philippe Minard⁶, Pierre Boulanger⁴, Saw-See Hong^{4,7} & Chatchai Tayapiwatana^{1,2}

A new generation of artificial proteins, derived from alpha-helicoidal HEAT-like repeat protein scaffolds (α Rep), was previously characterized as an effective source of intracellular interfering proteins. In this work, a phage-displayed library of α Rep was screened on a region of HIV-1 Gag polypeptide encompassing the C-terminal domain of the capsid, the SP1 linker and the nucleocapsid. This region is known to be essential for the late steps of HIV-1 life cycle, Gag oligomerization, viral genome packaging and the last cleavage step of Gag, leading to mature, infectious virions. Two strong α Rep binders were isolated from the screen, α Rep4E3 (32 kDa; 7 internal repeats) and α Rep9A8 (28 kDa; 6 internal repeats). Their antiviral activity against HIV-1 was evaluated in VLP-producer cells and in human SupT1 cells challenged with HIV-1. Both α Rep4E3 and α Rep9A8 showed a modest but significant antiviral effects in all bioassays and cell systems tested. They did not prevent the proviral integration reaction, but negatively interfered with late steps of the HIV-1 life cycle: α Rep4E3 blocked the viral genome packaging, whereas α Rep9A8 altered both virus maturation and genome packaging. Interestingly, SupT1 cells stably expressing α Rep9A8 acquired long-term resistance to HIV-1, implying that α Rep proteins can act as antiviral restriction-like factors.

Although highly active antiretroviral therapy (HAART) has significantly reduced the morbidity and mortality associated with AIDS, curative therapy has been greatly impaired by the occurrence of drug resistant mutants and the persistence of virus in a latent form in reservoirs that resist current HAART¹⁻⁴. The high mutation rate of the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and the persistence of viruses in tissue sanctuaries impose constant efforts to develop new antiviral drugs and new strategies^{5,6}. Alternative strategies include the design of genes coding for intracellular factors or interactors with antiviral activity, the genetic manipulation of hematopoietic progenitor stem cells⁷, and the inactivation of proviral DNA *in situ* by using zinc-finger nucleases (ZFNs),

¹Division of Clinical Immunology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand. ²Center of Biomolecular Therapy and Diagnostic, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand. ³Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University, Muang District, Chonburi Province, 20131, Thailand. ⁴University Lyon 1, UMR754-INRA-EPHE, Viral Infections and Comparative Pathology, 50, Avenue Tony Gamier, 69366 Lyon Cedex 07, France. ⁵Division of Clinical Immunology and Transfusion Sciences, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao, 56000, Thailand. ⁶Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette cedex, France. ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 101, rue de Tolbiac, 75654, Paris Cedex 13, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.-S.H. (email: saw-see.hong@univ-lyon1.fr) or C.T. (email: asimi002@hotmail.com)

transcription activator-like effector nucleases (TALENs), or the clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9 (CRISPR) system⁸. A recent example of the design of novel antivirals based on HIV-1 interactors was given by LEDGINS^{9,10}, allosteric inhibitors of integrase (IN) which block the interaction of IN with lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) or p75¹¹.

Among the anti-HIV therapies using intracellular protein interference, protein-based molecular scaffolds are considered as promising antivirals. Antibodies, their derivatives scFv and intrabodies, and single domain antibodies from *Camelidae* (or nanobodies) are the most commonly used scaffolds to bind protein targets. However, the proper folding, stability and biological activity of these molecules require inter- or intra-domain disulfide bond formation. This constitutes severe limitations to their development as intracellular antivirals, considering the reducing environment of the cytoplasm. In order to overcome these limitations, other disulfide-free, protein-based molecular scaffolds have been designed, such as artificial ankyrin-repeat proteins (Anks) and the ankyrin derivatives DARPINS^{12–18}. Some of these scaffolds are already in preclinical studies for the treatment of cancer¹⁹, and others, like DARPINS or Anks, have been tested *in vitro* against HIV-1 infection, and have been found to act at the initial step of binding of the virus to its cell surface receptors²⁰, or at post-entry steps^{21,22}.

We have previously designed and characterized two intracellular inhibitors of HIV-1 replication, abbreviated 2LTRZFP and Ank^{GAG}1D4, which are based on stable modular protein scaffolds. 2LTRZFP is a designed zinc finger protein (ZFP) which targets the integrase recognition sequence at the 2-LTR circle junctions, and blocks the integration of the HIV-1 cDNA into the host cell genome^{23,24}. Ank^{GAG}1D4 is an artificial ankyrin-repeat protein selected as a binder of the N-terminal domain of HIV-1 capsid protein (CA), which was capable of interfering negatively with viral assembly in HIV-1-infected SupT1 cells^{21,22}. Interestingly, the combined expression of 2LTRZFP and Ank^{GAG}1D4 molecules in HIV-1-infected cells resulted in a significant negative effect on the viral replication²⁵.

Another type of molecular scaffold, named alpha-repeat proteins (α Rep), were tested as potential antivirals against HIV-1 in the present work. The α Rep proteins were derived from a natural family of modular proteins constituted of alpha-helical repeats, related to HEAT repeats, named after Huntingtin, the elongation factor 3 (EF3), the protein phosphatase 2A (PP2A), and the yeast kinase TOR1^{26–29}. The association of several HEAT repeats forms alpha-solenoids of various lengths, which are naturally found in a number of cellular proteins involved in intracellular transport and protein-protein interaction^{26,28}. The biophysical properties of α Rep proteins are highly favourable to biological and medical applications: (i) α Rep proteins are easily expressed in bacteria as soluble proteins, implying a properly folded protein; (ii) they are functional in reducing and oxidative environments due to their disulfide independent folding, and can be active inside living cells as well as in the extracellular milieu; (iii) they are thermostable, with $T_m > 70^\circ\text{C}$; (iv) heat denaturation is reversible and α Rep proteins refold properly when cooled to 25°C ; (v) aggregation of α Rep proteins does not occur at high concentrations; (vi) their small size allows the recognition of epitopes of low accessibility, thus increasing the diversity of binders for one target^{28,29}. All these biological properties of α Rep proteins open a wide range of possibilities for their development as diagnostic and therapeutic tools, or for cellular imaging.

In this study, we selected α Rep proteins which bind to a region of HIV-1 Pr55Gag polyprotein which encompasses the last 21 residues of the capsid (CA₂₁), the SP1 linker and the nucleocapsid (NC) protein with its two zinc fingers. This region contained several elements identified as privileged targets for antiviral drugs. (i) SP1, the spacer peptide separating the capsid from the nucleocapsid domain, is a 14-residue long, alpha-helical domain which is critical for the self-assembly of Pr55Gag, and is the target of betulinic acid-derived assembly inhibitors^{30–35}. (ii) The NC occupies a strategic position in the HIV-1 infectious cycle, as it possesses structural and catalytic properties, and also acts as a nucleic acid chaperone^{36–40}. The multiple functions in which NC is involved^{41–45}, as well as its ALIX-mediated role in the virus particle release^{46,47}, justified the inclusion of the NC domain in our viral bait.

Two α Rep molecules with a high binding activity, α Rep4E3 and α Rep9A8, were isolated from our screen. When the intracellular antiviral functions were assessed *in vitro*, both α Rep proteins showed a modest but significant inhibitory effect on HIV-1 replication, although interestingly *via* different mechanisms. α Rep4E3 interfered negatively with the viral genome packaging, whereas α Rep9A8 mainly impaired the proteolytic processing of Gag, the step required for the transition of immature particles to infectious virions. Importantly, a SupT1 cell line stably expressing the α Rep9A8 protein was found to acquire a long-term resistance to HIV-1 infection, with the production of noninfectious virus particles at background levels. These results might have significant implications in the elaboration of future strategies of anti-HIV-1 cell therapy, based on artificial restriction-like factors.

Results

Selection of α Rep binders of the HIV-1 Gag C-terminal domain. Our viral bait, abbreviated CA₂₁-SP1-NC, spanned from residue L343 to F433 of the Pr55Gag sequence (Fig. 1a). GST-fused CA₂₁-SP1-NC was used for the selection of specific binders from a phage-displayed, random library of artificial α Rep proteins generated by combinatorial methods^{26,27}. After three rounds of phage biopanning, 30 individual clones out of an original library of $\sim 1.7 \times 10^9$ independent bacteriophages, were randomly picked and analyzed by ELISA. Eighteen clones were found to react positively with the immobilized bait, and six of them, α Rep4D4, -4E3, -4F2, 5A12, -5F1 and -9A8, showed a significantly higher signal compared to the twelve other clones. The genes of these six α Rep were sub-cloned into the pQE-31 expression vector for the production of His-tagged α Rep proteins in *E. coli*. After purification by affinity chromatography on Ni²⁺-column, the six selected α Rep proteins were analyzed for their binding activity to GST-CA₂₁-SP1-NC *in vitro*, using an indirect ELISA method. Out of the six clones, α Rep4E3 and α Rep9A8 showed the highest binding reaction with the viral target (not shown), and were therefore kept for further characterization. DNA sequencing showed that α Rep4E3 and α Rep9A8 had in common a His-tag at their N-terminus, the flanking N-terminal cap (N-cap) and C-terminal cap (C-cap) sequences, and the constant regions of the internal repeat modules (Fig. 1b). α Rep4E3 had seven internal repeat modules, 284 amino

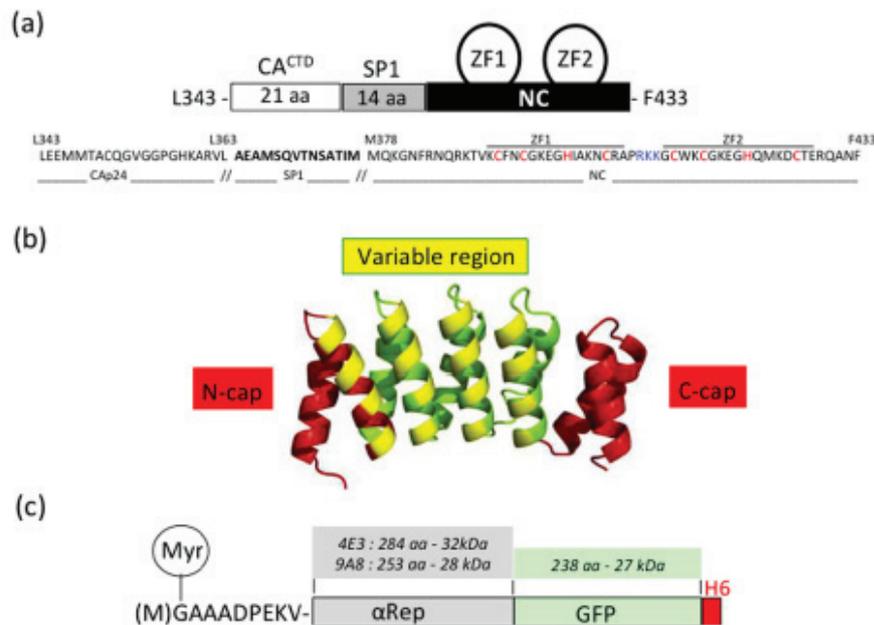


Figure 1. Schematic representation of the protein partners. (a) Schematic representation of the viral target, spanning residues L343 to F433 of HIV-1 Pr55Gag, with its amino acid sequence (HIV-1_{LA1} isolate) shown underneath. Amino acid residues of the SP1 domain are in bold; the cysteine and histidine residues of the zinc fingers (ZF1 and ZF2) responsible for the Zn coordinates are in red; the residues of the basic motif separating ZF1 and ZF2 are in blue. (b) Three-dimensional model of an α Rep molecule. The constant regions N-cap and C-cap are shown in red, and the variable region, comprising of four internal alpha-repeats in this particular model ($n = 4$), is in yellow and green. (c) Schematic representation of an α Rep-GFP fusion protein, with the N-terminus modified to carry a N-myristoylation signal (Myr), and a His-tag at the C-terminus. The respective number of amino acids (aa), and molecular weight of α Rep4E3, α Rep9A8 and GFP domains are indicated in kDa.

acids (including N-cap and C-cap) and a molecular mass of 32 kDa, while α Rep9A8 had six internal repeats, 253 amino acids and a molecular mass of 28 kDa (Fig. 2).

Protein pull-down assays. The interaction of α Rep4E3 and α Rep9A8 with the viral target and the mapping of their binding sites on CA₂₁-SP1-NC was investigated using protein pull-down assays. Purified His-tagged α Rep proteins were incubated with the full-length viral target CA₂₁-SP1-NC, or its carboxy-terminal deletants, GST-CA₂₁-SP1-NC Δ ZF2 (lacking the downstream ZF2), and GST-CA₂₁-SP1 (lacking the whole NC domain; see Supplementary Table S1). Protein complexes were isolated on glutathione-coated agarose beads, and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Both α Rep4E3 and α Rep9A8 bound equally well to CA₂₁-SP1-NC, but no binding was detectable with the NC-deleted target (Fig. 3a). Deletion of ZF2 significantly decreased the binding of both α Rep, suggesting an overlap of their binding sites on the Gag target. However, differences were observed between the two binding patterns. The amounts of α Rep complexed with GST-CA₂₁-SP1-NC Δ ZF2 were 5-fold lower for α Rep4E3 and 2-fold lower for α Rep9A8, compared to their complex with full-length GST-CA₂₁-SP1-NC (Fig. 3b). This suggested that the major binding determinants of α Rep4E3 mapped to ZF2, with minor determinants in ZF1, whereas for α Rep9A8, the binding determinants were distributed between the ZF1 and the ZF2 domains.

Effects of α Rep4E3 and α Rep9A8 proteins on HIV-1 VLP assembly and extracellular release: quantitative aspects. The effects of the two α Rep on HIV-1 assembly were explored using a baculovirus-insect cell system of production of HIV-1 virus-like particles (VLPs). In this system, Sf9 cells were infected with AcMNPV^{B98}, a recombinant vector derived from the baculovirus AcMNPV (*Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus). AcMNPV^{B98} expresses the full-length, wild-type, N-myristoylated HIV-1 Gag polyprotein in Sf9 cells, resulting in the assembly and extracellular release of membrane-enveloped VLPs at high yields. The high number of particles produced per cell in this heterologous model system of VLP assembly and egress, allowed quantitative analyses of morphologically normal VLPs compared to aberrant particles^{31,33,48–51}.

Expression of α Rep in insect cells. The α Rep4E3 and α Rep9A8 genes were fused to the GFP gene and to the coding sequence of a six-histidine tag at the C-terminus (Fig. 1c). The coding sequence of an N-myristoylation signal^{22,52} was inserted to the 5'-end of the α Rep-GFP genes (Fig. 1c). The resulting genetic constructs were transfected into Sf9 cells, and the two Sf9-derived cell lines thus obtained, Sf/(Myr+) α Rep4E3-GFP and Sf/(Myr+) α Rep9A8-GFP, stably expressed N-myristoylated (Myr+) α Rep4E3-GFP and (Myr+) α Rep9A8-GFP proteins under the control of the baculoviral OpIE2 promoter (see Supplementary Fig. S1). The aim of the

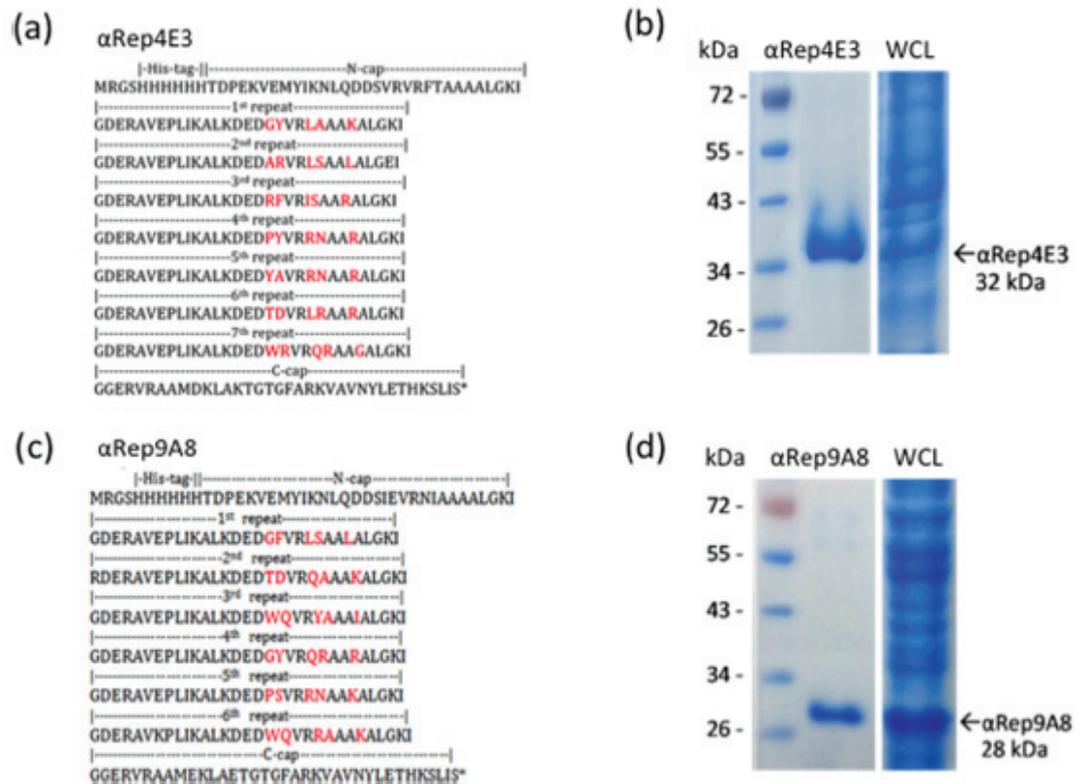


Figure 2. Biochemical characteristics of α Rep4E3 and α Rep9A8. **(a,c)** Amino acid sequence of α Rep4E3 **(a)** and α Rep9A8 **(c)** with the variable residues of the internal repeats shown in red, and constant residues in black. **(b,d)** SDS-PAGE and Coomassie blue staining of affinity-purified, His-tagged α Rep proteins (middle lane); whole bacterial cell lysates (WCL) are shown on the right lane, and prestained molecular mass markers on the left lane.

N-myristoylation of α Rep4E3-GFP and α Rep9A8-GFP was to compensate for the difference in cell content between the N-myristoylated Pr55Gag polyprotein, expressed at high levels under the control of the strong polyhedrin promoter^{31,33,48–51}, and α Rep proteins, expressed at lower levels under the control of the weaker OpIE2 promoter. Addressing (Myr+) α Rep proteins to the plasma membrane was meant to promote the interaction between Pr55Gag and α Rep proteins at the assembly sites of membrane-enveloped VLPs.

Quantitative effect of (Myr+) α Rep4E3 and (Myr+) α Rep9A8 on VLP assembly. Control, nonmodified Sf9 cells, Sf/(Myr+) α Rep4E3-GFP and Sf/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells were infected with AcMNPV^{prg}, and the amounts of VLPs assembled and released into the culture medium were estimated by SDS-PAGE and Western blot analysis of pelletable, extracellular Pr55Gag^{31–33}. The intensity of the Pr55Gag band on immunoblots did not radically differ between the three samples (data not shown). A quantitative, luciferase-based assay of extracellular VLPs was then performed. The principle of this assay resides in the co-packaging of Vpr (and Vpr-fused proteins) with Pr55Gag into membrane-enveloped VLPs banding at a density of 1.18. This co-packaging is mediated by the specific interaction between the Gag p6 domain and Vpr^{53,54}. The co-expression of the Luciferase-Vpr fusion protein together with Pr55Gag by co-infection of Sf9 with the recombinant vectors AcMNPV^{lac-vpr} and AcMNPV^{prg} showed that the activity of luciferase co-incorporated with Pr55Gag into VLPs directly reflected the amounts of VLPs released in the extracellular medium³³.

Control Sf9 cells, Sf/(Myr+) α Rep4E3-GFP and Sf/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells were co-infected with AcMNPV^{prg} and AcMNPV^{lac-vpr}, and harvested at 48 hrs pi. Cell lysates and gradient fractions were assayed for luciferase activity, and the results of VLP-associated luciferase activity were normalized to the cellular luciferase levels³³. A peak of luciferase activity was detected at the density of VLPs in all three culture media and at similar levels (see Supplementary Fig. S2), which implied minor differences in the amounts of VLPs recovered from the different cell lines. This suggested that (Myr+) α Rep4E3 and (Myr+) α Rep9A8 were not able to completely block the assembly and extracellular release of VLPs from AcMNPV^{prg}-infected insect cells.

Effects of α Rep4E3 and α Rep9A8 on HIV-1 VLP assembly and extracellular release: qualitative aspects. The morphology of VLPs released from α Rep-expressing cells were examined under the electron microscope (EM). From our previous studies^{48,50,51}, membrane-enveloped VLPs released from the plasma membrane of AcMNPV^{prg}-infected Sf9 cells appeared as quasi-spherical in shape, and homogeneous in size, with a diameter ranging from 110 to 130 nm (Fig. 4). By contrast, Sf/(Myr+) α Rep4E3-GFP cells infected with

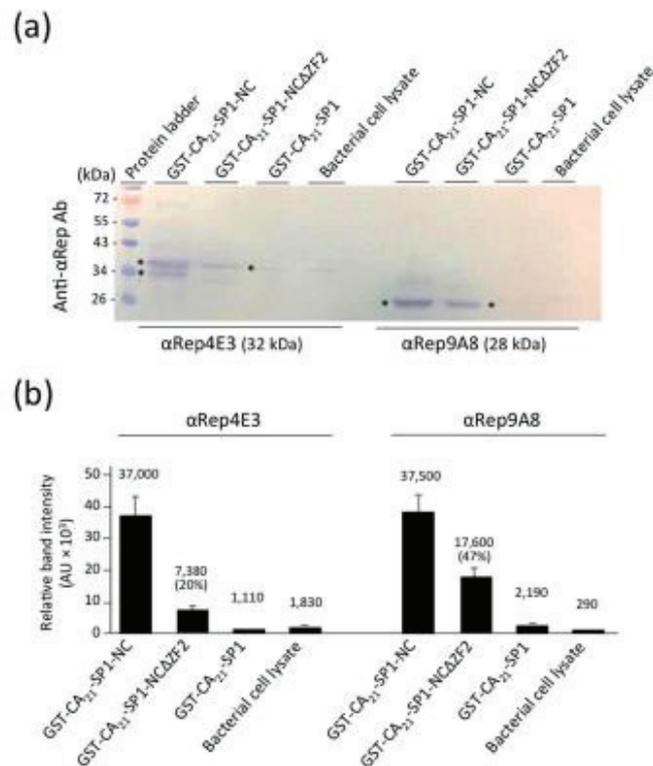


Figure 3. Protein pull-down analysis of αRep binding to the Gag target. Aliquots of bacterial cell lysates containing the full-length target GST-CA₂₁-SP1-NC, or the carboxy-truncated mutants GST-CA₂₁-SP1-NCAZF2 or GST-CA₂₁-SP1 were incubated with purified αRep4E3 or αRep9A8, and protein complexes, isolated on glutathione-coated agarose beads, were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. **(a)** Blot reacted with rabbit anti-αRep antibody, followed by alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody. Asterisks indicate the immunoreactive bands of αRep4E3 and αRep9A8 proteins. Note the doublet band of αRep4E3 protein, suggesting some degree of proteolytic cleavage. **(b)** Bar graph of the scanning of αRep4E3 and αRep9A8 proteins bound to the different viral targets. The level of αRep binding to the full-length target GST-CA₂₁-SP1-NC was attributed the 100% value.

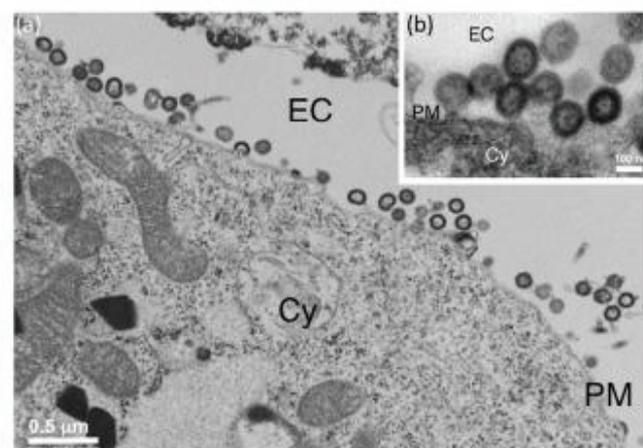


Figure 4. Electron microscopy (EM) of VLP assembly and budding from control insect cells. Control Sf9 cells were infected with recombinant baculovirus AcMNPV^{Pr55Gag} expressing the HIV-1 Pr55Gag polyprotein, harvested at 48hrs post-infection, and processed for EM observation. Electron micrographs of ultrathin sections of cell pellets showing VLPs budding at their surface are presented at low **(a)**, and high magnification (inset, **b**). *Abbreviations:* EC, extracellular space; PM, plasma membrane; Cy, cytoplasm.

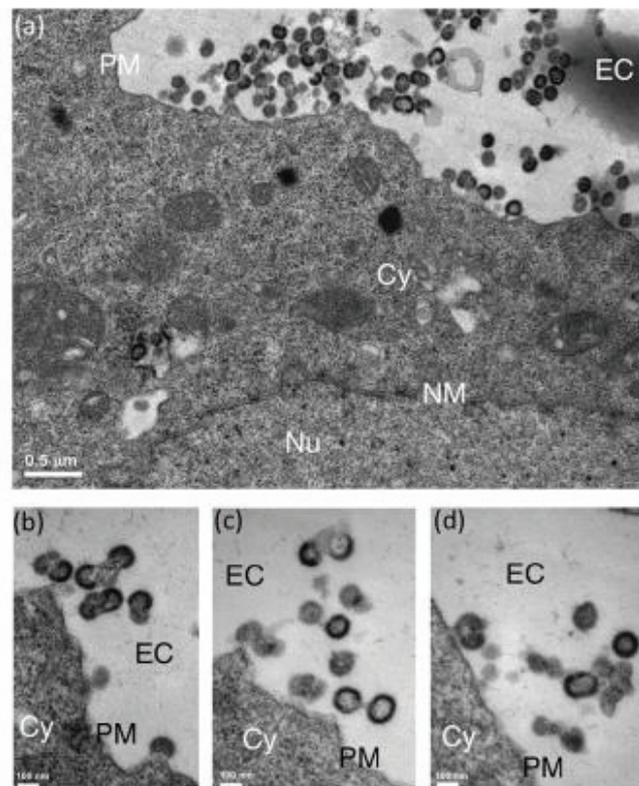


Figure 5. EM analysis of VLP assembly in α Rep4E3-expressing insect cells. *Sf*/(Myr+) α Rep4E3-GFP cells were infected with AcMNPV^{Spz}, harvested at 48hrs post-infection and processed for EM. Electron micrographs of ultrathin sections of cell pellets are shown at low (a), and high magnifications (b–d). EC, extracellular space; PM, plasma membrane; Cy, cytoplasm; Nu, nucleoplasm; NM, nuclear membrane.

AcMNPV^{Spz} produced a majority of aberrant VLPs, irregular in size and shape, with the frequent occurrence of more than one single immature Gag protein core within the same membrane bud (Fig. 5). Likewise, *Sf*/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells infected with AcMNPV^{Spz} showed aberrant VLPs (Fig. 6a), or arrested budding morphologies at their surface (Fig. 6b). Interestingly, a peculiar type of pattern was observed in (Myr+) α Rep9A8-expressing cells, consisting of (i) the accumulation of α Rep4E3 and α Rep9A8 material at the inner leaflet of the plasma membrane (Figs 6b and 7a), and (ii) intravesicular budding of VLPs which seemed to be morphologically normal (Fig. 7a,b). This suggested that one of the consequences of the (Myr+) α Rep9A8-mediated blockade of normal VLP budding at the plasma membrane was the redirection of Gag to the internal membranous compartment, and the budding of VLPs into intracytoplasmic vesicles.

Quantification of normal and aberrant VLPs released by control Sf9 cells exhibited less than 10% irregular particles (9.2%) out of a total number of 869 individual particles examined. However, *Sf*/(Myr+) α Rep4E3-GFP cells released more than one third (35%) aberrant VLPs ($n = 287$), and *Sf*/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells about one quarter of the total (24.2%; $n = 431$) (see Supplementary Fig. S3).

Taken together, the results of these analyses suggested that both α Rep4E3 and α Rep9A8 negatively interfered with the assembly of Gag proteins into immature HIV-1 particles. These negative effects were not quantitative, as there was no significant difference in the yields of extracellular VLPs compared to control cells. The effects of α Rep4E3 and α Rep9A8 on Gag assembly were qualitative, as shown by the alteration of the structure of VLPs and the change in their cellular sites of assembly. In addition, EM analysis suggested two distinct phenotypes for α Rep4E3 and α Rep9A8.

Co-encapsidation of Gag and N-myristoylated α Rep proteins into VLPs. Since defective VLP assemblies were observed in the presence of α Rep4E3 and α Rep9A8, we hypothesized that these α Rep proteins could be co-packaged with Gag precursor, resulting in altered VLP structure. To test this hypothesis, VLPs released from AcMNPV^{Spz}-infected *Sf*/(Myr+) α Rep4E3-GFP and *Sf*/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells were purified by ultracentrifugation, and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, using anti-Gag antibody to detect the Gag polyprotein, and histidine antibody to detect the His-tagged α Rep-GFP proteins. An anti-histidine immunoreactive protein was detected in both types of VLP samples, at 59 and 55 kDa for α Rep4E3-GFP and α Rep9A8-GFP, respectively. These values corresponded to the respective molecular weights of the GFP-fused α Rep proteins. The variations in the signal intensity of the 59-kDa and 55-kDa proteins throughout the gradient fractions followed the same pattern as that of the Pr55Gag band, with a maximum intensity in fractions of density $\rho = 1.18$ (see Supplementary Fig. S4). This suggested that N-myristoylated α Rep4E3-GFP and α Rep9A8-GFP proteins were able to interact with Pr55Gag at the VLP assembly sites, and to be copackaged with Pr55Gag into

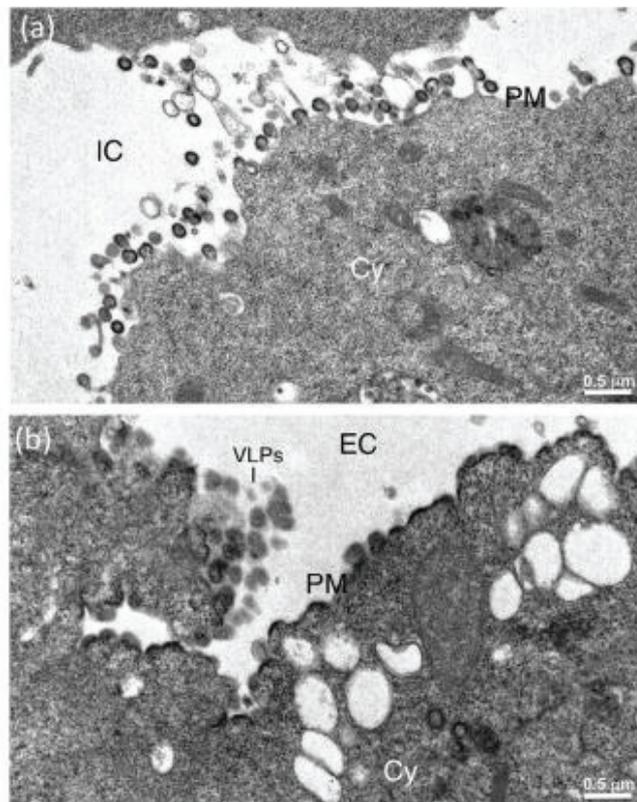


Figure 6. EM analysis of VLP assembly in α Rep9A8-expressing insect cells. *Sf*/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells were infected with AcMNPV^{prg}, harvested at 48hrs post-infection and processed for EM. The cells presented in panel (a) show VLP budding from the plasma membrane. The cell presented in panel (b) shows simultaneous VLP budding and abnormal accumulation of Pr55Gag polyprotein at the plasma membrane. IC, intercellular space; EC, extracellular space; PM, plasma membrane; Cy, cytoplasm.

membrane-enveloped VLPs of aberrant structure. Of note, no α Rep-GFP protein was detected at density 1.18 in culture media of *Sf*/(Myr+) α Rep4E3-GFP and *Sf*/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells in the absence of the AcMNPV^{prg} vector (not shown).

Antiviral activity of α Rep4E3 and α Rep9A8 proteins in human T-cells challenged with HIV-1.

The genes encoding α Rep4E3-GFP, α Rep9A8-GFP and α Rep9C2-GFP (GFP-fused irrelevant α Rep used as negative control) were transferred into SupT1 cells. Three α Rep-expressing cell lines were successfully established, which were referred to as SupT1/ α Rep4E3-GFP, SupT1/ α Rep9A8-GFP and SupT1/ α Rep9C2-GFP cells, respectively (see Supplementary Fig. S5). Of note, the non-N-myristoylated versions of α Rep proteins were expressed in SupT1 cells to allow them to diffuse and exert their possible antiviral activity in all cell compartments. The cells were infected with HIV-1 and the effect of the α Rep proteins on HIV-1 infection was assessed by different methods, as described below. As shown by fluorescence microscopy and flow cytometry, the expression of α Rep-GFP molecules was maintained at levels close to 100% throughout the time of the viral challenge (21 days; Fig. 8a).

Kinetics of HIV-1 particle production. CAP24-ELISA was used to evaluate the quantities of extracellular viral particles released from HIV-1-infected cells at days (D) 3, 7, 14, and 21 pi (Fig. 8b). In control cells, CAP24 was detected as early as at D7, with a peak at D14 followed by a decrease at D21 pi (Fig. 8b). However, CAP24 was barely detectable in samples from SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP cell cultures at D14 pi. The amounts detected were about 10-fold lower compared to that of control samples, and the CAP24 reached the levels observed in control D14-samples only at D21 pi. This indicated that in the cells expressing α Rep4E3 and α Rep9A8, there was a significant delay in the kinetics of HIV-1 replication and viral progeny production.

Extracellular release of HIV-1 genomes. The viral genome copies in the culture media followed the same kinetics as CAP24, with a similar delay observed in the presence of α Rep4E3 and α Rep9A8 (Fig. 8c). The viral load was maximal at D14 pi in control samples, and decreased at D21 due to cell apoptosis. In culture media of SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP cells, the virus loads slowly increased with time, and reached the maximal levels of control samples at D21 pi (Fig. 8c). A net difference between the α Rep-induced inhibitory effects was observed at D14 pi, with a more pronounced negative effect with α Rep4E3 (ca. 8-fold) compared to α Rep9A8 (ca. 2-fold; Fig. 8c).

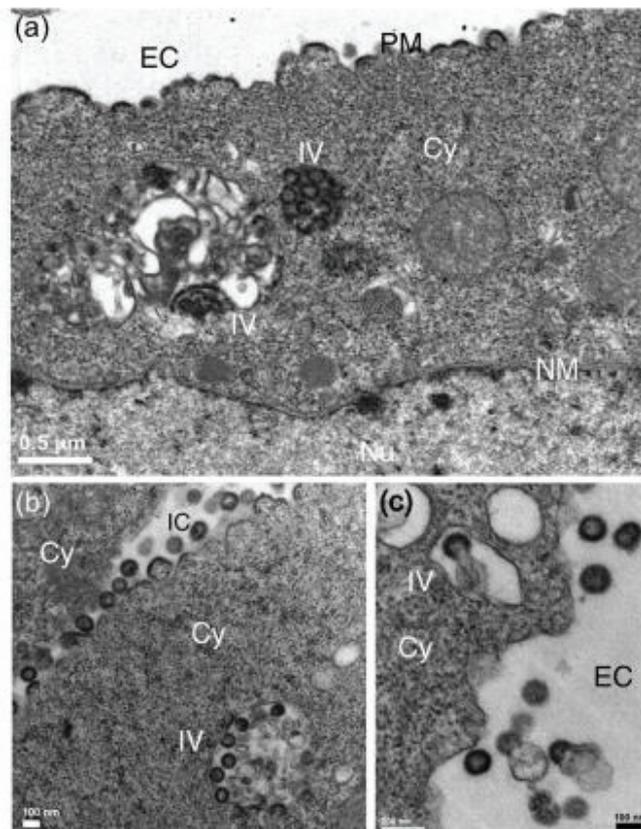


Figure 7. Intravesicular assembly of VLPs in α Rep9A8-expressing insect cells. Electron micrographs of ultrathin sections of AcMNPV^{gag}-infected Sf/(Myr+) α Rep9A8-GFP cells at 48hrs post-infection. The cell presented in panel (a) shows the abnormal accumulation of Pr55Gag polyprotein at the plasma membrane, and the occurrence of VLPs within intracytoplasmic vesicles. Panels (b,c) present different cell sections at high magnification, showing simultaneous intravesicular budding and plasma membrane budding of VLPs. IC, intercellular space; EC, extracellular space; PM, plasma membrane; Cy, cytoplasm; IV, intracellular vesicle; Nu, nucleoplasm; NM, nuclear membrane.

Cytopathic effects of HIV-1 on α Rep-expressing SupT1 cells. HIV-1-infected SupT1 cells were maintained in culture for six weeks. They were monitored by phase microscopy for possible morphological alterations at different time points after infection (Fig. 9a). Formation of syncytia and premature cell death were clearly visible in control cell cultures, in which HIV-1 drastically reduced the proportion of live cells. These cellular alterations were delayed in SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP cultures (Fig. 9a). Cells samples were also collected at 3-day intervals, and controlled for cell count and cell viability. As expected, the cell concentration and viability decreased rapidly in control SupT1 cell cultures after D7 pi, and there was no more viable cells detected at D21 pi (Fig. 9b,c). The diminution in living cell numbers was delayed and more progressive in SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP cultures, with a decline starting only after D14 pi. A total cell loss was observed at D28 pi in SupT1/ α Rep4E3-GFP cultures, but a rebound in cell growth was observed after D28 pi in SupT1/ α Rep9A8-GFP cultures (Fig. 9b,c).

Proviral DNA status in HIV-1-infected α Rep-expressing SupT1 cells. The viral genome integration in HIV-1-infected SupT1 cells, evaluated at D14 pi by quantitative PCR, showed that C_t values were not significantly different between control and α Rep-expressing cells (see Supplementary Table S2). This suggested that resident, intracellular α Rep4E3 and α Rep9A8 did not prevent the viral genome integration in SupT1 cells, and that the antiviral effects of α Rep4E3 and α Rep9A8 proteins did not depend on viral integration.

Molecular mechanisms of the α Rep4E3- and α Rep9A8-mediated antiviral effects. Two major parameters influence the infectivity of HIV-1: (i) the degree of proteolytic processing of Pr55Gag which controls the transition from immature to condensed, mature core; (ii) the ability of the virus to encapsidate its genomic RNA during its morphogenetic process, and thus the genome content of viral particles. It has been commonly considered that HIV-1, like most retroviruses, produce large numbers of defective particles lacking all or part of the viral genome, and that the infectivity index is usually in the low range of values, $\leq 1:1,000$. However, the ratio of infectious to defective HIV-1 particles has been recently re-evaluated to 1:8⁵⁵. Both Gag maturation and genome content were assayed in particles produced by α Rep-expressing cells infected with HIV-1.

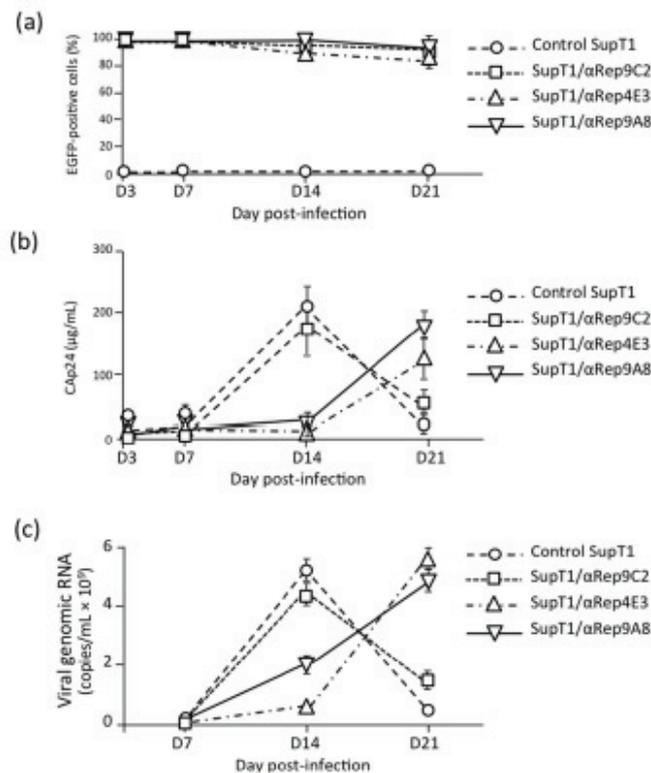


Figure 8. HIV-1 infection of α Rep4E3- and α Rep9A8-expressing SupT1 cells. **(a)** Kinetics of GFP expression. Control cells (unmodified SupT1 and SupT1/ α Rep9C2-GFP) and α Rep-GFP-expressing SupT1 cells (SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP) were infected with HIV-1 at MOI 1, and monitored by flow cytometry from day 3 (D3) to D21 pi. Data presented are mean \pm SD of triplicate experiments. **(b)** Kinetics of extracellular release of viral particles. Samples from culture media were collected at different time points pi, as indicated, and the levels of CAP24 antigen determined by ELISA. **(c)** Kinetics of extracellular release of viral genomes. Viral RNA yields were determined at D7, D14, and D21 pi in samples of culture media, and results expressed as copy number per mL.

Proteolytic maturation of the Pr55Gag precursor. The viral protease-mediated processing of HIV-1 Pr55Gag is a sequential and high-order process. The initial cleavage occurs between SP1 and the NC domain, and the secondary (e.g. MA-CA) and tertiary (e.g. CAP24-SP1) cleavages occur at approximately 10-fold and 400-fold lower rates, respectively, than the initial cut^{56,57}. The extent of Gag processing was assayed using HB-8975, a monoclonal antibody which recognized the C-terminal epitope DTGHSSQVSNY only on free MAP17 protein, and not on intact Pr55Gag. After cleavage of the MA-CA junction, the exposed epitope can compete with a synthetic peptide of the same sequence for binding to HB-8975. The degree of competition in ELISA correlates with the extent of MA-CA cleavage, and provided a quantitative evaluation of the degree of Pr55Gag maturation, as shown in previous studies^{58–60}. The results indicated that more than 85% viral particles which egressed from control, HIV-1-infected cells, and 75% from SupT1/ α Rep4E3-GFP cells, consisted of mature particles (Fig. 10a). This proportion was only 35% for SupT1/ α Rep9A8-GFP cells (Fig. 10a), suggesting that α Rep9A8, but not α Rep4E3, negatively interfered with the virus maturation.

Viral genome encapsidation. The efficiency of viral genome packaging in the different SupT1 cell lines was measured by the ratio of extracellular genome concentration to CAP24 concentration at D14 pi, and the results normalized to 25 μ g CAP24 per sample, a value which corresponded to 5×10^7 to 7×10^7 infectious particles^{61,62}, and 4×10^8 to 6×10^8 total particles⁵⁵. The results showed that the RNA packaging function was altered in both SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP cell lines, but to different levels: a 10- to 13-fold reduction in RNA packaging efficiency was observed in α Rep4E3-expressing cells, versus a 3- to 4-fold reduction in α Rep9A8-expressing cells (Fig. 10b). This implied that the antiviral activity associated with α Rep4E3 was predominantly directed against the viral genome packaging.

Infectivity of the viral progeny. The infectious titer of the viral progeny released from the different SupT1 cell lines was determined using Jurkat-GFP cells. This Jurkat T cell-based reporter cell line expresses CD4 and CXCR4 receptors, and enhanced GFP under the control of the HIV-1 LTR promoter, as a direct and quantitative marker of HIV-1 infection and Tat expression⁶³. The results obtained at D10 post-reinfection (Fig. 11, leftmost bars) indicated that the infectious titers of viruses which egressed from SupT1/ α Rep4E3-GFP (1.4%) and SupT1/ α Rep9A8-GFP (1.25%) were significantly lower (15- to 17-fold), compared to that from the two control cell lines, SupT1 (24%) and SupT1/ α Rep9C2-GFP cells (19.5%). To evaluate the long-term effects of α Rep proteins on

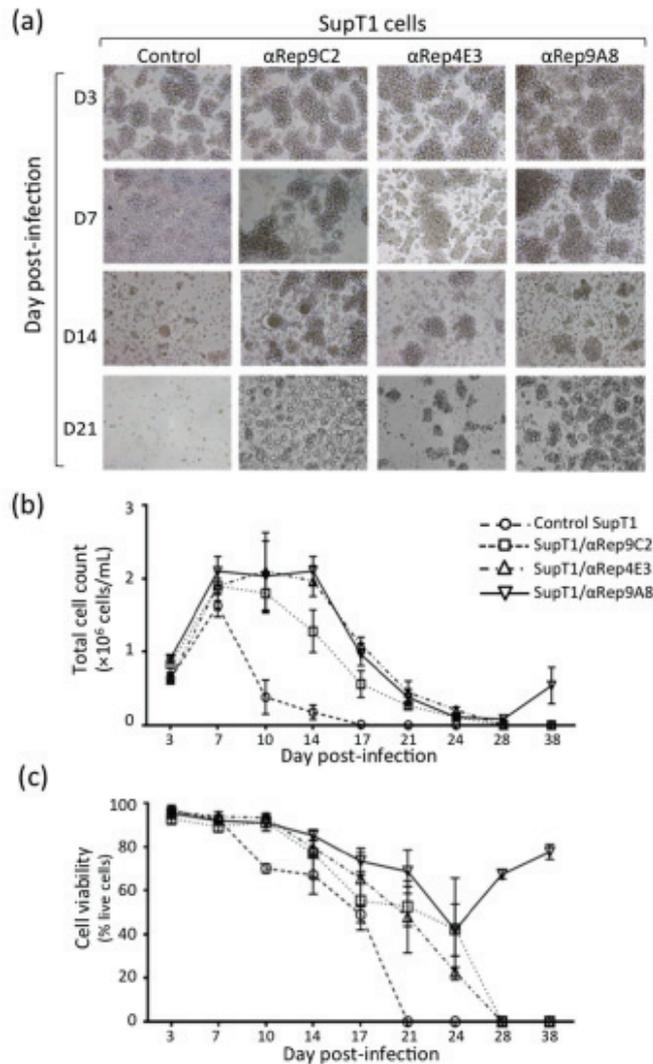


Figure 9. Cytopathogenicity of HIV-1 in α Rep-expressing cells. HIV-1-infected cells were maintained in culture for several weeks. Control cell cultures consisted of unmodified SupT1 cells, and of SupT1/ α Rep9C2-GFP cells expressing an irrelevant α Rep serving as negative control for α Rep4E3 and α Rep9A8. At different time intervals, as indicated, samples were collected and monitored for cell morphology, concentration, and viability. **(a)** Cell morphology, analyzed by phase contrast microscopy. **(b)** Total cell number per mL. **(c)** Percentage of viable cells. Bars represent the mean \pm SD ($n = 3$).

virus titers, the reinfected Jurkat-GFP cells were maintained in culture, and analyzed by flow cytometry at D14 post-reinfection (Fig. 11, rightmost bars). The virus titers found in SupT1/ α Rep4E3-GFP samples were in the same range of values as those measured in control cells at D10. However, a significant difference (~ 2 -fold) was observed between Jurkat-GFP cells reinfected with SupT1/ α Rep4E3-GFP (27.8%) and SupT1/ α Rep9A8-GFP supernatants (15.4%) at D14 post-reinfection. This indicated that α Rep9A8 had a more pronounced negative effect on virus infectivity, compared to α Rep4E3. Of note, the apparently low infectious titers of culture supernatants from control SupT1 cells at D14 post-reinfection were due to the massive cell death induced by HIV-1 in Jurkat-GFP cells at this time point, and no conclusion could be deduced from these values.

Resident α Rep9A8 protein in SupT1 cells conferred resistance to HIV-1 infection. Cells which survived from the HIV-1-infected SupT1/ α Rep9A8-GFP cultures (refer to Fig. 9b,c) were collected at D38 pi, and were found to be healthy under the light and fluorescence microscopes (Fig. 12a). Samples from SupT1/ α Rep9A8-GFP culture supernatant at D38 pi were then assayed for extracellular virus yields. Viral particles and genomes were found in these samples, at concentrations almost equivalent to the values determined at D14 pi (Fig. 12b,c). Of note, these values were about 10-fold lower for CAP24 and 3-fold lower for the viral genome copies, compared to the corresponding parameters in control cell cultures at D14 pi (compare Fig. 12b and Fig. 8b, and Fig. 12c and Fig. 8c, respectively). The infectious virus titer of SupT1/ α Rep9A8-GFP culture supernatants at D38 pi was then determined using Jurkat-GFP indicator cells. The results showed that most of the extracellular HIV-1 particles released from SupT1/ α Rep9A8-GFP at this time pi were noninfectious (Fig. 12d).

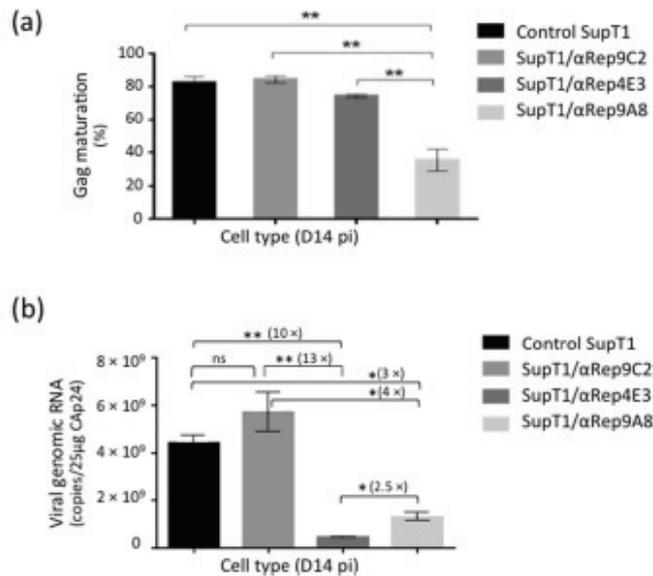


Figure 10. Antiviral activity of α Rep4E3 and α Rep9A8. **(a)**, PR-mediated maturation cleavage of Pr55Gag. Control cells (unmodified SupT1 and SupT1/ α Rep9C2-GFP), and α Rep-expressing cells (SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP) were infected with HIV-1 at the same MOI, and extracellular media collected. After normalization to the CAp24 level (80 μ g per sample), the degree of proteolytic cleavage of Pr55Gag at the MA-CA junction by the viral protease (PR) was evaluated using an ELISA-based maturation assay. The bar graph represents the percentage of cleaved Pr55Gag (mean \pm SD; $n = 3$), estimated from the degree of accessibility and reactivity of a Gag-embedded MA epitope towards its specific monoclonal antibody, in competition with a free synthetic peptide reproducing its sequence (refer to *Materials & Methods*). **(b)**, Viral genome packaging. Bar graph representing the concentrations of HIV-1 genomes in culture media after normalization to CAp24 levels (genome copy number per 25 μ g CAp24; mean \pm SD; $n = 3$), and the fold changes in culture media of SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP cells, compared to control cell lines SupT1 and SupT1/ α Rep9C2-GFP. (**), $P < 0.01$; (*), $P < 0.05$; ns, not significant.

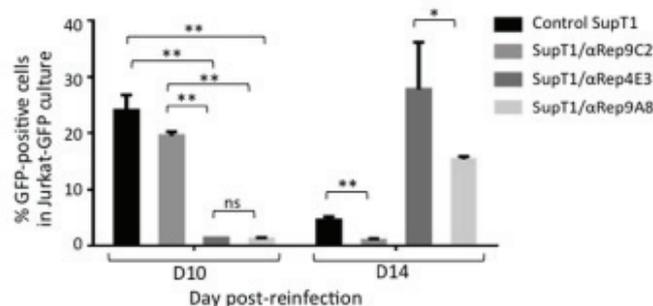


Figure 11. Infectivity of virus progeny released by HIV-1-infected, α Rep-expressing SupT1 cells. Control cells (unmodified SupT1 and SupT1/ α Rep9C2-GFP), and α Rep-expressing cells (SupT1/ α Rep4E3-GFP and SupT1/ α Rep9A8-GFP) were infected with HIV-1 at the same MOI. Samples from culture media were collected at D14 pi, and re-inoculated to Tat-dependent, indicator T-cells (Jurkat-GFP cells) after adjustment of the CAp24 levels to 15 μ g per sample. Jurkat-GFP cells were harvested at D10 and D14 post-reinfection, and GFP-positive cells determined by flow cytometry. The results presented in the bar graph (mean \pm SD; $n = 3$) are the percentages of GFP-positive, fluorescent cells. (**), $P < 0.01$; ns, not significant.

Discussion

In recent studies, we established the proof-of-concept that artificial proteins based on repeat motif scaffolds, could be used as intracellular antiviral agents, and we demonstrated their therapeutic potential as novel inhibitors of HIV-1^{22,23,25}. In the present work, we applied this concept to another library of highly thermostable protein scaffolds, made up of alpha-helical HEAT-like repeats, called α Reps^{26,27,29}. The bait used for the screening of our phage-displayed α Rep library was the HIV-1 Pr55Gag-derived polypeptide CA₂₁SP1-NC. It contained Gag determinants essential for achieving the late steps of the HIV-1 life cycle, i.e. the alpha-helical spacer peptide SP1 and its two flanking domains, the C-terminal domain of the CA protein and the full-length NC domain. Both SP1^{30–35} and NC^{44,45} have been used as targets for antiviral drugs against HIV-1.

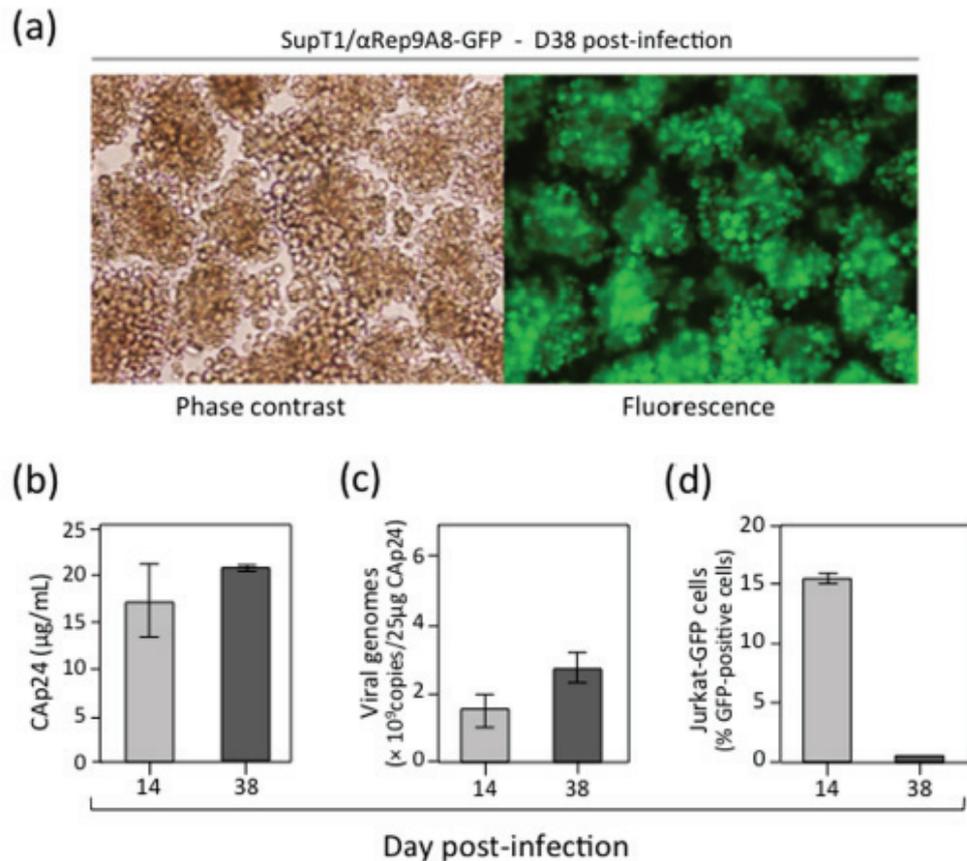


Figure 12. Resistance of SupT1/ α Rep9A8 cells to HIV-1 infection. (a), HIV-1-infected SupT1/ α Rep9A8-GFP cells were harvested at D38 pi, and cell morphology analyzed by light and fluorescence microscopy (magnification 100X). (b–d), Samples from the cell culture medium collected at D38 pi were assayed for (b) CAP24 levels, (c) viral RNA concentration, and (d) infectivity expressed as the percentage of GFP-positive Jurkat-GFP reporter cells. Data (mean \pm SD; $n = 3$) were compared with those obtained at D14 pi.

Two α Rep molecules, α Rep4E3 and α Rep9A8, with high binding activity to CA₂₁SP1-NC were isolated from our screen. Both were found to exert a modest but significant inhibition on HIV-1, as shown by various biological assays. Their antiviral effects were independent of the proviral integration and occurred at the post-integration step. Differences were observed in their antiviral properties, as schematized in the model of Fig. 13. The α Rep4E3 showed a marked negative effect on the viral genome packaging, while α Rep9A8 interfered negatively with Gag maturation and its corollary, virus infectivity. More interesting, α Rep9A8-expressing SupT1 cells acquired a long-term resistance to HIV-1, as shown by the absence of detectable infectious particles from the culture medium of α Rep9A8-expressing SupT1 cells collected five weeks after HIV-1 challenge.

The mapping of the binding determinants of α Rep4E3 and α Rep9A8 on the viral target provided clues to their antiviral functions. The antiviral activity of α Rep4E3, which mainly concerned the viral genome packaging, was consistent with the localization of its major binding site to the downstream zinc finger ZF2. The binding site of α Rep9A8 spanned a wider NC domain, encompassing both ZF1 and ZF2 with a possible SP1 overlapping. The masking of SP1 cleavage sites would explain the negative interference of α Rep9A8 with the PR-mediated Gag processing.

Since no binding of α Rep9A8 to the GST-CA₂₁-SP1 target was detected in our pull-down assays, it could be argued that the removal of the NC domain had altered the structure of SP1, and transformed its α -helical structure^{64,65} into a non-structured region. Even though this hypothesis cannot be totally excluded, it was not supported by the observation that isolated SP1 peptide in aqueous solution spontaneously folds into an α -helix without the aid of the NC, in a concentration-dependent manner. This α -helix forms at millimolar protein concentrations, i.e. at values equivalent to those found in virions^{66–68}. Our results suggested that the negative interference of α Rep9A8 with the viral PR resulted from the masking of the SP1 domain, indirectly *via* steric hindrance, rather than *via* direct binding.

The binding of α Rep9A8 to a relatively large protein domain such as the NC raised a number of issues concerning the structure of the two partners. NMR studies of the three-dimensional structure of the HIV-1 NC protein have shown that the two ZF form a single folded protein domain characterized by spatial contacts between residues belonging to ZF1 and ZF2^{69,70}. This globular structure is favoured by a highly conserved proline residue (P408 in HIV-1_{LAI} sequence) generating a bend in the linker separating the two ZF, and is stabilized by hydrophobic and aromatic interactions between residues belonging to ZF1 and ZF2^{69,70}. The binding surface of an α Rep

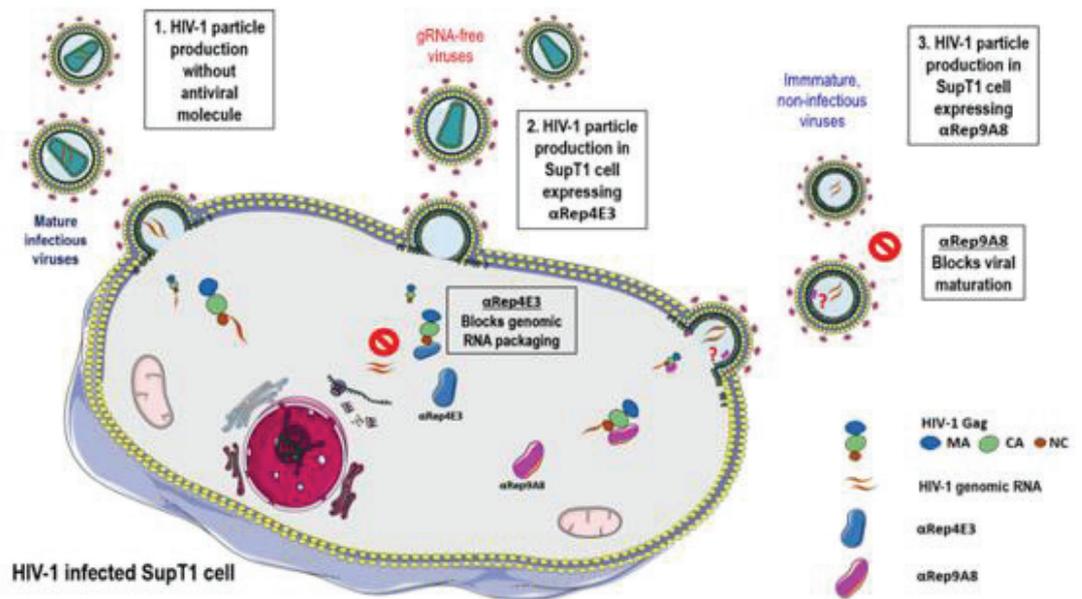


Figure 13. Schematic representation of the distinct antiviral effects of α Rep4E3 and α Rep9A8 in HIV-1-infected SupT1 cell. The normal pathway of HIV-1 assembly and egress is represented in (1); the antiviral effects of the α Rep4E3 and α Rep9A8 proteins are displayed in pathways (2) and (3). α Rep4E3 (blue symbol) negatively interferes with Gag-RNA interaction and genome packaging; α Rep9A8 (pink symbol) acts as a virus maturation inhibitor. Of note, the model presented in this figure was built by the first author, using a combination of elements available from the Servier Medical Art site <http://smart.servier.com/>. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). As specified, users are free to share, copy and redistribute the material in any medium or format, and to adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

with six internal repeats, such as α Rep9A8, could be estimated to measure between 1,200 and 1,500 Å², based on structural studies of α Rep proteins co-crystallized with their target²⁶. Such a surface area would theoretically be sufficient to interact with amino acid residues belonging to the two zinc fingers, and even to the adjacent SP1 linker.

The role of the NC and its two zinc fingers in the temporal control of reverse transcription, viral genome replication and packaging have been extensively documented, as well as their contribution to the structure of the viral core^{36–40,71–73}. The observed antiviral effects of NC-interactors such as α Rep4E3 and α Rep9A8 might result from the blockage of one or several of these multiple functions. The application of real-time observation of fluorescent-tagged Gag in live cells⁷⁴ to α Rep-expressing live SupT1 cells should help us to dissect the kinetics and molecular mechanisms of the α Rep-mediated antiviral effects, in particular their interference with Gag-RNA interaction and Gag assembly. NC also plays a role in the budding and release of HIV-1 particles by recruiting proteins of the cellular machinery necessary for viral budding, such as ALIX/AIP1^{46,47}. Interestingly however, α Rep4E3 and α Rep9A8 showed no detectable negative effect on virus particle egress.

In terms of antiviral activity, the present study confirmed the feasibility of artificially produce antiviral restriction-like factors^{22,23,25}. However, the immunogenicity of such molecules will need to be assessed before envisaging any therapeutic applications. As a preliminary evaluation, we have performed the T-cell epitope prediction search for α Rep4E3 and α Rep9A8 (<http://tools.iedb.org/processing/help/>), and found negative MHC score values for both of them (unpublished data). The results of our comparative study of α Rep4E3 and α Rep9A8 properties suggested that, even though α Rep4E3 was more detrimental to viral genome packaging compared to α Rep9A8, the therapeutic advantage would be in favour of the virus maturation-interfering α Rep9A8. In addition, the finding that α Rep9A8 had the capability to block the production of infectious viral particles, and prolong the survival of HIV-1-infected cells, could significantly influence future strategies and choice of antivirals in anti-HIV-1 cell therapy.

Methods

Eukaryotic cells. *Insect cells.* *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells (Life Technologies) were maintained as monolayers at 28 °C in Grace's insect medium (Life Technologies) supplemented with 15% fetal bovine serum, penicillin (100 Units/mL), and streptomycin (100 µg/mL). *Mammalian cells.* Human embryonic kidney cells (HEK293T), obtained from ATCC (Manassas, VA) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies). Human T cells lymphoblastic lymphoma cells SupT1 and Jurkat LTR-GFP cells (JLTRG; obtained from the NIH AIDS Reagent Program) were grown in RPMI-1640 medium containing penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), 2mM L-glutamine, and 10% FBS (HyClone). All cell lines were maintained in a humidified 37 °C incubator containing 5% CO₂.

Bacterial cells and plasmid vectors. XL-1 Blue bacteria (Stratagene) were used as the host strain for generating the α Rep phage library and for phage amplification. M15[pREP4] bacteria (Qiagen) were used to produce H₆-tagged α Rep proteins. *E. coli* BL21 was used as the host strain for producing GST-tagged proteins of HIV-1 Gag domains. The pQE-31 plasmid (Qiagen) was used for the production of H₆-tagged recombinant α Rep proteins. The pGEX-4T1 plasmid (GE Healthcare Life Sciences) was used to produce GST-tagged recombinant proteins at high levels.

Viral vectors. *Baculoviral vector.* *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) has been used to construct the recombinant baculoviral vector AcMNPV^{gag} expressing the full-length, N-myristoylated wild-type HIV-1 Gag polyprotein, abbreviated Pr55Gag. The production of recombinant Pr55Gag and VLPs in AcMNPV^{gag}-infected Sf9 cells have been described in detail in previous studies^{48,50,51}.

VSVg-pseudotyped lentiviral vectors. CGW, a HIV-1-based self-inactivating (SIN) lentiviral vector of third-generation^{25,75} was used as the backbone vector to transfer the α Rep genes into HEK293T and SupT1 cells. HEK293T cells at 70–80% confluence in 10-cm dish were co-transfected with the CGW transfer vector (10 μ g/dish) carrying each one of the GFP-fused α Rep genes, the packaging construct pMDLg/pRRE (6.5 μ g), pRSV-Rev (2.5 μ g), and pMD.2G (3.5 μ g). Lentiviral vector particles were harvested from the culture supernatant at 24 and 48 hrs post-cotransfection. High-titer vector stocks were obtained by ultracentrifugation through a 20% sucrose cushion. Viral titers were determined from the percentage of GFP-positive cells in HEK293T cultures infected with serial dilution of vector stock samples, at 48 hrs post-infection.

HIV-1 stocks. Replication-competent HIV-1 NL₄₋₃ virus, a X4-tropic strain of HIV-1, was produced by transient transfection of HEK293T cells by the pNL4-3 plasmid. In brief, monolayers of HEK293T cells at 4×10^6 cells per 10-cm dish were transfected with 5 μ g of the pNL₄₋₃ plasmid using transIT-X2 transfection reagent (Mirus Bio, Madison, WI) according to the manufacturer's protocol. The cells were allowed to grow for 48 hrs. HIV-1 virus particles in culture supernatant were then harvested by filtration through sterile syringe filters with a 0.45 μ m pore size (Millex-HA filter unit; Merck Millipore, Hessen, Germany). HIV-1 stock was aliquoted and kept frozen at -80°C . Virus particle titers were determined by conventional ELISA for CAp24-antigen, using the Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Viral loads were determined using the COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan HIV-1 Test v2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ).

Generation of HIV-1 target proteins. Our viral targets consisted of various glutathione-S-transferase (GST)-fused polyproteins derived from the HIV-1 GagPr55 precursor (LAI isolate). GST-CA₂₁-SP1-NC included the 21 amino acids of the C-terminal domain of the capsid protein (CA), fused to the SP1 linker and the whole nucleocapsid (NC) domain, encompassing its two zinc fingers (ZF) until residue F433 (Fig. 1a). A panel of C-truncated mutants of GST-CA₂₁-SP1-NC were constructed by PCR amplification, using specific oligonucleotide primers (see Supplementary Table S1). The amplification products were purified by GeneJET PCR Purification kit, and a first step gene cloning was performed using InsTAclone PCR cloning kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). XL-1 Blue competent cells were transformed by the ligation products, and colonies were picked for PCR amplification, restriction enzyme analysis using *Bam*HI and *Xho*I, followed by DNA sequencing. Each construct was isolated from the pTZ57R/T vector and transferred to pGEX-GST expression vector using the same restriction sites, *Bam*HI and *Xho*I. The step of clonal identification was performed as previously described^{21,22}.

Three pGEX-GST-*gag* plasmids were constructed: (i) pGEX-GST-CA₂₁-SP1-NC; (ii) pGEX-GST-CA₂₁-SP1-NC Δ ZF2; and (iii) pGEX-GST-CA₂₁-SP1. BL21 cells were used for recombinant Gag protein production. BL-21 harboring each of the recombinant pGEX-GST-*gag* plasmids were cultured in 200 mL LB broth containing 100 μ g/mL ampicillin and 1% (w/v) glucose, at 37 $^\circ\text{C}$ with shaking. When OD₆₀₀ reached 0.8, protein expression was induced by addition of 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), and maintained in culture at 30 $^\circ\text{C}$ overnight with shaking. Cells were pelleted by centrifugation at $1,200 \times g$ for 30 min at 4 $^\circ\text{C}$. Cell pellets were resuspended in PBS containing a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostics GmbH), then lysed by sonication. Soluble proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-agarose gel (ThermoFisher Scientific), following the protocol of the manufacturer, and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

Screening of the α Rep library on the viral target. The construction of the α Rep phage library 2.1 has been described in a previous study²⁷. In brief, the α Rep library was constructed by polymerization of synthetic microgenes corresponding to individual HEAT-like repeats, and the α Rep proteins were expressed at the surface of M13-derived filamentous phages (phage display). In terms of diversity, our α Rep library is estimated to contain 1.7×10^9 independent clones.

For the α Rep library screening, purified GST-CA₂₁-SP1-NC protein which represented our viral target was diluted at 5 μ g/mL in coating buffer (TBST: 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) was immobilized on glutathione-coated microtiter ELISA plate (ThermoFisher Scientific) by incubation overnight at 4 $^\circ\text{C}$ in a moisture chamber. The coated wells were washed four times with TBST, and saturated with blocking solution (2% BSA in TBST; 200 μ L/well) for 1 hr, after which an aliquot of the phage library was added to the GST-CA₂₁-SP1-NC coated wells, and incubated at room temperature (RT) for 1 hr with shaking. Several washes of the wells were then performed with TBST, and bound phages were eluted by three successive rounds of adsorption/elution. Phage elution was performed by acidic solution (0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.5) in the first two rounds. The last phage elution consisted of specific ligand elution^{76,77}, by using a large excess of GST-CA₂₁-SP1-NC as the competitor. The population of α Rep-displayed phages eluted from the GST-CA₂₁-SP1-NC bait was then amplified and subcloned in XL-1 Blue cells, as described for ankyrin scaffolds^{21,22}.

Individual phage clones were selected and amplified as previously described^{21,22}, and their respective binding activity towards the GST-CA₂₁-SP1-NC target was determined by ELISA. 100 μ L-aliquots of purified GST-CA₂₁-SP1-NC (5 μ g protein/mL) were diluted in PBS and dispensed into the wells of a glutathione-coated microtiter plate, then incubated overnight at 4 °C. The coated plate was washed four times with TBST, then blocked with TBST-BSA (200 μ L per well) at RT for 1 hr with shaking. After a washing step, 100 μ L-aliquots of each phage culture supernatant were added to the wells and incubated at RT for 1 hr, followed by HRP-conjugated mouse anti-M13 (GE Healthcare Life Sciences) diluted to 1:5,000 in TBST-BSA (100 μ L-aliquot per well), and incubation proceeded at RT for an extra 1 hr. The wells were washed again, prior to the addition of 100 μ L SureBlue™ TMB Microwell Substrate (KPL, Gaithersburg, MD). Reaction was stopped with 1 N HCl, and absorbance measured at 450 nm. Phage clones showing a high binding activity towards the immobilized target were sequenced and kept for cytoplasmic expression of individual α Rep proteins.

Expression and purification of α Rep proteins. The α Rep genes corresponding to strong binders to the GST-CA₂₁-SP1-NC target were sub-cloned in pQE-31 plasmids, and used for transforming the bacterial strain M15[pREP4] strain, as previously described^{21,22}. M15[pREP4] cells harboring the pQE31- α Rep plasmids were grown at 37 °C in LB broth supplemented with ampicillin (100 μ g/mL), kanamycin (25 μ g/mL), and 1% (w/v) glucose with shaking. When absorbance at 600 nm reached 0.8, the α Rep protein expression was induced by addition of 1 mM IPTG, and cells further incubated for 4 hrs at 30 °C with shaking. Bacteria were pelleted by centrifugation (1,200 \times g for 30 min at 4 °C), and bacterial cell pellets resuspended in PBS containing a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostics GmbH), then lysed by sonication. Bacterial cells lysates were clarified by centrifugation at 15,000 \times g for 30 min at 4 °C. Soluble, H₆-tagged recombinant α Rep proteins were purified by affinity chromatography on HisTrap columns (GE Healthcare Life Sciences), and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

Protein pull-down assays. *E. coli* BL21 cells were transformed with plasmids pGEX-4T1 harboring the genes encoding the GST-CA₂₁-SP1-NC, GST-CA₂₁-SP1-NCAZF2, and GST-CA₂₁-SP1 proteins, and bacterial cells cultured in Terrific broth (TR) medium supplemented with ampicillin (100 μ g/mL), and glucose (1%; w/v) at 37 °C with shaking. When the OD₆₀₀ of the cultures reached 0.8, protein expression was induced by addition of 0.1 mM IPTG, and the culture was further maintained at 30 °C for 16 hrs with shaking. Bacterial cells were then pelleted by centrifugation at 1,200 \times g at 4 °C for 30 min, resuspended in PBS containing a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostics GmbH), and sonicated. After clarification by centrifugation (15,000 \times g at 4 °C, for 30 min), aliquots of supernatants containing GST-CA₂₁-SP1-NC, GST-CA₂₁-SP1-NCAZF2, or GST-CA₂₁-SP1 were incubated with purified His-tagged α Rep4E3 or α Rep9A8 protein (300 μ g) in PBS-0.01% Tween-20 (1 ml total volume), for 2 hrs at RT with shaking. Aliquots (20 μ L) of glutathione-coated agarose beads (Pierce Glutathione Agarose; ThermoScientific, Waltham, MA) were then added to the reaction mixture, and further incubated for 1 hr at RT with shaking. Beads were centrifuged at low speed, washed 4 times with 0.05% Tween-20 in PBS, and resuspended and heat-denatured in SDS-PAGE loading buffer for Western blot analysis.

SDS-PAGE and Western blotting. Samples normalized to equal amounts of total protein were separated by electrophoresis in SDS-containing 12% or 15% polyacrylamide gel. Gels were stained with PageBlue™ protein staining solution (ThermoFisher Scientific), or used for Western blotting (WB). For WB, proteins separated on SDS-gels were electrically transferred to PVDF membrane (GE Healthcare, UK). After blocking with 5% skimmed milk in TBST, the PVDF membranes were incubated with various primary and secondary antibodies. GST-tagged proteins were detected using rabbit anti-GST antibody (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Canada [ABM]). Gag proteins were detected using rabbit anti-Pr55Gag antibody (laboratory-made^{31–33}). α Rep proteins were detected using mouse monoclonal anti-H₆ tag (ABM), in the conditions recommended by the manufacturer, or rabbit polyclonal anti- α Rep protein (laboratory-made). Secondary antibodies consisted of HRP- or phosphatase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG antibody (KPL, Gaithersburg, MD), followed by specific chromogen reaction and color development. The protein bands on blots were scanned using the Photo Scan Lite application and the average relative band intensity values were obtained using Image Studio Lite Software Version 5.2.5.

Construction of Sf9-derived cell lines stably expressing N-myristoylated α Rep proteins. The integrative plasmid pIB/V5-His-TOPO vector (Life Technologies) was used for stable expression of GFP-tagged and N-myristoylated α Rep proteins in Sf9 cells, under the control of the *OplE2* promoter. The sequence coding for a N-myristoylation signal^{22,25} was inserted at the 5'-end of the α Rep-GFP genes to obtain N-myristoylated recombinant proteins, abbreviated (Myr+) α Rep-GFP (Fig. 1c). Sf9 cells were transfected with the pIBV5-His-TOPO-based vectors (2.5 μ g/10⁶ cells), using the DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Roche Diagnostics GmbH). Transfected cells were maintained in complete Grace's insect cell medium containing blasticidin (ThermoFisher Scientific) at 100 μ g/mL. Two Sf9-derived cell lines were thus generated, referred to as Sf/(Myr+)4E3-GFP and Sf/(Myr+)9A8-GFP (see Supplementary Fig. S1). The expression of these proteins was monitored by fluorescence microscopy, and confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis using rabbit polyclonal anti- α Rep antibody (laboratory-made).

Isolation of extracellular HIV-1 virus-like particles (VLPs). Sf9 cells were infected with AcMNPV²⁰² at an input multiplicity of 10 PFU/cell (MOI 10). Cells were harvested at 48 hrs postinfection (pi), and the culture supernatants were clarified by low-speed centrifugation. VLPs were recovered from the clarified supernatants using a two-step procedure comprising (i) a sucrose-step gradient centrifugation, followed by (ii) isopycnic ultracentrifugation^{31–33,78}. In step (i), VLPs were pelleted through a sucrose cushion (20%, w/v, in TNE buffer; TNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM Na₂EDTA) at 30 krpm for 1 hr at 15 °C in a Beckman SW55 rotor. For step (ii), pelleted VLPs were gently resuspended in 0.20–0.25 mL PBS, and centrifuged in a linear

sucrose-D₂O gradient. Linear gradients (10-mL total volume, 30–50%, w:v) were centrifuged for 18 hrs at 28 krpm in a Beckman SW41 rotor. The 50% sucrose solution was prepared in D₂O buffered to pH 7.2 with NaOH, and the 30% sucrose solution was prepared in 10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 5.7 mM Na₂EDTA. Aliquots of 0.5 mL were collected from the top, and fractions analyzed for protein content by SDS-PAGE and immunoblotting, and by luciferase assays, as detailed below.

Luciferase-based quantitative assay for HIV-1 Gag assembly and extracellular release of VLPs. The co-expression of the Luc-Vpr fusion protein by AcMNPV^{LucVpr} results in the incorporation of Luc-Vpr into Gag VLPs *via* the interaction of Vpr with the Gag p6 domain³³. The levels of luciferase activity present in the pelletable fraction from the culture supernatant represented the amount of VLPs released. Aliquots (10⁶) of Sf9 (control cells), Sf/(Myr+)4E3-GFP and Sf/(Myr+)9A8-GFP cells were co-infected with two recombinant baculoviruses, AcMNPV^{gag} and AcMNPV^{LucVpr}, at equal multiplicity of infection each (MOI 10). Co-infected cells were harvested at 48 hrs pi, and the amounts of extracellular VLPs released in the culture medium were quantitated using luciferase assays. VLPs were pelleted and lysed in KDT buffer (KDT: 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.8, 1 mM DTT, containing 0.2% Triton × 100) for 30 min at 37 °C with vortexing every 10 min. The VLP-associated luciferase activity was measured using luciferin-ATP substrate (VivaGlo™ Luciferin, Promega) and the Lumat LB-9501 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), as previously described³³, and results expressed as relative light units (RLU) per µg protein. In order to correct for possible variations in the cellular expression of LucVpr, the values obtained with VLPs were normalized to the luciferase activity measured in the corresponding cell lysates, also expressed as RLU/µg protein.

Electron microscopy. Control Sf9 cells, Sf/(Myr+)4E3-GFP and Sf/(Myr+)9A8-GFP cells were infected with AcMNPV^{gag} at MOI 10, harvested at 48 hrs post-infection, and processed for EM observation as described in previous studies^{31–33,48}. Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5, post-fixed with osmium tetroxide (2% in H₂O) and treated with 0.5% tannic acid solution in H₂O. The specimens were dehydrated and embedded in Epon (Epon-812; Fulham, Latham, NY). Ultrathin sections were stained with 2.6% alkaline lead citrate and 0.5% uranyl acetate in 50% ethanol, and poststained with 0.5% uranyl acetate solution in H₂O. Grids were examined under a Jeol JEM-1400 electron microscope, equipped with an ORIUS™ digitalized camera (Gatan France, 78113-Grandchamp). For statistical EM analyses, a minimum of 50 grid squares containing 10 to 20 cell sections each were examined for counting VLPs budding at the cell surface, released in the external milieu or remaining in intracellular compartments^{31–33,48}.

Flow cytometry. The efficacy of cell transfection or transduction by lentiviral vectors was evaluated by flow cytometry. Cell samples were harvested at 48 hrs post-transfection or transduction. Cells were washed once with PBS, then with PBS containing 1% FBS-0.02% NaN₃. After the washing steps, the cells were resuspended in 1% paraformaldehyde in PBS and analyzed by flow cytometry, using a BD Accuri™C6 flow cytometer (BD Biosciences).

Construction of SupT1 cell lines stably expressing αRep proteins. VSVg-pseudotyped CGW vectors harboring the genes encoding the non-N-myristoylated version of αRep4E3-GFP or αRep9A8-GFP proteins were produced in HEK293T cells. As negative control, an irrelevant, GFP-fused αRep (αRep9C2-GFP) was also inserted into CGW. Aliquots of SupT1 cells were transduced with VSVg-pseudotyped CGW-αRep-GFP vectors at MOI 1, using spinoculation at 2,500 × g and 32 °C for 2 hrs in growth medium containing Polybrene (8 µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). At 16 hrs post-transduction, cells were washed 5 times with serum-free RPMI, and further incubated at 37 °C and 5% CO₂ in fresh C-RPMI supplemented with FBS (10%), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). The cells were then divided every 3 days and resuspended in fresh growth medium. Three stable cell lines, referred to as SupT1/αRep4E3-GFP, SupT1/αRep9A8-GFP and SupT1/αRep9C2-GFP cells, respectively, were isolated, and monitored by fluorescence microscopy and flow cytometry (BD Accuri™ C6, BD Biosciences).

Antiviral activity of αRep proteins in HIV-1-infected SupT1 cells. Control SupT1 cells and SupT1 cells stably expressing αRep4E3, αRep9A8 or αRep9C2 were maintained in growth medium for at least 4 weeks before incubation with HIV-1 NL₄₋₃ virus inoculum at MOI 1 for 16 hrs. After rinsing with serum-free medium, the cells were resuspended in fresh growth medium, and maintained in culture for several weeks. HIV-1 particle yields were determined in the cell culture supernatants collected at 3-day intervals, using CAP24-ELISA (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), and viral genome copy numbers were assayed using the COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan HIV-1 Test v2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ).

The evaluation of viral genome integration could not be performed by using conventional *Alu-Gag* PCR assays on αRep-expressing SupT1 cells. These stable cell lines were generated by using the third-generation lentiviral vectors, which contain part of the U5 region required for the integration of the αRep gene into the cell chromosome. As a consequence, this region would give a positive signal in *Alu-Gag* PCR assays, even with noninfected cells. To avoid this drawback, viral genome integration was evaluated using SYBR green-based qRT-PCR assays performed on high molecular weight DNA isolated from infected cell lysates, with a pair of primers specific to an internal sequence of the *pol-prt* gene (see Supplementary Table S2). The kit used in these assays was the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Product No. 11796828001), which has been developed to recover high molecular weight DNA from cellular genomic DNA, ranging from 30 to 50 kbp and free of contaminations with unintegrated viral cDNA.

The cell viability was evaluated using Trypan blue dye exclusion assays and the Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

ELISA-based HIV-1 Gag processing assay. The ELISA-based assay used to quantitate the extent of Gag processing relied on HB-8975, an anti-matrix (MA) monoclonal antibody issued from the hybridoma clone MHSV33C9/ATCC HB-8975, and obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). HB-8975 fails to react with its epitope (DTGHSSQVSQNY) located immediately upstream to the MA-CA junction when the MA domain is embedded in the Pr55Gag polyprotein precursor. After PR-mediated cleavage of the MA-CA junction, this epitope becomes fully exposed and accessible to HB-8975, and can compete with a free synthetic peptide mimicking its amino acid sequence. The degree of competition in ELISA correlates with the extent of MA-CA cut, and provides a quantitative evaluation of the degree of Pr55Gag maturation, as shown in previous studies^{58–60}.

Microtiter plates were coated with 100 μ L anti-MA HB-8975, diluted at 5 μ g/mL in coating buffer (1 M NaHCO₃ pH 9.6), and left overnight at 4 °C in a moisture chamber. Wells were washed 3 times with PBS-T, and incubated with 200 μ L blocking solution (2% BSA in PBS) at RT for 1 hr to prevent non-specific binding. Next, 60 μ L-aliquots of cell culture medium, normalized to the same CAP24 titer (80 μ g/mL), were pre-incubated with Triton X-100 (1% final concentration) and 10 ng/mL biotinylated synthetic MAP17 C-terminal peptide at RT for 10 min. The mixtures were then added to the wells and incubation proceeded for 1 hr. The binding reaction was revealed by incubation with HRP-conjugated streptavidin at RT for 1 hr, followed by addition of 100 μ L-aliquots of TMB microwell peroxidase substrate. The reaction was stopped with 1 N HCl, and the optical density measured at 450 nm.

Infectivity assays. Infectious titers were determined using JLTRG cells, a CD4/CXCR4-expressing Jurkat T cell-based reporter cell line, which harbors the enhanced GFP gene under the control of the HIV-1 LTR promoter. JLTRG cells (referred to as Jurkat-GFP cells in the present study) are Tat-dependent indicator T-cells which express GFP upon infection with HIV-1⁶³. Samples from culture supernatants were adjusted to equal amounts of CAP24 (15 μ g/mL) by dilution into fresh C-RPMI. Jurkat-GFP cells were seeded at 2.5×10^5 cells/well in 96-well culture plate containing 8 μ g/mL Polybrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). 100 μ L-aliquots of the CAP24-normalized culture supernatants were added to the wells, and further incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 16 hrs. At 16 hrs pi, 100 μ L-aliquots of fresh C-RPMI was added to the wells. Jurkat-GFP cells were harvested at D14 pi and assayed for GFP-positivity by flow cytometry^{63,79–81}.

Statistical analysis. Unless otherwise stated, results were expressed as mean \pm SD of *n* experiments, using the GraphPad Prism version 6.01 for Windows (www.graphpad.com; GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences were considered statistically significant when *P* < 0.05.

References

- Siliciano, J. D. & Siliciano, R. F. Recent trends in HIV-1 drug resistance. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 487–494 (2013).
- Siliciano, J. D. & Siliciano, R. F. HIV-1 eradication strategies: design and assessment. *Curr. Opin. HIV AIDS* **8**, 318–325 (2013).
- Siliciano, J. D. & Siliciano, R. F. Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 12–19 (2014).
- Siliciano, R. F. & Greene, W. C. HIV latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a007096 (2012).
- Wainberg, M. A. Perspectives on antiviral drug development. *Antiviral Res.* **81**, 1–5 (2009).
- Arts, E. J. & Hazuda, D. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* **2**, a007161 (2012).
- Younan, P., Kowalski, J. & Kiem, H. P. Genetic modification of hematopoietic stem cells as a therapy for HIV/AIDS. *Viruses* **5**, 2946–2962 (2013).
- Zhu, W. *et al.* The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology* **12**, 22 (2015).
- Christ, F. *et al.* Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 442–448 (2010).
- Desimmie, B. A. *et al.* LEDGINS inhibit late stage HIV-1 replication by modulating integrase multimerization in the virions. *Retrovirology* **10**, 57 (2013).
- Ciuffi, A. & Bushman, F. D. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. *Trends Genet.* **22**, 388–395 (2006).
- Amstutz, P. *et al.* Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 24715–24722 (2005).
- Binz, H. K. *et al.* High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat. Biotechnol.* **22**, 575–582 (2004).
- Binz, H. K., Amstutz, P. & Plückthun, A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat. Biotech.* **23**, 1257–1268 (2005).
- Binz, H. K. & Plückthun, A. Engineered proteins as specific binding reagents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 459–469 (2005).
- Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P. & Plückthun, A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **332**, 489–503 (2003).
- Boersma, Y. L. & Plückthun, A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 849–857 (2011).
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M. & Plückthun, A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) from research to therapy. *Methods Enzymol.* **503**, 101–34 (2012).
- Weidle, U. H., Auer, J., Brinkmann, U., Georges, G. & Tiefenthaler, G. The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **10**, 155–168 (2013).
- Schweizer, A. *et al.* CD4-specific designed ankyrin repeat proteins are novel potent HIV entry inhibitors with unique characteristics. *PLoS Pathog.* **4**, e1000109 (2008).
- Nangola, S., Minard, P. & Tayapiwatana, C. Appraisal of translocation pathways for displaying ankyrin repeat protein on phage particles. *Protein Expr. Purif.* **74**, 156–161 (2010).
- Nangola, S. *et al.* Antiviral activity of recombinant ankyrin targeted to the capsid domain of HIV-1 Gag polyprotein. *Retrovirology* **9**, 17 (2012).
- Sakkhachornphop, S., Barbas, Cr, Keawwichit, R., Wongworapat, K. & Tayapiwatana, C. Zinc finger protein designed to target 2-long terminal repeat junctions interferes with human immunodeficiency virus integration. *Hum. Gene Ther.* **23**, 932–942 (2012).
- Sakkhachornphop, S. *et al.* Designed zinc finger protein interacting with the HIV-1 integrase recognition sequence at 2-LTR-circle junctions. *Protein Sci.* **18**, 2219–2230 (2009).
- Khamaiakawin, W. *et al.* Combined antiviral therapy using designed molecular scaffolds targeting two distinct viral functions, HIV-1 genome integration and capsid assembly. *Mol. Ther. - Nucl. Acids* **4**, e249 (2015).

26. Chevrel, A. *et al.* Specific GFP-binding artificial proteins (α Rep): a new tool for *in vitro* to live cell applications. *Biosci. Rep.* **35**, e00223 (2015).
27. Guellouz, A. *et al.* Selection of specific protein binders for pre-defined targets from an optimized library of artificial helical repeat proteins (α Rep). *PLoS One* **8**, e71512 (2013).
28. Urvoas, A. *et al.* Design, production and molecular structure of a new family of artificial α -helical repeat proteins (α Rep) based on thermostable HEAT-like repeats. *J. Mol. Biol.* **404**, 307–327 (2010).
29. Urvoas, A., Valerio-Lepiniec, M. & Minard, P. Artificial proteins from combinatorial approaches. *Trends Biotechnol.* **30**, 512–520 (2012).
30. Aiken, C. & Chen, C. H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends Mol. Med.* **11**, 31–36 (2005).
31. DaFonseca, S. *et al.* The 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) derivative of betulinic acid (DSB) inhibits the assembly of virus-like particles in HIV-1 Gag precursor-expressing cells. *Antiviral Ther.* **12**, 1185–1203 (2007).
32. DaFonseca, S. *et al.* The inhibition of assembly of HIV-1 virus-like particles by 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (DSB) is counteracted by Vif and requires its Zinc-binding domain. *Virology* **5**, 162 (2008).
33. Gonzalez, G. *et al.* Characterization of a novel type of HIV-1 particle assembly inhibitor using a quantitative luciferase-Vpr packaging-based assay. *PLoS One* **6**, e27234 (2011).
34. Zhou, J., Chen, C. H. & Aiken, C. The sequence of the CA-SP1 junction accounts for the differential sensitivity of HIV-1 and SIV to the small molecule maturation inhibitor 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-betulinic acid. *Retrovirology* **1**, 15 (2004).
35. Zhou, J., Huang, L., Hachey, D. L., Chen, C. H. & Aiken, C. Inhibition of HIV-1 maturation via drug association with the viral Gag protein in immature HIV-1 particles. *J. Biol. Chem.* **280**, 42149–42155 (2005).
36. Dorfman, T., Luban, J., Goff, S. P., Haseltine, W. A. & Gottlinger, H. G. Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J. Virol.* **67**, 6159–6169 (1993).
37. Darlix, J. L. *et al.* Nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus as a model protein with chaperoning functions and as a target for antiviral drugs. *Adv. Pharmacol.* **48**, 345–372 (2000).
38. Darlix, J. L., Garrido, J. L., Morellet, N., Mély, Y. & de Rocquigny, H. Properties, functions, and drug targeting of the multifunctional nucleocapsid protein of the human immunodeficiency virus. *Adv. Pharmacol.* **55**, 299–346 (2007).
39. Grohmann, D., Godet, J., Mély, Y., Darlix, J. L. & Restle, T. HIV-1 nucleocapsid traps reverse transcriptase on nucleic acid substrates. *Biochemistry* **47**, 12230–12240 (2008).
40. Levin, J. G., Guo, J., Rouzina, I. & Musier-Forsyth, K. Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **80**, 217–286 (2005).
41. Breuer, S., Chang, M. W., Yuan, J. & Torbett, B. E. Identification of HIV-1 inhibitors targeting the nucleocapsid protein. *J. Med. Chem.* **55**, 4968–4977 (2012).
42. de Rocquigny, H. *et al.* Targeting the viral nucleocapsid protein in anti-HIV-1 therapy. *Mini-Rev. Med. Chem.* **8**, 24–35 (2008).
43. Garg, D. & Torbett, B. E. Advances in targeting nucleocapsid-nucleic acid interactions in HIV-1 therapy. *Virus Res.* **193**, 135–143 (2014).
44. Mori, M. *et al.* Nucleocapsid protein: a desirable target for future therapies against HIV-1. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **389**, 53–92 (2015).
45. Stephen, A. G. *et al.* Identification of HIV-1 nucleocapsid protein: nucleic acid antagonists with cellular anti-HIV activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 1228–1237 (2002).
46. Dussupt, V. *et al.* The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog.* **5**, e1000339 (2009).
47. Popov, S., Popova, E., Inoue, M. & Göttlinger, H. G. Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J. Virol.* **82**, 1389–1398 (2008).
48. Gay, B., Tournier, J., Chazal, N., Carrière, C. & Boulanger, P. Morphopoietic determinants of HIV-1 GAG particles assembled in baculovirus-infected cells. *Virology* **247**, 160–169 (1998).
49. Gheysen, D. *et al.* Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**, 103–112 (1989).
50. Royer, M. *et al.* Functional domains of HIV-1 gag-polyprotein expressed in baculovirus-infected cells. *Virology* **184**, 417–422 (1991).
51. Royer, M., Hong, S. S., Gay, B., Cerutti, M. & Boulanger, P. Expression and extracellular release of human immunodeficiency virus type 1 Gag precursors by recombinant baculovirus-infected cells. *J. Virol.* **66**, 3230–3235 (1992).
52. Santiago-Tirado, F. H. & Doering, T. L. All about that fat: Lipid modification of proteins in *Cryptococcus neoformans*. *J. Microbiol.* **54**, 212–222 (2016).
53. Bachand, F., Yao, X. J., Hrimech, M., Rougeau, N. & Cohen, E. A. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J. Biol. Chem.* **274**, 9083–9091 (1999).
54. Jenkins, Y. *et al.* Biochemical analyses of the interactions between human immunodeficiency virus type 1 Vpr and p6(Gag). *J. Virol.* **75**, 10537–10542 (2001).
55. Thomas, J. A., Ott, D. E. & Gorelick, R. J. Efficiency of human immunodeficiency virus type 1 postentry infection processes: evidence against disproportionate numbers of defective virions. *J. Virol.* **81**, 4367–4370, <https://doi.org/10.1128/JVI.02357-06> (2007).
56. Mirambeau, G., Lonnais, S. & Gorelick, R. J. Features, processing states, and heterologous protein interactions in the modulation of the retroviral nucleocapsid protein function. *RNA Biol.* **7**, 724–734 (2010).
57. Pettit, S. C., Sheng, N., Tritch, R., Erickson-Viitanen, S. & Swanson, R. The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **436**, 15–25 (1998).
58. Kitidee, K. *et al.* Expedient screening for HIV-1 protease inhibitors using a simplified immunochromatographic assay. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1021**, 153–158 (2016).
59. Kitidee, K. *et al.* A drug discovery platform: a simplified immunoassay for analyzing HIV protease activity. *J. Virol. Methods* **186**, 21–29 (2012).
60. Lee, V. S. *et al.* Pairwise decomposition of residue interaction energies of single chain Fv with HIV-1p17 epitope variants. *Mol. Immunol.* **47**, 982–990 (2010).
61. Marozsan, A. J. *et al.* Relationships between infectious titer, capsid protein levels, and reverse transcriptase activities of diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* **78**, 11130–11141 (2004).
62. Segal, D. J. *et al.* Attenuation of HIV-1 replication in primary human cells with a designed zinc finger transcription factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 14509–14519 (2004).
63. Ochsenbauer-Jambor, C., Jones, J., Heil, M., Zammit, K. P. & Kutsch, O. T-cell line for HIV drug screening using GFP as a quantitative marker of HIV-1 replication. *Biotechniques* **40**, 91–100 (2006).
64. Newman, J. L., Butcher, E. W., Patel, D. T., Mikhaylenko, Y. & Summers, M. F. Flexibility in the p2 domain of the HIV-1Gag polyprotein. *Protein Science* **13**, 2101–2107, <https://doi.org/10.1110/ps.04614804> (2004).
65. Worthylake, D. K., Wang, H., Yoo, S., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution. *Acta Cryst., Section D, Biol. Cryst.* **55**, 85–92, <https://doi.org/10.1107/S0907444998007689> (1999).
66. Datta, S. A. K. *et al.* Dimerization of the SP1 region of HIV-1 Gag induces a helical conformation and association into helical bundles: Implications for particle assembly. *J. Virol.* **90**, 1773–1787 (2015).
67. Datta, S. A. *et al.* On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *J. Virol.* **85**, 4111–4121 (2011).

68. Wagner, J. M. *et al.* Crystal structure of an HIV assembly and maturation switch. *eLife* **5**, e17063, <https://doi.org/10.7554/eLife.17063> (2016).
69. Morellet, N. *et al.* Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *EMBO J.* **11**, 3059–3065 (1992).
70. Morellet, N., Meudal, H., Bouaziz, S. & Roques, B. P. Structure of the zinc finger domain encompassing residues 13–51 of the nucleocapsid protein from simian immunodeficiency virus. *Biochem. J.* **393**, 725–732 (2006).
71. Didierlaurent, L., Houzet, L., Morichaud, Z., Darlix, J.-L. & Mougel, M. The conserved N-terminal basic residues and zinc-finger motifs of HIV-1 nucleocapsid restrict the viral cDNA synthesis during virus formation and maturation. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4745–4753, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn474> (2008).
72. Burniston, M. T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S. P. & Luban, J. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J. Virol.* **73**, 8527–8540 (1999).
73. Cimarelli, A., Sandin, S., Höglund, S. & Luban, J. Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J. Virol.* **74**, 3046–3057 (2000).
74. Hendrix, J. *et al.* Live-cell observation of cytosolic HIV-1 assembly onset reveals RNA-interacting Gag oligomers. *J. Cell Biol.* **210**, 629–646 (2015).
75. Swan, C. H. *et al.* T-cell protection and enrichment through lentiviral CCR5 intrabody gene delivery. *Gene Ther.* **13**, 1480–1492 (2006).
76. Hong, S. S. & Boulanger, P. Protein ligands of human Adenovirus type 2 outer capsid identified by biopanning of a phage-displayed peptide library on separate domains of WT and mutant penton capsomers. *EMBO J.* **14**, 4714–4727 (1995).
77. Hong, S. S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D. T. & Boulanger, P. A. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* **16**, 2294–2306 (1997).
78. Huvent, I. *et al.* Interaction and co-encapsulation of HIV-1 Vif and Gag recombinant proteins. *J. Gen. Virol.* **79**, 1069–1081 (1998).
79. Brockman, M. A. *et al.* Early selection in Gag by protective HLA alleles contributes to reduced HIV-1 replication capacity that may be largely compensated for in chronic infection. *J. Virol.* **84**, 11937–11949 (2010).
80. Brockman, M. A., Tanz, G. O., Walker, B. D. & Allen, T. M. Use of a novel GFP reporter cell line to examine replication capacity of CXCR4- and CCR5-tropic HIV-1 by flow cytometry. *J. Virol. Methods* **131**, 134–142 (2006).
81. Wright, J. K. *et al.* Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters. *J. Virol.* **84**, 10820–10831 (2010).

Acknowledgements

The work in Thailand was supported by the Centre of Biomolecular Therapy and Diagnostics (CBTD), the Thailand Research Fund Basic Research Grant BRG5480004, the Senior Research Scholar Grant RTA5980007. SH was supported by the PhD Franco-Thai scholarship program (SIAM 2013) from the French Government, the 50th CMU Anniversary PhD Program, and the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University. SN was supported by the Franco-Thai Junior Research Fellowship Program (2012). KC was supported by the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee PhD program (Grant PHD/0146/2556). KF was supported by a post-doctoral fellowship 2016 from Chiang Mai University. The authors express their gratefulness to the Research Institute for Health Sciences for providing the viral propagation facility. The work in Lyon was financed by the Ministry of Foreign Affairs (PHC SIAM 2016–2017), and the Cystic Fibrosis French Association (VLM Contracts RF2013-0500796 and RF2014-0501171). The authors are grateful to Marie-Pierre Confort for her skillful technical assistance, to Sylvie Farget for her constant secretarial aid, and to Elisabeth Errazuriz and Christel Cassin (Centre d'Imagerie Quantitative de Lyon-Est) for their valuable assistance in electron microscopy.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: C.T., P.B., P.M., S.H., S.N., S.S.H. Performed the experiments: K.C., K.F., S.H., S.N., S.S.H., W.F. Analyzed the data: C.T., P.B., S.H., S.N., S.S.H. Contributed reagents/ materials/analysis tools: A.U., M.V.L., P.M. Wrote the paper: P.B., S.H., S.S.H. Read and approved the version to be published: A.U., C.T., K.C., K.F., M.V.L., P.B., P.M., S.H., S.N., S.S.H., W.F.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16451-w>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Références Bibliographiques

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.
- Akey, D.L., Brown, W.C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T.J., DelProposto, J., Ogata, C.M., Skiniotis, G., Kuhn, R.J., et al. (2014). Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. *Science* *343*, 881–885.
- Akey, D.L., Brown, W.C., Jose, J., Kuhn, R.J., and Smith, J.L. (2015). Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. *BioEssays* *37*, 489–494.
- Alayli, F., and Scholle, F. (2016). Dengue virus NS1 enhances viral replication and pro-inflammatory cytokine production in human dendritic cells. *Virology* *496*, 227–236.
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., and Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 376–381.
- Alcon-LePoder, S., Drouet, M.-T., Roux, P., Frenkiel, M.-P., Arborio, M., Durand-Schneider, A.-M., Maurice, M., Le Blanc, I., Gruenberg, J., and Flamand, M. (2005). The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity. *J. Virol.* *79*, 11403–11411.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732–738.
- Alker, A. (2015). West Nile virus-associated acute flaccid paralysis. *BMJ Case Rep.* *2015*.
- Allonso, D., Andrade, I.S., Conde, J.N., Coelho, D.R., Rocha, D.C.P., da Silva, M.L., Ventura, G.T., Silva, E.M., and Mohana-Borges, R. (2015). Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. *J. Virol.* *89*, 11871–11883.
- Amanna, I.J., and Slifka, M.K. (2014). Current Trends in West Nile Virus Vaccine Development. *Expert Rev. Vaccines* *13*, 589–608.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A.R., and 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. *J. Virol.* *80*, 4501–4509.
- Apte-Sengupta, S., Sirohi, D., and Kuhn, R.J. (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* *9*, 134–142.
- Arjona, A., Foellmer, H.G., Town, T., Leng, L., McDonald, C., Wang, T., Wong, S.J., Montgomery, R.R., Fikrig, E., and 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., and Fikrig, E. (2011). Innate Immune Control of West Nile Virus Infection. *Cell. Microbiol.* *13*, 1648–1658.
- Ashhurst, T.M., Vreden, C. van, Munoz-Erazo, L., Niewold, P., Watabe, K., Terry, R.L., Deffrasnes, C., Getts, D.R., and Cole King, N.J. (2013). Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *Indian J. Med. Res.* *138*, 632–647.
- Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T.S., Verma, A., Milani, M., Owens, R.J., Stuart, D.I., Grimes, J.M., and Mancini, E.J. (2009). Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. *J. Virol.* *83*, 12895–12906.
- Austin, S.K., and Dowd, K.A. (2014). B Cell Response and Mechanisms of Antibody Protection to West Nile Virus. *Viruses* *6*, 1015–1036.
- Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., Auethavornanan, K., Jairungsri, A., Kanlaya, R., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C., et al. (2006). Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J. Infect. Dis.* *193*, 1078–1088.
- Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., Atkinson, J.P., and Diamond, M.S. (2007). Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathog.* *3*, e183.
- Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R.E., Somnue, P., Youn, S., Diamond, M.S., and Atkinson, J.P. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J. Exp. Med.* *207*, 793–806.
- Avirutnan, P., Hauhart, R.E., Somnue, P., Blom, A.M., Diamond, M.S., and Atkinson, J.P. (2011). Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. *J. Immunol.* *187*, 424–433.
- Bagashev, A., and Sawaya, B.E. (2013). Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview. *Virol. J.* *10*, 358.
- Bahuon, C. (2012). 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. Université Paris Sud-Paris XI.
- Bai, F., Kong, K.-F., Dai, J., Qian, F., Zhang, L., Brown, C.R., Fikrig, E., and Montgomery, R.R. (2010). A Paradoxical Role for Neutrophils in the Pathogenesis of West Nile Virus. *J. Infect. Dis.* *202*, 1804–1812.

- Bakonyi, T., Ivanics, É., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., and Nowotny, N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 618.
- Bakonyi, T., Ferenczi, E., Erdélyi, K., Kutasi, O., Csörgő, T., Seidel, B., Weissenböck, H., Brugger, K., Bán, E., and Nowotny, N. (2013). Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.* *165*, 61–70.
- Balakrishnan, A., Thekkekara, R.J., and Tandale, B.V. (2016). Outcomes of West Nile encephalitis patients after 1 year of West Nile encephalitis outbreak in Kerala, India: A follow-up study. *J. Med. Virol.* *88*, 1856–1861.
- Baronti, C., Sire, J., de Lamballerie, X., and Quérat, G. (2010). Nonstructural NS1 proteins of several mosquito-borne Flavivirus do not inhibit TLR3 signaling. *Virology* *404*, 319–330.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003). Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J. Exp. Med.* *197*, 633–642.
- Basu, A., and Chaturvedi, U.C. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *53*, 287–299.
- Batista, W.C., Tavares, G. da S.B., Vieira, D.S., Honda, E.R., Pereira, S.S., and Tada, M.S. (2011). Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *44*, 528–530.
- Beasley, D.W.C., and Barrett, A.D.T. (2002). Identification of Neutralizing Epitopes within Structural Domain III of the West Nile Virus Envelope Protein. *J. Virol.* *76*, 13097–13100.
- Beasley, D.W.C., Li, L., Suderman, M.T., and Barrett, A.D.T. (2002). Mouse Neuroinvasive Phenotype of West Nile Virus Strains Varies Depending upon Virus Genotype. *Virology* *296*, 17–23.
- Beasley, D.W.C., Holbrook, M.R., Rosa, A.P.A.T. da, Coffey, L., Carrara, A.-S., Phillippi-Falkenstein, K., Bohm, R.P., Ratterree, M.S., Lillibridge, K.M., Ludwig, G.V., et al. (2004). Use of a Recombinant Envelope Protein Subunit Antigen for Specific Serological Diagnosis of West Nile Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* *42*, 2759–2765.
- 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., and Barrett, A.D.T. (2005). Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. *J. Virol.* *79*, 8339–8347.
- Beatty, P.R., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S.S., Glasner, D.R., Hopkins, K., and Harris, E. (2015). Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci. Transl. Med.* *7*, 304ra141-304ra141.

- Beck, C., Jimenez-Clavero, M.A., Leblond, A., Durand, B., Nowotny, N., Leparç-Goffart, I., Zientara, S., Jourdain, E., and Lecollinet, S. (2013). Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* *10*, 6049–6083.
- Beck, C., Lowenski, S., Durand, B., Bahuon, C., Zientara, S., and Lecollinet, S. (2017). Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *11*, e0005936.
- Berntsen, B.T., James, A.A., and Christensen, B.M. (2000). Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 115–137.
- Berthet, F.X., Zeller, H.G., Drouet, M.T., Rauzier, J., Digoutte, J.P., and Deubel, V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.* *78*, 2293–2297.
- Bhuvanakantham, R., Cheong, Y.K., and Ng, M.-L. (2010). West Nile virus capsid protein interaction with importin and HDM2 protein is regulated by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Microbes Infect.* *12*, 615–625.
- Biedenbender, R., Bevilacqua, J., Gregg, A.M., Watson, M., and Dayan, G. (2011). Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study to Investigate the Immunogenicity and Safety of a West Nile Virus Vaccine in Healthy Adults. *J. Infect. Dis.* *203*, 75–84.
- Bin, H., Grossman, Z., Pokamunski, S., Malkinson, M., Weiss, L., Duvdevani, P., Banet, C., Weisman, Y., Annis, E., Gandaku, D., et al. (2001). West Nile Fever in Israel 1999-2000. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *951*, 127–142.
- Binz, H.K., Stumpp, M.T., Forrer, P., Amstutz, P., and Plückthun, A. (2003). Designing Repeat Proteins: Well-expressed, Soluble and Stable Proteins from Combinatorial Libraries of Consensus Ankyrin Repeat Proteins. *J. Mol. Biol.* *332*, 489–503.
- Blitvich, B.J. (2008). Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim. Health Res. Rev.* *9*, 71–86.
- Blitvich, B.J., Scanlon, D., Shiell, B.J., Mackenzie, J.S., and Hall, R.A. (1999). Identification and analysis of truncated and elongated species of the flavivirus NS1 protein. *Virus Res.* *60*, 67–79.
- Bode, A.V., Sejvar, J.J., Pape, W.J., Campbell, G.L., and Marfin, A.A. (2006). West Nile virus disease: a descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-county region of Colorado in 2003. *Clin. Infect. Dis.* *42*, 1234–1240.

- Bokisch, V.A., Top, F.H.J., Russell, P.K., Dixon, F.J., and Müller-Eberhard, H.J. (1973). The Potential Pathogenic Role of Complement in Dengue Hemorrhagic Shock Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *289*, 996–1000.
- Bondre, V.P., Jadi, R.S., Mishra, A.C., Yergolkar, P.N., and Arankalle, V.A. (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J. Gen. Virol.* *88*, 875–884.
- Brandt, W.E., Cardiff, R.D., and Russell, P.K. (1970). Dengue virions and antigens in brain and serum of infected mice. *J. Virol.* *6*, 500–506.
- Brault, A.C. (2009). Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet. Res.* *40*, 43.
- Brault, A.C., Huang, C.Y.-H., Langevin, S.A., Kinney, R.M., Bowen, R.A., Ramey, W.N., Panella, N.A., Holmes, E.C., Powers, A.M., and Miller, B.R. (2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat. Genet.* *39*, 1162–1166.
- Brien, J.D., Daffis, S., Lazear, H.M., Cho, H., Suthar, M.S., Gale, M., and Diamond, M.S. (2011). Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) shapes both innate and CD8(+) T cell immune responses against West Nile virus infection. *PLoS Pathog.* *7*, e1002230.
- Brinton, M.A. (2013). Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses* *6*, 13–53.
- Brinton, M.A., and Dispoto, J.H. (1988). Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology* *162*, 290–299.
- Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G., and Brandt, W.E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* *70 (Pt 1)*, 37–43.
- Carson, P.J., Borchardt, S.M., Custer, B., Prince, H.E., Dunn-Williams, J., Winkelman, V., Tobler, L., Biggerstaff, B.J., Lanciotti, R., Petersen, L.R., et al. (2012). Neuroinvasive Disease and West Nile Virus Infection, North Dakota, USA, 1999–2008. *Emerg. Infect. Dis.* *18*, 684–686.
- Cavaillon, J.-M. (2017). Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology*.
- CDC (1999). Outbreak of West Nile-Like Viral Encephalitis -- New York, 1999. *MMWR CDC*.
- Ceccaldi, P.-E., Lucas, M., and Despres, P. (2004). New insights on the neuropathogenicity of West Nile virus. *FEMS Microbiol. Lett.* *233*, 1–6.

- Ceianu, C.S., Ungureanu, A., Nicolescu, G., Cernescu, C., Nitescu, L., Tardei, G., Petrescu, A., Pitigoi, D., Martin, D., Ciulacu-Purcarea, V., et al. (2001). West Nile virus surveillance in Romania: 1997-2000. *Viral Immunol.* *14*, 251–262.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). West Nile virus transmission via organ transplantation and blood transfusion - Louisiana, 2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* *58*, 1263–1267.
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., and Rios, M. (2015). The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *BioMed Res. Int.*
- 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., et al. (2003). Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. *Virology* *315*, 381–388.
- Chaskopoulou, A., Dovas, C., Chaintoutis, S., Bouzalas, I., Ara, G., and Papanastassopoulou, M. (2011). Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill* *16*, 19933.
- Chen, C., Weisz, O.A., Stolz, D.B., Watkins, S.C., and Montelaro, R.C. (2004). Differential Effects of Actin Cytoskeleton Dynamics on Equine Infectious Anemia Virus Particle Production. *J. Virol.* *78*, 882–891.
- Chen, C.-L., Lin, C.-F., Wan, S.-W., Wei, L.-S., Chen, M.-C., Yeh, T.-M., Liu, H.-S., Anderson, R., and Lin, Y.-S. (2013). Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies Cause NO-Mediated Endothelial Cell Apoptosis via Ceramide-Regulated Glycogen Synthase Kinase-3 β and NF- κ B Activation. *J. Immunol.* *191*, 1744–1752.
- Chen, J., Ng, M.M.-L., and Chu, J.J.H. (2015). Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLOS Pathog.* *11*, e1005053.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target heparan sulfate. *Nat. Med.* *3*, 866–871.
- Cheng, H.-J., Lin, C.-F., Lei, H.-Y., Liu, H.-S., Yeh, T.-M., Luo, Y.-H., and Lin, Y.-S. (2009). Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ *234*, 63–73.
- Chiou, C.-T., Hu, C.-C.A., Chen, P.-H., Liao, C.-L., Lin, Y.-L., and Wang, J.-J. (2003). Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *J. Gen. Virol.* *84*, 2795–2805.
- Chiu, W.-W., Kinney, R.M., and Dreher, T.W. (2005). Control of Translation by the 5'- and 3'-Terminal Regions of the Dengue Virus Genome. *J. Virol.* *79*, 8303–8315.

- Choi, K.-S., Nah, J.-J., Ko, Y.-J., Kim, Y.-J., and Joo, Y.-S. (2007). The DE loop of the domain III of the envelope protein appears to be associated with West Nile virus neutralization. *Virus Res.* *123*, 216–218.
- Chowers, M.Y., Lang, R., Nassar, F., Ben-David, D., Giladi, M., Rubinshtein, E., Itzhaki, A., Mishal, J., Siegman-Igra, Y., Kitzes, R., et al. (2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* *7*, 675–678.
- Chu, J.J. -h. (2004). Interaction of West Nile Virus with $\alpha 3$ Integrin Mediates Virus Entry into Cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 54533–54541.
- Chu, J.J.H., and 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.H., and Ng, M.L. (2004). Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. *J. Virol.* *78*, 10543–10555.
- Chu, P.W., and Westaway, E.G. (1992). Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA. *Arch. Virol.* *125*, 177–191.
- Chu, P.W.G., and Westaway, E.G. (1987). Characterization of Kunjin virus RNA-dependent RNA polymerase: Reinitiation of synthesis in Vitro. *Virology* *157*, 330–337.
- Chua, A.J., Vitoret, C., Tan, M.L., Gonzalez, G., Boulanger, P., Ng, M.-L., and Hong, S.-S. (2013). A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies. *Virol. J.* *2*, 3.
- Chung, K.M., and Diamond, M.S. (2008). Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *J. Med. Virol.* *80*, 547–556.
- Chung, K.M., Nybakken, G.E., Thompson, B.S., Engle, M.J., Marri, A., Fremont, D.H., and Diamond, M.S. (2006a). Antibodies against West Nile Virus Nonstructural Protein NS1 Prevent Lethal Infection through Fc Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Virol.* *80*, 1340–1351.
- Chung, K.M., Liszewski, M.K., Nybakken, G., Davis, A.E., Townsend, R.R., Fremont, D.H., Atkinson, J.P., and Diamond, M.S. (2006b). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 19111–19116.
- Ciota, A.T. (2017). West Nile virus and its vectors. *Curr. Opin. Insect Sci.* *22*, 28–36.
- Ciota, A.T., and Kramer, L.D. (2013). Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. *Viruses* *5*, 3021–3047.

- Clarke, P., Leser, J.S., Quick, E.D., Dionne, K.R., Beckham, J.D., and Tyler, K.L. (2014). Death receptor-mediated apoptotic signaling is activated in the brain following infection with West Nile virus in the absence of a peripheral immune response. *J. Virol.* *88*, 1080–1089.
- Cleton, N.B., van Maanen, K., Bergervoet, S.A., Bon, N., Beck, C., Godeke, G.-J., Lecollinet, S., Bowen, R., Lelli, D., Nowotny, N., et al. (2017). A Serological Protein Microarray for Detection of Multiple Cross-Reactive Flavivirus Infections in Horses for Veterinary and Public Health Surveillance. *Transbound. Emerg. Dis.* *64*, 1801–1812.
- Clum, S., Ebner, K.E., and 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*, 30715–30723.
- Clyde, K., and 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. *J. Virol.* *80*, 2170–2182.
- Colombage, G., Hall, R., Pavy, M., and Lobigs, M. (1998). DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. *Virology* *250*, 151–163.
- Conde, J.N., Silva, E.M., Barbosa, A.S., and Mohana-Borges, R. (2017). The Complement System in Flavivirus Infections. *Front. Microbiol.* *8*.
- Condotta, S.A., Martin, M.M., Boutin, M., and Jean, F. (2010). Detection and in-cell selectivity profiling of the full-length West Nile virus NS2B/NS3 serine protease using membrane-anchored fluorescent substrates. *Biol. Chem.* *391*, 549–559.
- Crabtree, M.B., Kinney, R.M., and Miller, B.R. (2005). Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch. Virol.* *150*, 771–786.
- Crook, K.R., Miller-Kittrell, M., Morrison, C.R., and Scholle, F. (2014). Modulation of innate immune signaling by the secreted form of the West Nile virus NS1 glycoprotein. *Virology* *458–459*, 172–182.
- Crooks, A.J., Lee, J.M., Easterbrook, L.M., Timofeev, A.V., and Stephenson, J.R. (1994). The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. *J. Gen. Virol.* *75*, 3453–3460.
- Daffis, S., Samuel, M.A., Keller, B.C., Gale, M., and Diamond, M.S. (2007). Cell-Specific IRF-3 Responses Protect against West Nile Virus Infection by Interferon-Dependent and -Independent Mechanisms. *PLoS Pathog.* *3*.

- Daffis, S., Samuel, M.A., Suthar, M.S., Gale, M., and Diamond, M.S. (2008). Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection. *J. Virol.* *82*, 10349–10358.
- Daffis, S., Suthar, M.S., Gale, M., and Diamond, M.S. (2009a). Measure and countermeasure: type I IFN (IFN- α / β) antiviral response against West Nile virus. *J. Innate Immun.* *1*, 435–445.
- Daffis, S., Suthar, M.S., Szretter, K.J., Gale, M., and Diamond, M.S. (2009b). Induction of IFN- β and the innate antiviral response in myeloid cells occurs through an IPS-1-dependent signal that does not require IRF-3 and IRF-7. *PLoS Pathog.* *5*, e1000607.
- Dalrymple, N.A., Cimica, V., and Mackow, E.R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio* *6*.
- Daniels, B.P., Holman, D.W., Cruz-Orengo, L., Jujavarapu, H., Durrant, D.M., and Klein, R.S. (2014). Viral Pathogen-Associated Molecular Patterns Regulate Blood-Brain Barrier Integrity via Competing Innate Cytokine Signals. *MBio* *5*, e01476-14-e01476-14.
- Daniels, B.P., Snyder, A.G., Olsen, T.M., Orozco, S., Oguin, T.H., Tait, S.W.G., Martinez, J., Gale, M., Loo, Y.-M., and Oberst, A. (2017). RIPK3 Restricts Viral Pathogenesis via Cell Death-Independent Neuroinflammation. *Cell* *169*, 301–313.e11.
- Danis, K., Papa, A., Theocharopoulos, G., Dougas, G., Athanasiou, M., Detsis, M., Baka, A., Lytras, T., Mellou, K., Bonovas, S., et al. (2011). Outbreak of West Nile Virus Infection in Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 1868–1872.
- Das, S., Mishra, M.K., Ghosh, J., and Basu, A. (2008). Japanese Encephalitis Virus infection induces IL-18 and IL-1 β in microglia and astrocytes: Correlation with in vitro cytokine responsiveness of glial cells and subsequent neuronal death. *J. Neuroimmunol.* *195*, 60–72.
- Das, T., Hoarau, J.J., Bandjee, M.C.J., Maquart, M., and Gasque, P. (2015). Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. *J. Gen. Virol.* *96*, 294–310.
- David, S., and Abraham, A.M. (2016). Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect. Dis.* *48*, 571–586.
- Davis, C.T., Ebel, G.D., Lanciotti, R.S., Brault, A.C., Guzman, H., Siirin, M., Lambert, A., Parsons, R.E., Beasley, D.W.C., Novak, R.J., et al. (2005). Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001–2004: Evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology* *342*, 252–265.
- Davis, C.W., Nguyen, H.-Y., Hanna, S.L., Sanchez, M.D., Doms, R.W., and Pierson, T.C. (2006). West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection. *J. Virol.* *80*, 1290–1301.

- Day, C.W., Smee, D.F., Julander, J.G., Yamshchikov, V.F., Sidwell, R.W., and Morrey, J.D. (2005). Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res.* *67*, 38–45.
- Dechtawewat, T., Paemanee, A., Roytrakul, S., Songprakhon, P., Limjindaporn, T., Yenchitsomanus, P., Saitornuang, S., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., et al. (2016). Mass spectrometric analysis of host cell proteins interacting with dengue virus nonstructural protein 1 in dengue virus-infected HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1864*, 1270–1280.
- Deo, S., Patel, T.R., Džananović, E., Booy, E.P., Zeid, K., McEleney, K., Harding, S.E., and McKenna, S.A. (2014). Activation of 2' 5'-Oligoadenylate Synthetase by Stem Loops at the 5'-End of the West Nile Virus Genome. *PLoS ONE* *9*.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 15623–15628.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F., and Dever, T.E. (2005). Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell* *122*, 901–913.
- Diamond, M.S. (2009a). Mechanisms of Evasion of the Type I Interferon Antiviral Response by Flaviviruses. *J. Interferon Cytokine Res.* *29*, 521–530.
- Diamond, M.S. (2009b). Progress on the Development of Therapeutics against West Nile Virus. *Antiviral Res.* *83*, 214–227.
- Diamond, M.S., and Gale, M. (2012). Cell-intrinsic innate immune control of West Nile virus infection. *Trends Immunol.* *33*, 522–530.
- Diamond, M.S., Shrestha, B., Marri, A., Mahan, D., and Engle, M. (2003). 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., Pierson, T.C., and Fremont, D.H. (2008). The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol. Rev.* *225*, 212–225.
- Dokland, T., Walsh, M., Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Ee, K.-H., and Wang, S. (2004). West Nile Virus Core Protein: Tetramer Structure and Ribbon Formation. *Structure* *12*, 1157–1163.
- Donadieu, E., Lowenski, S., Servely, J.-L., Laloy, E., Lilin, T., Nowotny, N., Richardson, J., Zientara, S., Lecollinet, S., and Couplier, M. (2013a). Comparison of the Neuropathology Induced by Two West Nile Virus Strains. *PLoS ONE* *8*, e84473.

- Donadieu, E., Bahuon, C., Lowenski, S., Zientara, S., Couplier, M., and Lecollinet, S. (2013b). Differential Virulence and Pathogenesis of West Nile Viruses. *Viruses* 5, 2856–2880.
- Donnelly, R.P., and Kolenko, S.V. (2010). Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 30, 555–564.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.-L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat. Immunol.* 6, 946–953.
- Douglas, M.W., Kesson, A.M., and 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.
- Durand, B., Dauphin, G., Zeller, H., Labie, J., Schuffenecker, I., Murri, S., Moutou, F., and Zientara, S. (2005). Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet. Rec.* 157, 711–713.
- Ebel, G.D., Carricaburu, J., Young, D., Bernard, K.A., and Kramer, L.D. (2004). Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000–2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 493–500.
- Edeling, M.A., Diamond, M.S., and Fremont, D.H. (2014). Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Errett, J.S., Suthar, M.S., McMillan, A., Diamond, M.S., and Gale, M. (2013). The Essential, Nonredundant Roles of RIG-I and MDA5 in Detecting and Controlling West Nile Virus Infection. *J. Virol.* 87, 11416–11425.
- Escudero-Pérez, B., Volchkova, V.A., Dolnik, O., Lawrence, P., and Volchkov, V.E. (2014). Shed GP of Ebola Virus Triggers Immune Activation and Increased Vascular Permeability. *PLoS Pathog.* 10, e1004509.
- Estrada-Franco, J.G., Navarro-Lopez, R., Beasley, D.W.C., Coffey, L., Carrara, A.-S., Travassos da Rosa, A., Clements, T., Wang, E., Ludwig, G.V., Cortes, A.C., et al. (2003). West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1604–1607.
- Evans, J.D., and Seeger, C. (2007). Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *J. Virol.* 81, 11809–11816.
- Falgout, B., and Markoff, L. (1995). Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 69, 7232–7243.

- Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J.J., and Lai, C.J. (1990). Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* *64*, 4356–4363.
- Fan, W.F., and Mason, P.W. (1990). Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA. *Virology* *177*, 470–476.
- Fan, J., Liu, Y., and Yuan, Z. (2014). Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. *Virol. Sin.* *29*, 162–169.
- Fang, H., Welte, T., Zheng, X., Chang, G.-J.J., Holbrook, M.R., Soong, L., and Wang, T. (2010). gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *59*, 71–80.
- Feito, M.J., Gómez-Gutiérrez, J., Ayora, S., Alonso, J.C., Peterson, D., and Gavilanes, F. (2008). Insights into the oligomerization state–helicase activity relationship of West Nile virus NS3 NTPase/helicase. *Virus Res.* *135*, 166–174.
- Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., Jacobs, M., and Amara, A. (2009). Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* *5*, 318–328.
- Filipe, A.R., and Pinto, M.R. (1969). Survey for Antibodies to Arboviruses in Serum of Animals from Southern Portugal*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *18*, 423–426.
- Firth, A.E., and Atkins, J.F. (2009). A conserved predicted pseudoknot in the NS2A-encoding sequence of West Nile and Japanese encephalitis flaviviruses suggests NS1' may derive from ribosomal frameshifting. *Virol. J.* *6*, 14.
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F.A., and Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J. Virol.* *73*, 6104–6110.
- Foo, K.Y., and Chee, H.-Y. (2015). Interaction between Flavivirus and Cytoskeleton during Virus Replication. *BioMed Res. Int.* *2015*.
- Forrer, P., Stump, M.T., Binz, H.K., and Plückthun, A. (2003). A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins. *FEBS Lett.* *539*, 2–6.
- Fraisier, C., Camoin, L., Lim, S., Bakli, M., Belghazi, M., Fourquet, P., Granjeaud, S., Osterhaus, A.D.M.E., Koraka, P., Martina, B., et al. (2013). Altered Protein Networks and Cellular Pathways in Severe West Nile Disease in Mice. *PLoS ONE* *8*, e68318.
- Fredericksen, B.L. (2014). The neuroimmune response to West Nile virus. *J. Neurovirol.* *20*, 113–121.

- Fredericksen, B.L., and 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*, 2913–2923.
- Fromm, N.M., Salisbury, D.B., Driver, S.J., Dahdah, M.N., and Monden, K.R. (2015). Functional recovery from neuroinvasive West Nile Virus: A tale of two courses. *Rehabil. Psychol.* *60*, 383–390.
- Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Balmori Melian, E., Edmonds, J., Dong, H., Shi, P.-Y., and Khromykh, A.A. (2010). RNA Structures Required for Production of Subgenomic Flavivirus RNA. *J. Virol.* *84*, 11407–11417.
- Getts, D.R., Terry, R.L., Getts, M.T., Müller, M., Rana, S., Shrestha, B., Radford, J., Van Rooijen, N., Campbell, I.L., and King, N.J.C. (2008). Ly6c⁺ “inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J. Exp. Med.* *205*, 2319–2337.
- Ghoshal, A., Das, S., Ghosh, S., Mishra, M.K., Sharma, V., Koli, P., Sen, E., and Basu, A. (2007). Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia* *55*, 483–496.
- Gilfoy, F.D., and Mason, P.W. (2007). West Nile virus-induced interferon production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J. Virol.* *81*, 11148–11158.
- Gillespie, L.K., Hoenen, A., Morgan, G., and Mackenzie, J.M. (2010). The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *J. Virol.* *84*, 10438–10447.
- Glasner, D.R., Ratnasiri, K., Puerta-Guardo, H., Espinosa, D.A., Beatty, P.R., and Harris, E. (2017). Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *PLOS Pathog.* *13*, e1006673.
- Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.R., and Lee, C. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin. Exp. Vaccine Res.* *3*, 58.
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Koonin, E.V., and Blinov, V.M. (1989). N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* *17*, 3889–3897.
- Gossner, C.M., Marrama, L., Carson, M., Allerberger, F., Calistri, P., Dilaveris, D., Lecollinet, S., Morgan, D., Nowotny, N., Paty, M.-C., et al. (2017). West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach. *Eurosurveillance* *22*.

- Gould, L.H., Sui, J., Foellmer, H., Oliphant, T., Wang, T., Ledizet, M., Murakami, A., Noonan, K., Lambeth, C., Kar, K., et al. (2005). Protective and Therapeutic Capacity of Human Single-Chain Fv-Fc Fusion Proteins against West Nile Virus. *J. Virol.* *79*, 14606–14613.
- Gray, T.J., and Webb, C.E. (2014). A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int. J. Gen. Med.* *7*, 193–203.
- Grun, J.B., and Brinton, M.A. (1988). Separation of functional West Nile virus replication complexes from intracellular membrane fragments. *J Gen Virol* *69*, 3121–3127.
- Guellouz, A., Valerio-Lepiniec, M., Urvoas, A., Chevrel, A., Graille, M., Fourati-Kammoun, Z., Desmadril, M., van Tilbeurgh, H., and Minard, P. (2013). Selection of Specific Protein Binders for Pre-Defined Targets from an Optimized Library of Artificial Helicoidal Repeat Proteins (alphaRep). *PLoS ONE* *8*, e71512.
- Guo, J.-T., Hayashi, J., and Seeger, C. (2005). West Nile Virus Inhibits the Signal Transduction Pathway of Alpha Interferon. *J. Virol.* *79*, 1343–1350.
- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J.E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., Larquet, E., Charneau, P., Krey, T., Megret, F., et al. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 8003–8008.
- Guyatt, K.J., Westaway, E.G., and Khromykh, A.A. (2001). Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. *J. Virol. Methods* *92*, 37–44.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martínez, E., et al. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, S7-16.
- Hadpech, S., Nangola, S., Chupradit, K., Fanhchaksai, K., Furnon, W., Urvoas, A., Valerio-Lepiniec, M., Minard, P., Boulanger, P., Hong, S.-S., et al. (2017). Alpha-helicoidal HEAT-like Repeat Proteins (α Rep) Selected as Interactors of HIV-1 Nucleocapsid Negatively Interfere with Viral Genome Packaging and Virus Maturation. *Sci. Rep.* *7*, 16335.
- Haley, M., Retter, A.S., Fowler, D., Gea-Banacloche, J., and O'Grady, N.P. (2003). The Role for Intravenous Immunoglobulin in the Treatment of West Nile Virus Encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* *37*, e88–e90.
- Hall, R.A., Scherret, J.H., and Mackenzie, J.S. (2001). Kunjin Virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *951*, 153–160.
- Hanna, S.L., Pierson, T.C., Sanchez, M.D., Ahmed, A.A., Murtadha, M.M., and Doms, R.W. (2005). N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity. *J. Virol.* *79*, 13262–13274.

- Hart, J., Tillman, G., Kraut, M.A., Chiang, H.-S., Strain, J.F., Li, Y., Agrawal, A.G., Jester, P., Gnann, J.W., and Whitley, R.J. (2014). West Nile virus neuroinvasive disease: neurological manifestations and prospective longitudinal outcomes. *BMC Infect. Dis.* *14*, 248.
- Hayes, E.B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S.P., O'Leary, D.R., and Campbell, G.L. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* *11*, 1167.
- Heinz, F.X., and Allison, S.L. (2001). The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* *4*, 450–455.
- Henchal, E.A., Henchal, L.S., and Schlesinger, J.J. (1988). Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J. Gen. Virol.* *69* (Pt 8), 2101–2107.
- Henry Sum, M.S. (2015). The Involvement of Microtubules and Actin during the Infection of Japanese Encephalitis Virus in Neuroblastoma Cell Line, IMR32. *BioMed Res. Int.* *2015*.
- Holbrook, M.R., Shope, R.E., and Barrett, A.D.T. (2004). Use of Recombinant E Protein Domain III-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Differentiation of Tick-Borne Encephalitis Serocomplex Flaviviruses from Mosquito-Borne Flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* *42*, 4101–4110.
- Holick, J., Kyle, A., Ferraro, W., Delaney, R.R., and Iwaseczko, M. (2002). Discovery of *Aedes albopictus* infected with west nile virus in southeastern Pennsylvania. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* *18*, 131.
- Hovanessian, A.G. (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 Rev.* *18*, 351–361.
- Hu, H.-P., Hsieh, S.-C., King, C.-C., and Wang, W.-K. (2007). Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology* *368*, 376–387.
- Hua, R.-H., Liu, L.-K., Huo, H., Li, Y.-N., Guo, L.-P., Wang, X.-L., Qin, C.-F., and Bu, Z.-G. (2014). Comprehensive mapping of a novel NS1 epitope conserved in flaviviruses within the Japanese encephalitis virus serocomplex. *Virus Res.* *185*, 103–109.
- Hubálek, Z. (2001). Comparative symptomatology of West Nile fever. *The Lancet* *358*, 254–255.
- Hubálek, Z., and Halouzka, J. (1999). West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* *5*, 643–650.

- Ivanov, A.I., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2010). Cytoskeletal Regulation of Epithelial Barrier Function During Inflammation. *Am. J. Pathol.* *177*, 512–524.
- Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 36–49.
- Jemielity, S., Wang, J.J., Chan, Y.K., Ahmed, A.A., Li, W., Monahan, S., Bu, X., Farzan, M., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., et al. (2013). TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLOS Pathog.* *9*, e1003232.
- Johnston, B.L., and Conly, J.M. (2000). West Nile virus - Where did it come from and where might it go? *Can. J. Infect. Dis.* *11*, 175–178.
- Johnston, L.J., Halliday, G.M., and King, N.J. (2000). Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 560–568.
- Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J.Y.-N., and Lipkin, W.I. (2000). Ribavirin Inhibits West Nile Virus Replication and Cytopathic Effect in Neural Cells. *J. Infect. Dis.* *182*, 1214–1217.
- Joubert, L., Oudar, J., Hannoun, C., Beytout, D., Corniou, B., Guillon, J.C., and Panthier, R. (1970). [Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]. *Ann. Inst. Pasteur* *118*, 239–247.
- Kalil, A.C., Devetten, M.P., Singh, S., Lesiak, B., Poage, D.P., Bargenquast, K., Fayad, P., and Freifeld, A.G. (2005). Use of Interferon- α in Patients with West Nile Encephalitis: Report of 2 Cases. *Clin. Infect. Dis.* *40*, 764–766.
- Kanai, R., Kar, K., Anthony, K., Gould, L.H., Ledizet, M., Fikrig, E., Marasco, W.A., Koski, R.A., and Modis, Y. (2006). Crystal Structure of West Nile Virus Envelope Glycoprotein Reveals Viral Surface Epitopes. *J. Virol.* *80*, 11000–11008.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* *141*, 137–145.
- Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* *5*.
- Kemenesi, G., Dallos, B., Oldal, M., Kutas, A., Földes, F., Németh, V., Reiter, P., Bakonyi, T., Bányai, K., and Jakab, F. (2014). Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia* mosquito, Hungary. *Virusdisease* *25*, 500–503.
- Kesson, A.M., Blanden, R.V., and 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.

- Khamaikawin, W., Saoin, S., Nangola, S., Chupradit, K., Sakkhachornphop, S., Hadpech, S., Onlamoon, N., Ansari, A.A., Byrareddy, S.N., Boulanger, P., et al. (2015). Combined Antiviral Therapy Using Designed Molecular Scaffolds Targeting Two Distinct Viral Functions, HIV-1 Genome Integration and Capsid Assembly. *Mol. Ther. Acids* 4, e249.
- Khan, S.A., Chowdhury, P., Choudhury, P., and Dutta, P. (2017). Detection of West Nile virus in six mosquito species in synchrony with seroconversion among sentinel chickens in India. *Parasit. Vectors* 10, 13.
- Khromykh, A.A., and Westaway, E.G. (1996). RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. *Arch. Virol.* 141, 685–699.
- Khromykh, A.A., Sedlak, P.L., Guyatt, K.J., Hall, R.A., and Westaway, E.G. (1999). Efficient trans-Complementation of the Flavivirus Kunjin NS5 Protein but Not of the NS1 Protein Requires Its Coexpression with Other Components of the Viral Replicase. *J. Virol.* 73, 10272–10280.
- Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J., and Westaway, E.G. (2001a). Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication. *J. Virol.* 75, 6719–6728.
- Khromykh, A.A., Varnavski, A.N., Sedlak, P.L., and 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, 4633–4640.
- Kimura, T., and 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.
- Klein, R.S., and Diamond, M.S. (2008). Immunological headgear: antiviral immune responses protect against neuroinvasive West Nile virus. *Trends Mol. Med.* 14, 286–294.
- Komar, N., and Clark, G.G. (2006). West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud Publica Pan Am. J. Public Health* 19, 112–117.
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., and Bunning, M. (2003). Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 311–322.
- Kong, K.-F., Delroux, K., Wang, X., Qian, F., Arjona, A., Malawista, S.E., Fikrig, E., and Montgomery, R.R. (2008). Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly. *J. Virol.* 82, 7613–7623.
- Konishi, E., and Mason, P.W. (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J. Virol.* 67, 1672–1675.

- Koraka, P., Barzon, L., and Martina, B.E. (2016). West Nile Virus Infections in (European) Birds. *J. Neuroinfectious Dis.* 7, 1–2.
- Kramer, L.D., Li, J., and Shi, P.-Y. (2007). West Nile virus. *Lancet Neurol.* 6, 171–181.
- Krishna, V.D., Rangappa, M., and Satchidanandam, V. (2009). Virus-Specific Cytolytic Antibodies to Nonstructural Protein 1 of Japanese Encephalitis Virus Effect Reduction of Virus Output from Infected Cells. *J. Virol.* 83, 4766–4777.
- Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., et al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717–725.
- Kumar, A., Kim, J.H., Ranjan, P., Metcalfe, M.G., Cao, W., Mishina, M., Gangappa, S., Guo, Z., Boyden, E.S., Zaki, S., et al. (2017). Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Sci. Rep.* 7, srep40360.
- Kurosu, T., Chaichana, P., Yamate, M., Anantapreecha, S., and Ikuta, K. (2007). Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 1051–1056.
- Kushawaha, A., Jadonath, S., and Mobarakai, N. (2009). West nile virus myocarditis causing a fatal arrhythmia: a case report. *Cases J.* 2.
- Lanciotti, R.S., Weissman, J., Savage, N.K., and Stone, W. (1999). Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Med Hyg* 4, 872.
- 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., et al. (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.
- 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., et al. (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, 3503–3515.
- Lazear, H.M., Pinto, A.K., Ramos, H.J., Vick, S.C., Shrestha, B., Suthar, M.S., Gale, M., and Diamond, M.S. (2013a). Pattern recognition receptor MDA5 modulates CD8+ T cell-dependent clearance of West Nile virus from the central nervous system. *J. Virol.* 87, 11401–11415.
- Lazear, H.M., Lancaster, A., Wilkins, C., Suthar, M.S., Huang, A., Vick, S.C., Clepper, L., Thackray, L., Brassil, M.M., Virgin, H.W., et al. (2013b). IRF-3, IRF-5, and IRF-7 Coordinately

Regulate the Type I IFN Response in Myeloid Dendritic Cells Downstream of MAVS Signaling. *PLoS Pathog.* 9, e1003118.

Lazear, H.M., Nice, T.J., and Diamond, M.S. (2015a). Interferon- λ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity* 43, 15–28.

Lazear, H.M., Daniels, B.P., Pinto, A.K., Huang, A.C., Vick, S.C., Doyle, S.E., Gale, M., Klein, R.S., and Diamond, M.S. (2015b). Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. *Sci. Transl. Med.* 7, 284ra59-284ra59.

Lee, T., Watanabe, K., Aizawa, C., Nomoto, A., and Hashimoto, H. (1991). Preparation of Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 obtained from culture fluid of JEV-infected Vero cells. *Arch. Virol.* 116, 253–260.

Leis, A.A., and Stokic, D.S. (2012). Neuromuscular Manifestations of West Nile Virus Infection. *Front. Neurol.* 3.

Lennemann, N.J., Herbert, A.S., Brouillette, R., Rhein, B., Bakken, R.A., Perschbacher, K.J., Cooney, A.L., Miller-Hunt, C.L., Eyck, P.T., Biggins, J., et al. (2017). Vesicular Stomatitis Virus Pseudotyped with Ebola Virus Glycoprotein Serves as a Protective, Noninfectious Vaccine against Ebola Virus Challenge in Mice. *J. Virol.* 91, e00479-17.

Leung, J.Y., Pijlman, G.P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J.M., and Khromykh, A.A. (2008). Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *J. Virol.* 82, 4731–4741.

Leyssen, P., Balzarini, J., De Clercq, E., and Neyts, J. (2005). The Predominant Mechanism by Which Ribavirin Exerts Its Antiviral Activity In Vitro against Flaviviruses and Paramyxoviruses Is Mediated by Inhibition of IMP Dehydrogenase. *J. Virol.* 79, 1943–1947.

Libraty, D.H., Young, P.R., Pickering, D., Endy, T.P., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Ennis, F.A., and Rothman, A.L. (2002). High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 186, 1165–1168.

Lien, T.-S., Sun, D.-S., Chang, C.-M., Wu, C.-Y., Dai, M.-S., Chan, H., Wu, W.-S., Su, S.-H., Lin, Y.-Y., and Chang, H.-H. (2015). Dengue virus and antiplatelet autoantibodies synergistically induce haemorrhage through Nlrp3-inflammasome and Fc γ RIII. *Thromb. Haemost.* 113, 1060–1070.

Lim, P.-Y., Behr, M.J., Chadwick, C.M., Shi, P.-Y., and Bernard, K.A. (2011). Keratinocytes Are Cell Targets of West Nile Virus In Vivo. *J. Virol.* 85, 5197–5201.

Lin, C., Amberg, S.M., Chambers, T.J., and 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, 2327–2335.

- Lin, C.-F., Lei, H.-Y., Shiau, A.-L., Liu, H.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., Liu, C.-C., Chiu, S.-C., and Lin, Y.-S. (2002). Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide. *J. Immunol.* *169*, 657–664.
- Lin, C.-F., Chiu, S.-C., Hsiao, Y.-L., Wan, S.-W., Lei, H.-Y., Shiau, A.-L., Liu, H.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., Liu, C.-C., et al. (2005). Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1. *J. Immunol.* *174*, 395–403.
- Lindenbach, Thiel, and Rice, C.M. (2007). *Flaviviridae : The Viruses and their Replication*.
- Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, S., Qiu, J., Pang, X., Wang, P., and Cheng, G. (2016). Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nat. Microbiol.* *1*, 16087.
- Liu, L., Dong, H., Chen, H., Zhang, J., Ling, H., Li, Z., Shi, P.-Y., and Li, H. (2010). Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front. Biol.* *5*, 286–303.
- Liu, W.J., Chen, H.B., and 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*, 7804–7813.
- Liu, W.J., Chen, H.B., Wang, X.J., Huang, H., and 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*, 12225–12235.
- Liu, W.J., Wang, X.J., Mokhonov, V.V., Shi, P.-Y., Randall, R., and 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., and 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*, 2396–2404.
- Liu, Y., Liu, J., Du, S., Shan, C., Nie, K., Zhang, R., Li, X.-F., Zhang, R., Wang, T., Qin, C.-F., et al. (2017). Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* *545*.
- Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* *34*, 680–692.

- Loo, Y.-M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M.A., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G., et al. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *J. Virol.* 82, 335–345.
- Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X., and Helenius, A. (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 76, 5480–5491.
- Lubick, K.J., Robertson, S.J., McNally, K.L., Freedman, B.A., Rasmussen, A.L., Taylor, R.T., Walts, A.D., Tsuruda, S., Sakai, M., Ishizuka, M., et al. (2015). Flavivirus Antagonism of Type I Interferon Signaling Reveals Prolidase as a Regulator of IFNAR1 Surface Expression. *Cell Host Microbe* 18, 61–74.
- Luo, H., Winkelmann, E., Xie, G., Fang, R., Peng, B.-H., Li, L., Lazear, H.M., Paessler, S., Diamond, M.S., Gale, M., et al. (2017). MAVS Is Essential for Primary CD4(+) T Cell Immunity but Not for Recall T Cell Responses following an Attenuated West Nile Virus Infection. *J. Virol.* 91.
- Ma, D., Jiang, D., Qing, M., Weidner, J.M., Qu, X., Guo, H., Chang, J., Gu, B., Shi, P.-Y., Block, T.M., et al. (2009). Antiviral effect of interferon lambda against West Nile virus. *Antiviral Res.* 83, 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., et al. (2005). NS1 Protein Secretion during the Acute Phase of West Nile Virus Infection. *J. Virol.* 79, 13924–13933.
- Mackenzie, J.M., and 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, 10787–10799.
- Mackenzie, J.M., JONES, M.K., and 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., and Westaway, E.G. (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 245, 203–215.
- Mandl, C.W., Heinz, F.X., Stöckl, E., and Kunz, C. (1989). Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 173, 291–301.
- van Marle, G., Antony, J., Ostermann, H., Dunham, C., Hunt, T., Halliday, W., Maingat, F., Urbanowski, M.D., Hobman, T., Peeling, J., et al. (2007). West Nile Virus-Induced

Neuroinflammation: Glial Infection and Capsid Protein-Mediated Neurovirulence. *J. Virol.* **81**, 10933–10949.

Mashimo, T., Simon-Chazottes, D., and Guénet, J.-L. (2008). Innate resistance to flavivirus infections and the functions of 2'-5' oligoadenylate synthetases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **321**, 85–100.

Mason, P.W. (1989). Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* **169**, 354–364.

Mastrangelo, E., Milani, M., Bollati, M., Selisko, B., Peyrane, F., Pandini, V., Sorrentino, G., Canard, B., Konarev, P.V., Svergun, D.I., et al. (2007). Crystal Structure and Activity of Kunjin Virus NS3 Helicase; Protease and Helicase Domain Assembly in the Full Length NS3 Protein. *J. Mol. Biol.* **372**, 444–455.

May, F.J., Davis, C.T., Tesh, R.B., and Barrett, A.D.T. (2011). Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* **85**, 2964–2974.

McLean, B.J., Hobson-Peters, J., Webb, C.E., Watterson, D., Prow, N.A., Nguyen, H.D., Hall-Mendelin, S., Warrilow, D., Johansen, C.A., Jansen, C.C., et al. (2015). A novel insect-specific flavivirus replicates only in *Aedes*-derived cells and persists at high prevalence in wild *Aedes vigilax* populations in Sydney, Australia. *Virology* **486**, 272–283.

Medigeshi, G.R., Lancaster, A.M., Hirsch, A.J., Briese, T., Lipkin, W.I., Defilippis, V., Früh, K., Mason, P.W., Nikolich-Zugich, J., and Nelson, J.A. (2007). West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J. Virol.* **81**, 10849–10860.

Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., and Amara, A. (2012). The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* **12**, 544–557.

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., et al. (2009). 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**, 1641–1647.

Melian, E.B., Edmonds, J.H., Nagasaki, T.K., Hinzman, E., Floden, N., and Khromykh, A.A. (2013). West Nile virus NS2A protein facilitates virus-induced apoptosis independently of interferon response. *J. Gen. Virol.* **94**, 308–313.

Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., and Hovanessian, A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**, 379–390.

- Miller, S., Sparacio, S., and Bartenschlager, R. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem.* *281*, 8854–8863.
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., and Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* *282*, 8873–8882.
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D.A., Panetta, A.K., Sester, D.P., Liu, L., Hume, D.A., Stacey, K.J., and Young, P.R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci. Transl. Med.* *7*, 304ra142–304ra142.
- Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A.G., Young, P.R., and Stacey, K.J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol. Cell Biol.* *95*, 491–495.
- Monaco, F., Lelli, R., Teodori, L., Pinoni, C., Di Gennaro, A., Polci, A., Calistri, P., and Savini, G. (2010). Re-Emergence of West Nile Virus in Italy. *Zoonoses Public Health* *57*, 476–486.
- Monath, T.P., and Barrett, A.D. (2003). Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv. Virus Res.* *60*, 343–395.
- Mordstein, M., Neugebauer, E., Ditt, V., Jessen, B., Rieger, T., Falcone, V., Sorgeloos, F., Ehl, S., Mayer, D., Kochs, G., et al. (2010). Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J. Virol.* *84*, 5670–5677.
- Morrey, J.D., Day, C.W., Julander, J.G., Blatt, L.M., Smee, D.F., and Sidwell, R.W. (2004). Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir. Chem. Chemother.* *15*, 101–109.
- Mostashari, F., Bunning, M.L., Kitsutani, P.T., Singer, D.A., Nash, D., Cooper, M.J., Katz, N., Liljebjelke, K.A., Biggerstaff, B.J., Fine, A.D., et al. (2001). Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *The Lancet* *358*, 261–264.
- Mukhopadhyay, S., Kim, B.-S., Chipman, P.R., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. (2003). Structure of west nile virus. *Science* *302*, 248–248.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 13–22.
- Muller, D.A., and Young, P.R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* *98*, 192–208.

- Muñoz-Jordán, J.L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I., and García-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* *79*, 8004–8013.
- Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V., and Zeller, H.G. (2001a). West Nile in the Mediterranean Basin: 1950-2000. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *951*, 117–126.
- Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J.-P., and Zeller, H. (2001b). West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.* *7*, 692.
- Muylaert, I.R., Chambers, T.J., Galler, R., and 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., and Qin, J. (2000). A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J.* *19*, 5567–5574.
- Nash, D., Mostashari, F., Fine, A., Miller, J., O’Leary, D., Murray, K., Huang, A., Rosenberg, A., Greenberg, A., Sherman, M., et al. (2001). The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1807–1814.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., and Desprès, P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* *4*, 723–728.
- Neal, J.W. (2014). Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *J. Infect.* *69*, 203–215.
- Netland, J., and Bevan, M.J. (2013). CD8 and CD4 T Cells in West Nile Virus Immunity and Pathogenesis. *Viruses* *5*, 2573–2584.
- Nett, R. j., Kuehnert, M. j., Ison, M. g., Orlowski, J. p., Fischer, M., and Staples, J. e. (2012). Current practices and evaluation of screening solid organ donors for West Nile virus. *Transpl. Infect. Dis.* *14*, 268–277.
- Ng, M.L., and Hong, S.S. (1989). Flavivirus infection: essential ultrastructural changes and association of Kunjin virus NS3 protein with microtubules. *Arch. Virol.* *106*, 103–120.
- Nice, T.J., Baldrige, M.T., McCune, B.T., Norman, J.M., Lazear, H.M., Artyomov, M., Diamond, M.S., and Virgin, H.W. (2015). Interferon- λ cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity. *Science* *347*, 269–273.

- Nowak, T., Färber, P.M., Wengler, G., and Wengler, G. (1989). Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* *169*, 365–376.
- Nybakken, G.E., Oliphant, T., Johnson, S., Burke, S., Diamond, M.S., and Fremont, D.H. (2005). Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* *437*, 764–769.
- Nybakken, G.E., Nelson, C.A., Chen, B.R., Diamond, M.S., and Fremont, D.H. (2006). Crystal Structure of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein. *J. Virol.* *80*, 11467–11474.
- O’Leary, D.R., Kuhn, S., Kniss, K.L., Hinckley, A.F., Rasmussen, S.A., Pape, W.J., Kightlinger, L.K., Beecham, B.D., Miller, T.K., Neitzel, D.F., et al. (2006). Birth Outcomes Following West Nile Virus Infection of Pregnant Women in the United States: 2003-2004. *Pediatrics* *117*, e537–e545.
- Oliphant, T., Engle, M., Nybakken, G.E., Doane, C., Johnson, S., Huang, L., Gorlatov, S., Mehlhop, E., Marri, A., Chung, K.M., et al. (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat. Med.* *11*, 522–530.
- Oliphant, T., Nybakken, G.E., Engle, M., Xu, Q., Nelson, C.A., Sukupolvi-Petty, S., Marri, A., Lachmi, B.-E., Olshevsky, U., Fremont, D.H., et al. (2006). Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein. *J. Virol.* *80*, 12149–12159.
- Orozco-García, E., Trujillo-Correa, A., and CarlosGallego-Gómez, J. (2016). Cell Biology of Virus Infection. The Role of Cytoskeletal Dynamics Integrity in the Effectiveness of Dengue Virus Infection.
- Pachler, K., Lebl, K., Berer, D., Rudolf, I., Hubalek, Z., and Nowotny, N. (2014). Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* *20*, 2119–2122.
- Pal, S., Dauner, A.L., Mitra, I., Forshey, B.M., Garcia, P., Morrison, A.C., Halsey, E.S., Kochel, T.J., and Wu, S.-J.L. (2014). Evaluation of Dengue NS1 Antigen Rapid Tests and ELISA Kits Using Clinical Samples. *PLOS ONE* *9*, e113411.
- Pande, J., Szewczyk, M.M., and Grover, A.K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnol. Adv.* *28*, 849–858.
- Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., and Nowotny, N. (2011). Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 920–922.

- Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.-B., and Walker, P.J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 18915–18920.
- Pealer, L.N., Marfin, A.A., Petersen, L.R., Lanciotti, R.S., Page, P.L., Stramer, S.L., Stobierski, M.G., Signs, K., Newman, B., Kapoor, H., et al. (2003). Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* *349*, 1236–1245.
- Perelman, A., and Stern, J. (1974). Acute Pancreatitis in West Nile Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *23*, 1150–1152.
- Perelygin, A.A., Scherbik, S.V., Zhulin, I.B., Stockman, B.M., Li, Y., and Brinton, M.A. (2002). Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 9322–9327.
- Perera, R., and Kuhn, R.J. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 369–377.
- Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* *202*, 8–32.
- Petersen, L.R., and Hayes, E.B. (2008). West Nile virus in the Americas. *Med. Clin. North Am.* *92*, 1307–1322, ix.
- Petersen, L.R., Brault, A.C., and Nasci, R.S. (2013). West Nile Virus: Review of the Literature. *JAMA* *310*, 308.
- Pierson, T.C., and Diamond, M.S. (2012). Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* *2*, 168–175.
- Pierson, T.C., and Kielian, M. (2013). Flaviviruses: braking the entering. *Curr. Opin. Virol.* *3*, 3–12.
- Pijlman, G.P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W.J., Palmenberg, A.C., Shi, P.-Y., Hall, R.A., et al. (2008). A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host Microbe* *4*, 579–591.
- Piyasena, T.B.H., Setoh, Y.X., Hobson-Peters, J., Prow, N.A., Bielefeldt-Ohmann, H., Khromykh, A.A., Perera, D., Cardoso, M.J., Kirkland, P.D., and Hall, R.A. (2017). Differential Diagnosis of Flavivirus Infections in Horses Using Viral Envelope Protein Domain III Antigens in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*
- 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., et al. (2001). Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* *7*, 128.

Platt, D.J., Smith, A.M., Arora, N., Diamond, M.S., Coyne, C.B., and Miner, J.J. (2018). Zika virus-related neurotropic flaviviruses infect human placental explants and cause fetal demise in mice. *Sci. Transl. Med.* *10*.

POIDINGER, M., HALL, R.A., and MACKENZIE, J.S. (1996). Molecular Characterization of the Japanese Encephalitis Serocomplex of the Flavivirus Genus. *Virology* *218*, 417–421.

Polacek, C., Foley, J.E., and Harris, E. (2009). Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region. *J. Virol.* *83*, 1161–1166.

Pong, W.-L., Huang, Z.-S., Teoh, P.-G., Wang, C.-C., and Wu, H.-N. (2011). RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins. *FEBS Lett.* *585*, 2575–2581.

Post, P.R., Carvalho, R., and Galler, R. (1991). Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Virus Res.* *18*, 291–302.

Pradier, S., Leblond, A., and Durand, B. (2008). Land Cover, Landscape Structure, and West Nile Virus Circulation in Southern France. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* *8*, 253–264.

Pradier, S., Lecollinet, S., and Leblond, A. (2012). West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* *31*, 829–844.

Prasain, N., and Stevens, T. (2009). The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* *77*, 53–63.

Puig-Basagoiti, F., Tilgner, M., Bennett, C.J., Zhou, Y., Muñoz-Jordán, J.L., García-Sastre, A., Bernard, K.A., and Shi, P.-Y. (2007). A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology* *361*, 229–241.

Quick, E.D., Leser, J.S., Clarke, P., and Tyler, K.L. (2014). Activation of Intrinsic Immune Responses and Microglial Phagocytosis in an Ex Vivo Spinal Cord Slice Culture Model of West Nile Virus Infection. *J. Virol.* *88*, 13005–13014.

Quirin, R., Salas, M., Zientara, S., Zeller, H., Labie, J., Murri, S., Lefrançois, T., Petitclerc, M., and 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., and 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*, 56–72.

Rastogi, M., Sharma, N., and Singh, S.K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol. J.* *13*.

- Rebouillat, D., and Hovanessian, A.G. (1999). The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *19*, 295–308.
- Reikine, S., Nguyen, J.B., and Modis, Y. (2014). Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* *5*.
- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., and Strauss, J.H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* *229*, 726–733.
- Richard, A.S., Zhang, A., Park, S.-J., Farzan, M., Zong, M., and Choe, H. (2015). Virion-associated phosphatidylethanolamine promotes TIM1-mediated infection by Ebola, dengue, and West Nile viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 14682–14687.
- Rios, J.J., Fleming, J.G.W., Bryant, U.K., Carter, C.N., Jr, J.C.H., Long, M.T., Spencer, T.E., and Adelson, D.L. (2010). OAS1 Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to West Nile Encephalitis in Horses. *PLOS ONE* *5*, e10537.
- Roby, J.A., Pijlman, G.P., Wilusz, J., and Khromykh, A.A. (2014). Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA: Multiple Functions in West Nile Virus Pathogenesis and Modulation of Host Responses. *Viruses* *6*, 404–427.
- Roe, K., Kumar, M., Lum, S., Orillo, B., Nerurkar, V.R., and Verma, S. (2012). West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* *93*, 1193–1203.
- Roe, K., Orillo, B., and Verma, S. (2014). West Nile Virus-Induced Cell Adhesion Molecules on Human Brain Microvascular Endothelial Cells Regulate Leukocyte Adhesion and Modulate Permeability of the In Vitro Blood-Brain Barrier Model. *PLoS ONE* *9*.
- Romano, P.R., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D.R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M.B., Qin, J., and 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*, 2282–2297.
- Roosendaal, J., Westaway, E.G., Khromykh, A., and 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*, 4623–4632.
- Rossini, G., Landini, M.P., Gelsomino, F., Sambri, V., and Varani, S. (2013). Innate host responses to West Nile virus: Implications for central nervous system immunopathology. *World J. Virol.* *2*, 49–56.

- Sadler, A.J., and Williams, B.R.G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 559–568.
- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of Hepatitis C virus RNA. *Nature* *454*, 523–527.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 778–809.
- Samuel, M.A., and 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.G., Silverman, R.H., Gale, M., and Diamond, M.S. (2006). 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., Wang, H., Siddharthan, V., Morrey, J.D., and Diamond, M.S. (2007a). Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 17140–17145.
- Samuel, M.A., Morrey, J.D., and Diamond, M.S. (2007b). Caspase 3-Dependent Cell Death of Neurons Contributes to the Pathogenesis of West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* *81*, 2614–2623.
- Sánchez, M.D., Pierson, T.C., McAllister, D., Hanna, S.L., Puffer, B.A., Valentine, L.E., Murtadha, M.M., Hoxie, J.A., and Doms, R.W. (2005). Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* *336*, 70–82.
- Savage, H.M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C., and Tsai, T.F. (1999). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *61*, 600–611.
- Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., and Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathog* *11*, e1005277.
- Scherret, J.H., Poidinger, M., Mackenzie, J.S., Broom, A.K., Deubel, V., Lipkin, W.I., Briese, T., Gould, E.A., and Hall, R.A. (2001a). The relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg. Infect. Dis.* *7*, 697–705.
- Scherret, J.H., Mackenzie, J.S., Khromykh, A.A., and Hall, R.A. (2001b). Biological Significance of Glycosylation of the Envelope Protein of Kunjin Virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *951*, 361–363.

Schlesinger, J.J. (2006). Flavivirus nonstructural protein NS1: Complementary surprises. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18879–18880.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., and Walsh, E.E. (1987). Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol.* *68 (Pt 3)*, 853–857.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Putnak, J.R., and Walsh, E.E. (1990). Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J. Gen. Virol.* *71*, 593–599.

Schmidt, K., Keller, M., Bader, B.L., Korytar, T., Finke, S., Ziegler, U., and Groschup, M.H. (2013). Integrins modulate the infection efficiency of West Nile virus into cells. *J. Gen. Virol.* *94*, 1723–1733.

Schnettler, E., Sterken, M.G., Leung, J.Y., Metz, S.W., Geertsema, C., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., Kohl, A., Khromykh, A.A., and Pijlman, G.P. (2012). Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. *J. Virol.* *86*, 13486–13500.

Schuessler, A., Funk, A., Lazear, H.M., Cooper, D.A., Torres, S., Daffis, S., Jha, B.K., Kumagai, Y., Takeuchi, O., Hertzog, P., et al. (2012). West Nile Virus Noncoding Subgenomic RNA Contributes to Viral Evasion of the Type I Interferon-Mediated Antiviral Response. *J. Virol.* *86*, 5708–5718.

Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell* *122*, 669–682.

Shi, X., and Jarvis, D.L. (2007). Protein N-Glycosylation in the Baculovirus-Insect Cell System. *Curr. Drug Targets* *8*, 1116–1125.

Shi, P.Y., Li, W., and Brinton, M.A. (1996a). Cell proteins bind specifically to West Nile virus minus-strand 3' stem-loop RNA. *J. Virol.* *70*, 6278–6287.

Shi, P.Y., Brinton, M.A., Veal, J.M., Zhong, Y.Y., and Wilson, W.D. (1996b). Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 4222–4230.

Shirato, K., Miyoshi, H., Goto, A., Ako, Y., Ueki, T., Kariwa, H., and Takashima, I. (2004). Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* *85*, 3637–3645.

Shrestha, B., and Diamond, M.S. (2004). Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *J. Virol.* *78*, 8312–8321.

- Shrestha, B., Gottlieb, D., and Diamond, M.S. (2003). Infection and Injury of Neurons by West Nile Encephalitis Virus. *J. Virol.* *77*, 13203–13213.
- Shrestha, B., Wang, T., Samuel, M.A., Whitby, K., Craft, J., Fikrig, E., and Diamond, M.S. (2006). Gamma Interferon Plays a Crucial Early Antiviral Role in Protection against West Nile Virus Infection. *J. Virol.* *80*, 5338–5348.
- Shrestha, B., Zhang, B., Purtha, W.E., Klein, R.S., and Diamond, M.S. (2008). Tumor Necrosis Factor Alpha Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Promoting Trafficking of Mononuclear Leukocytes into the Central Nervous System. *J. Virol.* *82*, 8956–8964.
- Simon-Chazottes, D., Frenkiel, M.-P., Montagutelli, X., Guénet, J.-L., Desprès, P., and Panthier, J.-J. (2011). Transgenic expression of full-length 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b confers to BALB/c mice resistance against West Nile virus-induced encephalitis. *Virology* *417*, 147–153.
- Smit, J.M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., and Wilschut, J. (2011). Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* *3*, 160–171.
- Smith, G.W., and Wright, P.J. (1985). Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. *J. Gen. Virol.* *66* (Pt 3), 559–571.
- Smith, T.J., Brandt, W.E., Swanson, J.L., McCown, J.M., and Buescher, E.L. (1970). Physical and Biological Properties of Dengue-2 Virus and Associated Antigens. *J. Virol.* *5*, 524–532.
- Smithburn, K., Hughes, T., Burke, A., and Paul, J.. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *s1-20*, 471–492.
- Sobel, A., Bokisch, V.A., and Müller-Eberhard, H. (1975). C1q deviation test for the detection of immune complexes, aggregates of IgG, and bacterial products in human serum. *J. Exp. Med.* *142*, 139–150.
- Solomon, T. (2004). Flavivirus Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* *351*, 370–378.
- Solomon, T., and Vaughn, D.W. (2002). Pathogenesis and clinical features of Japanese encephalitis and West Nile virus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *267*, 171–194.
- Somnuk, P., Hauhart, R.E., Atkinson, J.P., Diamond, M.S., and Avirutnan, P. (2011). N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. *Virology* *413*, 253–264.
- Souza-Neto, J.A., Sim, S., and Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17841–17846.

- Speight, G., and Westaway, E.G. (1989). Carboxy-terminal analysis of nine proteins specified by the flavivirus Kunjin: evidence that only the intracellular core protein is truncated. *J. Gen. Virol.* *70* (Pt 8), 2209–2214.
- Spindler, K.R., and Hsu, T.-H. (2012). Viral disruption of the blood–brain barrier. *Trends Microbiol.* *20*, 282–290.
- Stadler, K., Allison, S.L., Schlich, J., and Heinz, F.X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* *71*, 8475–8481.
- Steffen, I., and Simmons, G. (2016). Pseudotyping Viral Vectors With Emerging Virus Envelope Proteins. *Curr. Gene Ther.* *16*, 47–55.
- Steffens, S., Thiel, H.J., and Behrens, S.E. (1999). The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J. Gen. Virol.* *80* (Pt 10), 2583–2590.
- Steiner, D., Forrer, P., and Plückthun, A. (2008). Efficient Selection of DARPins with Sub-nanomolar Affinities using SRP Phage Display. *J. Mol. Biol.* *382*, 1211–1227.
- Stern, O., Hung, Y.-F., Valda, O., Yaffe, Y., Harris, E., Hoffmann, S., Willbold, D., and Sklan, E.H. (2013). An N-terminal amphipathic helix in dengue virus nonstructural protein 4A mediates oligomerization and is essential for replication. *J. Virol.* *87*, 4080–4085.
- Stewart, R.D., Bryant, S.N., and Sheffield, J.S. (2013). West Nile Virus Infection in Pregnancy. *Case Rep. Infect. Dis.* *2013*.
- Suen, W., Prow, N., Hall, R., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2014). Mechanism of West Nile Virus Neuroinvasion: A Critical Appraisal. *Viruses* *6*, 2796–2825.
- Sun, D.-S., King, C.-C., Huang, H.-S., Shih, Y.-L., Lee, C.-C., Tsai, W.-J., Yu, C.-C., and Chang, H.-H. (2007a). Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* *5*, 2291–2299.
- Sun, D.-S., King, C.-C., Huang, H.-S., Shih, Y.-L., Lee, C.-C., Tsai, W.-J., Yu, C.-C., and Chang, H.-H. (2007b). Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 2291–2299.
- Sun, D.-S., Chang, Y.-C., Lien, T.-S., King, C.-C., Shih, Y.-L., Huang, H.-S., Wang, T.-Y., Li, C.-R., Lee, C.-C., Hsu, P.-N., et al. (2015). Endothelial Cell Sensitization by Death Receptor Fractions of an Anti-Dengue Nonstructural Protein 1 Antibody Induced Plasma Leakage, Coagulopathy, and Mortality in Mice. *J. Immunol.* *195*, 2743–2753.
- Sun, E.-C., Ma, J.-N., Liu, N.-H., Yang, T., Zhao, J., Geng, H.-W., Wang, L.-F., Qin, Y.-L., Bu, Z.-G., Yang, Y.-H., et al. (2011). Identification of two linear B-cell epitopes from West Nile virus NS1 by screening a phage-displayed random peptide library. *BMC Microbiol.* *11*, 160.

- Sun, E.-C., Zhao, J., Liu, N.-H., Yang, T., Ma, J.-N., Geng, H.-W., Wang, L.-F., Qin, Y.-L., Bu, Z.-G., Yang, Y.-H., et al. (2012). Comprehensive mapping of West Nile virus (WNV)- and Japanese encephalitis virus serocomplex-specific linear B-cell epitopes from WNV non-structural protein 1. *J. Gen. Virol.* *93*, 50–60.
- 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., et al. (2010). IPS-1 Is Essential for the Control of West Nile Virus Infection and Immunity. *PLoS Pathog.* *6*, e1000757.
- Suthar, M.S., Diamond, M.S., and Gale Jr, M. (2013a). West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 115–128.
- Suthar, M.S., Aguirre, S., and Fernandez-Sesma, A. (2013b). Innate immune sensing of flaviviruses. *PLoS Pathog* *9*, e1003541.
- Szretter, K.J., Daffis, S., Patel, J., Suthar, M.S., Klein, R.S., Gale, M., and Diamond, M.S. (2010). The Innate Immune Adaptor Molecule MyD88 Restricts West Nile Virus Replication and Spread in Neurons of the Central Nervous System. *J. Virol.* *84*, 12125–12138.
- Tabata, K., Arimoto, M., Arakawa, M., Nara, A., Saito, K., Omori, H., Arai, A., Ishikawa, T., Konishi, E., Suzuki, R., et al. (2016). Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep.* *16*, 2339–2347.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* *17*, 1–14.
- TAN, B.-H., FU, J., SUGRUE, R.J., YAP, E.-H., CHAN, Y.-C., and TAN, Y.H. (1996). Recombinant Dengue Type 1 Virus NS5 Protein Expressed in *Escherichia coli* Exhibits RNA-Dependent RNA Polymerase Activity. *Virology* *216*, 317–325.
- Tardei, G., Ruta, S., Chitu, V., Rossi, C., Tsai, T.F., and Cernescu, C. (2000). Evaluation of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme Immunoassays in Serologic Diagnosis of West Nile Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* *38*, 2232–2239.
- Taylor, M.P., Koyuncu, O.O., and Enquist, L.W. (2011). Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 427–439.
- Taylor, R.M., Work, T.H., Hurlbut, H.S., and Rizk, F. (1956). A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt¹. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *5*, 579–620.
- Taylor, S.S., Haste, N.M., and Ghosh, G. (2005). PKR and eIF2 α : integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* *122*, 823–825.
- Thiemmecca, S., Tamdet, C., Punyadee, N., Prommool, T., Songjaeng, A., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Atkinson, J.P., Diamond, M.S., Ponlawat, A., et al. (2016). Secreted NS1

- Protects Dengue Virus from Mannose-Binding Lectin–Mediated Neutralization. *J. Immunol.* *197*, 4053–4065.
- Thurner, C., Witwer, C., Hofacker, I.L., and Stadler, P.F. (2004). Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J. Gen. Virol.* *85*, 1113–1124.
- Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Simmons, C.P., Farrar, J., Martin, T.R., and Katze, M.G. (2012). Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *76*, 16–32.
- Town, T., Bai, F., Wang, T., Kaplan, A.T., Qian, F., Montgomery, R.R., Anderson, J.F., Flavell, R.A., and 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., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G., and Nedelcu, N. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *The Lancet* *352*, 767–771.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 2563–2582.
- Urbanowski, M.D., and Hobman, T.C. (2013). The West Nile Virus Capsid Protein Blocks Apoptosis through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism. *J. Virol.* *87*, 872–881.
- Urvoas, A., Guellouz, A., Valerio-Lepiniec, M., Graille, M., Durand, D., Desravines, D.C., van Tilbeurgh, H., Desmadril, M., and Minard, P. (2010). Design, Production and Molecular Structure of a New Family of Artificial Alpha-helical Repeat Proteins (α Rep) Based on Thermostable HEAT-like Repeats. *J. Mol. Biol.* *404*, 307–327.
- Urvoas, A., Valerio-Lepiniec, M., and Minard, P. (2012). Artificial proteins from combinatorial approaches. *Trends Biotechnol.* *30*, 512–520.
- Vaure, C., and Liu, Y. (2014). A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Front. Immunol.* *5*.
- Vazquez, A., Sanchez-Seco, M.P., Ruiz, S., Molero, F., Hernandez, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C.G., and Tenorio, A. (2010). Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* *16*, 549–552.
- Venter, M., Burt, F.J., Blumberg, L., Fickl, H., Paweska, J., and Swanepoel, R. (2009). Cytokine Induction after Laboratory-Acquired West Nile Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1260–1262.
- Verma, S., Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., Luo, H., Nakatsuka, A., and 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, 425–433.

Verma, S., Kumar, M., Gurjav, U., Lum, S., and Nerurkar, V.R. (2010). Reversal of West Nile virus-induced blood–brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* 397, 130–138.

Vieira, M.A.C. e S., Aguiar, A. de A.X., Borba, A. de S., GuimarãEs, H.C.L., EuláLio, K.D., Albuquerque-Neto, L.L. de, Salmito, M. do A., and Lima, O.B. (2015). West Nile Fever in Brazil : sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages ? *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 57, 276–276.

Vratskikh, O., Stiasny, K., Zlatkovic, J., Tsouchnikas, G., Jarmer, J., Karrer, U., Roggendorf, M., Roggendorf, H., Allwinn, R., and Heinz, F.X. (2013). Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLoS Pathog* 9, e1003458.

Wang, H., Siddharthan, V., Hall, J.O., and Morrey, J.D. (2009). West Nile virus preferentially transports along motor neuron axons after sciatic nerve injection of hamsters. *J. Neurovirol.* 15, 293–299.

Wang, J.-L., Zhang, J.-L., Chen, W., Xu, X.-F., Gao, N., Fan, D.-Y., and An, J. (2010). Roles of Small GTPase Rac1 in the Regulation of Actin Cytoskeleton during Dengue Virus Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e809.

Wang, P., Dai, J., Bai, F., Kong, K.-F., Wong, S.J., Montgomery, R.R., Madri, J.A., and Fikrig, E. (2008). Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain. *J. Virol.* 82, 8978–8985.

Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E., and 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, T., Welte, T., Saxena, V., and Xie, G. (2011). Immunity Versus Immunopathology in West Nile Virus Induced Encephalitis. In *Flavivirus Encephalitis*, D. Ruzek, ed. (InTech), p.

Watterson, D., Modhiran, N., and Young, P.R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res.* 130, 7–18.

Weatherhead, J.E., Miller, V.E., Garcia, M.N., Hasbun, R., Salazar, L., Dimachkie, M.M., and Murray, K.O. (2015). Long-Term Neurological Outcomes in West Nile Virus-Infected Patients: An Observational Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 1006–1012.

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

- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375.
- Welte, T., Reagan, K., Fang, H., Machain-Williams, C., Zheng, X., Mendell, N., Chang, G.-J.J., Wu, P., Blair, C.D., and Wang, T. (2009). Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection. *J. Gen. Virol.* 90, 2660–2668.
- Wengler, G., and Wengler, G. (1993). The NS 3 Nonstructural Protein of Flaviviruses Contains an RNA Triphosphatase Activity. *Virology* 197, 265–273.
- Westaway, E.G., and Goodman, M.R. (1987). Variation in distribution of the three flavivirus-specified glycoproteins detected by immunofluorescence in infected Vero cells. *Arch. Virol.* 94, 215–228.
- Westaway, E.G., Mackenzie, J.M., Kenney, M.T., Jones, M.K., and 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, 6650–6661.
- Westaway, E.G., Mackenzie, J.M., and Khromykh, A.A. (2002). Replication and gene function in Kunjin virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267, 323–351.
- Whiteman, M.C., Wicker, J.A., Kinney, R.M., Huang, C.Y.-H., Solomon, T., and Barrett, A.D.T. (2011). Multiple amino acid changes at the first glycosylation motif in NS1 protein of West Nile virus are necessary for complete attenuation for mouse neuroinvasiveness. *Vaccine* 29, 9702–9710.
- Whiteman, M.C., Popov, V., Sherman, M.B., Wen, J., and Barrett, A.D.T. (2015). Attenuated West Nile Virus Mutant NS1_{130-132QQA/175A/207A} Exhibits Virus-Induced Ultrastructural Changes and Accumulation of Protein in the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.* 89, 1474–1478.
- Wicker, J.A., Whiteman, M.C., Beasley, D.W.C., Davis, C.T., McGee, C.E., Lee, J.C., Higgs, S., Kinney, R.M., Huang, C.Y.-H., and Barrett, A.D.T. (2012). Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology* 426, 22–33.
- Wilson, J.R., de Sessions, P.F., Leon, M.A., and Scholle, F. (2008). West Nile Virus Nonstructural Protein 1 Inhibits TLR3 Signal Transduction. *J. Virol.* 82, 8262–8271.
- Winkelmann, E.R., Luo, H., and Wang, T. (2016). West Nile Virus Infection in the Central Nervous System. F1000Research.
- Wittig, D., Wang, X., Walter, C., Gerdes, H.-H., Funk, R.H.W., and Roehlecke, C. (2012). Multi-Level Communication of Human Retinal Pigment Epithelial Cells via Tunneling Nanotubes. *PLOS ONE* 7, e33195.

- Wodak, E., Richter, S., Bagó, Z., Revilla-Fernández, S., Weissenböck, H., Nowotny, N., and Winter, P. (2011). Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet. Microbiol.* *149*, 358–366.
- Wu, R.F., Gu, Y., Xu, Y.C., Mitola, S., Bussolino, F., and Terada, L.S. (2004). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Regulates Endothelial Cell Actin Cytoskeletal Dynamics through PAK1 Activation and Oxidant Production. *J. Virol.* *78*, 779–789.
- Xie, G., Luo, H., Tian, B., Mann, B., Bao, X., McBride, J., Tesh, R., Barrett, A.D., and Wang, T. (2015). A West Nile virus NS4B-P38G mutant strain induces cell intrinsic innate cytokine responses in human monocytic and macrophage cells. *Vaccine* *33*, 869–878.
- Xu, R., Feng, X., Xie, X., Zhang, J., Wu, D., and Xu, L. (2012). HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both inhibiting occludin expression and cleaving occludin via matrix metalloproteinase-9. *Brain Res.* *1436*, 13–19.
- Xu, X., Song, H., Qi, J., Liu, Y., Wang, H., Su, C., Shi, Y., and Gao, G.F. (2016). Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *EMBO J.* *35*, 2170–2178.
- Yamshchikov, V.F., and 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*, 5765–5771.
- Yang, J., and al, (2002). Induction of Inflammation by West Nile virus Capsid through the Caspase-9 Apoptotic Pathway - Volume 8, Number 12—December 2002 - Emerging Infectious Disease journal - CDC.
- Yang, J., Zou, L., Hu, Z., Chen, W., Zhang, J., Zhu, J., Fang, X., Yuan, W., Hu, X., Hu, F., et al. (2013). Identification and characterization of a 43 kDa actin protein involved in the DENV-2 binding and infection of ECV304 cells. *Microbes Infect.* *15*, 310–318.
- Yeung, M.W., Shing, E., Nelder, M., and Sander, B. (2017). Epidemiologic and clinical parameters of West Nile virus infections in humans: a scoping review. *BMC Infect. Dis.* *17*.
- Yin, Y., Jiang, L., Fang, D., Jiang, L., and Zhou, J. (2013). Differentially Expressed Genes of Human Microvascular Endothelial Cells in Response to Anti-Dengue Virus NS1 Antibodies by Suppression Subtractive Hybridization. *Viral Immunol.* *26*, 185–191.
- Youn, S., Cho, H., Fremont, D.H., and Diamond, M.S. (2010). A Short N-Terminal Peptide Motif on Flavivirus Nonstructural Protein NS1 Modulates Cellular Targeting and Immune Recognition. *J. Virol.* *84*, 9516–9532.
- Youn, S., Li, T., McCune, B.T., Edeling, M.A., Fremont, D.H., Cristea, I.M., and Diamond, M.S. (2012). Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *J. Virol.* *86*, 7360–7371.

- Youn, S., Ambrose, R.L., Mackenzie, J.M., and Diamond, M.S. (2013). Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis. *Viol. J.* *10*, 339.
- Young, L.B., Balmori Melian, E., and Khromykh, A.A. (2013). NS1' Colocalizes with NS1 and Can Substitute for NS1 in West Nile Virus Replication. *J. Virol.* *87*, 9384–9390.
- Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C., and Halloran, W. (2000). An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* *38*, 1053–1057.
- Yu, L., Takeda, K., and Markoff, L. (2013). Protein–protein interactions among West Nile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells. *Virology* *446*, 365–377.
- Yu, L., Takeda, K., and Gao, Y. (2017). Characterization of virus-specific vesicles assembled by West Nile virus non-structural proteins. *Virology* *506*, 130–140.
- Zeller, H.G., and 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.* *23*, 147–156.
- Zhang, H.-L., Ye, H.-Q., Liu, S.-Q., Deng, C.-L., Li, X.-D., Shi, P.-Y., and Zhang, B. (2017). West Nile virus NS1 antagonizes interferon- β production by targeting RIG-I and MDA5. *J. Virol.* *JVI.02396-16*.
- Zhang, S., Li, L., Woodson, S.E., Huang, C.Y.-H., Kinney, R.M., Barrett, A.D.T., and Beasley, D.W.C. (2006). A mutation in the envelope protein fusion loop attenuates mouse neuroinvasiveness of the NY99 strain of West Nile virus. *Virology* *353*, 35–40.
- Zhang, W., Wu, J., Li, Y., Li, F., and Njoo, H. (2009). Rapid and Accurate In Vitro Assays for Detection of West Nile Virus in Blood and Tissues. *Transfus. Med. Rev.* *23*, 146–154.
- Zhang, Y., Kaufmann, B., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2007). Structure of Immature West Nile Virus. *J. Virol.* *81*, 6141–6145.
- Zhao, J., Vijay, R., Zhao, J., Gale, M., Diamond, M.S., and Perlman, S. (2016). MAVS Expressed by Hematopoietic Cells Is Critical for Control of West Nile Virus Infection and Pathogenesis. *J. Virol.* *90*, 7098–7108.
- Zhao, Y., Soh, T.S., Lim, S.P., Chung, K.Y., Swaminathan, K., Vasudevan, S.G., Shi, P.-Y., Lescar, J., and Luo, D. (2015). Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 14834–14839.

Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K.A., Shi, P.-Y., and Li, H. (2007). Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J. Virol.* *81*, 3891–3903.

Zou, G., Puig-Basagoiti, F., Zhang, B., Qing, M., Chen, L., Pankiewicz, K.W., Felczak, K., Yuan, Z., and Shi, P.-Y. (2009). 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.