



Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre les flavivirus neurotropes en médecine vétérinaire

Cécile Beck

► To cite this version:

Cécile Beck. Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre les flavivirus neurotropes en médecine vétérinaire. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS083 . tel-01810046

HAL Id: tel-01810046

<https://theses.hal.science/tel-01810046>

Submitted on 7 Jun 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.

NNT : 2017SACLS083

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE AU
LABORATOIRE DE L'UMR VIROLOGIE (ANSES, ENVA, INRA)

ECOLE DOCTORALE N° (569)
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat : Microbiologie

Par

Cécile Beck

**Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques
contre les flavivirus neurotropes en médecine
vétérinaire**

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 10 Mai 2017

Composition du Jury :

Dr, ESCLATINE Audrey	Professeur, Université PARIS-SUD	Présidente du jury
Dr, PAILLOT Romain	Chef d'Unité, Animal Health Trust	Rapporteur
Dr, MEYER, Gilles	Professeur, ENVT	Rapporteur
Mme, CAY, Ann Brigitte	Chef d'Unité, CODA CERVA	Examinatrice
Dr, LEBLOND, Agnès	Professeur, VETAGRO-SUP	Examinatrice
Dr, LEPARC-GOFFART, Isabelle	Chef d'Unité, IRBA	Examinatrice
Dr, ZIENTARA, Stéphan	Directeur d'UMR (ANSES)	Directeur de thèse
Dr, LECOLLINET, Sylvie	Chef d'équipe	Co-directrice de thèse

Heureux qui comme Ulysse

A fait un beau voyage

Heureux qui comme Ulysse

A vu cent paysages

Et puis a retrouvé après

Maintes traversées

Le pays des vertes années

(...)

Battus de soleil et de vent

Perdus au milieu des étangs

On vivra bien contents

Mon cheval, ma Camargue et moi

Mon cheval, ma Camargue et moi

Georges Brassens

REMERCIEMENTS

Je remercie très chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Messieurs Gilles Meyer et Romain Paillot d'avoir pris en charge la tâche de rapporteur. Merci également à Mesdames Ann Brigitte Cay, Audrey Esclatine, Agnès Leblond et Isabelle Leparc-Goffart d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit

Je tiens ensuite à remercier du fond du cœur mes encadrants :

Stéphan Zientara avec qui c'est un réel plaisir de travailler et qui l'air de rien, avec bonne humeur et une totale confiance (inconscience ?) vous propulse vers des objectifs au départ insoupçonnés de vous-même (une thèse universitaire à mon âge... quelle étrange idée !).

Sylvie Lecollinet qui est une coéquipière et une encadrante hors pair, toujours disponible enthousiaste et constructive dans les moments difficiles d'une thèse, tout en gérant mille autres projets en parallèle.

Merci à Pascal Boireau d'avoir accepté que je me lance dans cette aventure.

Merci à tous les collègues de l'UMR, de l'ANSES Maisons Alfort et Dozulé que je côtoie très agréablement au quotidien et surtout à notre petite équipe WNV avec Steeve, Céline, Jessy, Josiane et Audrey lors de son Master 2, qui ont tous apporté leur pierre à ce projet sans oublier Aurore qui a lutté sans relâche et dans la bonne humeur sur les antiviraux.

Une amicale pensée aux collègues du Laboratoire de référence de l'Union européenne maladies équine avec qui je partage la lourde tâche de faire vivre ce mandat.

Un petit clin d'œil à Sandra et Sandrine qui partagent mon bureau, mes questions métaphysiques et qui supportent mes involontaires et nombreux soupirs ainsi qu'à Benoit pour m'avoir éclairée en statistiques.

Un grand merci pour toutes les collaborations dont j'ai pu bénéficier, que ce soit à l'Institut Pasteur avec Philippe Desprès, Jessica Vanhomwegen, Marie-Pascale Frenkiel et Pierre-Olivier Vidalain qui m'ont tous épaulée à un moment ou l'autre de cette thèse mais aussi, au travers d'autres projets (ANVIE et OPIUM), à toutes les équipes qui y sont rattachées et qu'il serait trop long de nommer individuellement.

Enfin, un petit mot à ma famille car cette thèse fut aussi un travail d'équipe intrafamiliale.

A mes parents et à mon frère, qui m'ont inculqué le goût du changement et des nouveaux défis et un coup de chapeau en particulier à ma mère qui a traqué les fautes d'orthographe dans ce manuscrit pourtant abscons pour elle.

A Fabrice, mon pilier, mon socle, ma tendre moitié qui partage ma vie depuis plus de 20 ans (houlà !).

A Olivier et Daphné, ma nichée, qui ont supporté de me voir studieuse les week-ends et de manger très souvent « Picard » pendant 3 ans.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ABBREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES TABLEAUX	19
RESUME	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUCTION	23
1.1. Généralités sur les arbovirus émergents	23
1.2. Contexte épidémiologique actuel des <i>flavivirus</i> neurotropes en médecine vétérinaire	25
1.2.1. Classification	25
1.2.1.1. Classification moléculaire	25
1.2.1.2. Notion de sérocomplexe	26
1.2.2. Les <i>flavivirus</i> neurotropes	28
1.2.2.1. Vecteurs moustiques (<i>Culex</i>).....	28
1.2.2.1.1. Les <i>flavivirus</i> neurotropes présents en Europe.....	28
Le Virus West Nile (WNV)	28
Le virus Usutu (USUV).....	37
Le virus Bagaza (BAGV).....	40
1.2.2.1.2. Les <i>flavivirus</i> neurotropes à risque d'émergence en Europe.....	41
Le Virus de l'Encéphalite japonaise (JEV)	41
Le virus de l'Encéphalite de Saint Louis (SLEV).....	44
Le virus de Murray Valley (MVEV).....	45
1.2.2.2. Vecteurs tiques : <i>Ixodes</i>	46
Le virus de l'Encéphalite à tique (TBEV)	46
Le virus Louping ill (LIV)	50
1.3. Co-circulation, risque d'émergence et systèmes de surveillance des <i>flavivirus</i> en Europe ..	53
1.3.1. Co-circulation des <i>flavivirus</i> en Europe	53
1.3.2. Risque de résurgence et/ou d'émergence d'un nouveau <i>flavivirus</i> en Europe	54
1.3.2.1. Flavivirus déjà introduits dans l'UE	54
1.3.2.2. Analyse du risque d'introduction des JEV, SLEV ou MVEV dans l'UE	55
1.3.2.2.1. Introduction via un animal infecté	56

1.3.2.2.2.	Introduction via un vecteur infecté.....	56
1.3.3.	Différents systèmes de surveillance.....	57
1.4.	Aspects virologiques et cliniques des <i>flavivirus</i> : exemple du WNV	59
1.4.1.	Organisation du génome et biologie.....	59
1.4.1.1.	Le génome viral	59
1.4.1.1.1.	Les protéines structurales	60
1.4.1.1.2.	Les protéines non structurales	63
1.4.1.2.	Le cycle viral.....	65
1.4.2.	Infection des insectes, mammifères et oiseaux	66
1.4.2.1.	Insectes.....	66
1.4.2.2.	Mammifères	67
1.4.2.3.	Oiseaux	69
1.4.3.	Réponse antivirale de l'hôte vertébré : illustration avec le WNV	70
1.4.3.1.	L'immunité innée intrinsèque à la cellule	70
1.4.3.1.1.	Principes généraux de la stimulation et régulation de la voie IFN type I.....	71
1.4.3.1.1.1.	Récepteurs cellulaires TLR et RLR et synthèse des IFN de type I	71
1.4.3.1.1.2.	Amplification de la réponse IFN de type I	72
1.4.3.1.1.3.	Régulation de la réponse IFN de type I	73
1.4.3.1.2.	Stratégies d'évasion du WNV au système immunitaire inné de la cellule	74
1.4.3.1.2.1.	Inhibition de la réponse IFN	74
1.4.3.1.2.2.	Conséquences sur la virulence des souches de WNV	75
1.4.3.2.	Interface entre l'immunité innée et adaptative.....	75
1.4.3.2.1.	Les cellules spécialisées de l'immunité innée et le système du complément ...	75
1.4.3.2.1.1.	Les cellules spécialisées de l'immunité innée	75
1.4.3.2.1.2.	Le système du complément	76
1.4.3.2.2.	Stratégies d'évitement de l'activation du complément par le WNV	76
1.4.3.3.	L'immunité adaptative	77
1.4.3.3.1.	L'Immunité humorale :.....	77
1.4.3.3.2.	Immunité cellulaire	79
1.5.	Outils pour le diagnostic de l'infection	81
1.5.1.	Détection du virus	81
1.5.1.1.	Isolement viral	81
1.5.1.2.	Détection de l'ARN viral	81
1.5.1.3.	Détection des antigènes viraux	82

1.5.2.	Tests sérologiques	83
1.5.2.1.	Tests de séroneutralisation virale	83
1.5.2.2.	Tests d'inhibition de l'Hémagglutination (HIT).....	84
1.5.2.3.	Immunofluorescence indirecte (IFI)	84
1.5.2.4.	ELISA	84
1.5.2.4.1.	ELISA classiques.....	84
1.5.2.4.2.	Développement d'ELISAs IgG plus spécifiques.....	88
1.5.2.5.	Tests sérologiques multiplexes.....	90
1.5.2.5.1.	Méthodes multiplexes miniaturisées d'ELISA ou d'IFI	90
1.5.2.5.2.	Méthodes multiplexes sur billes	90
1.6.	Modalités de lutte contre les <i>flavivirus</i> d'intérêt en médecine équine.....	93
1.6.1.	La vaccination	93
1.6.2.	Traitements	94
1.6.2.1.	Traitements symptomatiques	94
1.6.2.2.	Principales molécules antivirales candidates en thérapeutique contre le WNV ..	95
1.6.2.2.1.	Molécules antivirales d'origine biologique	95
1.6.2.2.2.	Molécules antivirales d'origine chimique	96
	MANUSCRIT N°1 : <i>Flaviviruses</i> in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease	101
2.	OBJECTIFS	103
3.	TRAVAIL EXPERIMENTAL	105
3.1	Projet de thèse et résultats.....	105
3.1.1.	Nouvelles stratégies diagnostiques pour les <i>flavivirus</i> neurotropes en médecine vétérinaire	105
3.1.1.1.	Outils de diagnostic sérologique classique simplexe pour le diagnostic du WNV chez les chevaux.....	105
3.1.1.1.1.	Présentation du manuscrit N°2	105
	Manuscrit N°2 : Améliorer les outils de diagnostic sérologique en Europe pour le diagnostic sérologique du WNV chez les chevaux.....	107
3.1.1.1.2.	Discussion et conclusion.....	109
3.1.1.2.	Outils de diagnostic sérologique multiplexe : application de la méthode MIA au sérodagnostic des flavivirus neurotropes chez les chevaux.....	110
3.1.1.2.1.	Présentation du manuscrit N°3	110
	Manuscrit N°3 : Application de la méthode d'immuno-essais sur billes au sérodagnostic des <i>flavivirus</i> responsables de maladies neurologiques chez les chevaux	115
3.1.1.2.2.	Discussion et conclusion.....	117

3.1.1.2.3.	Données complémentaires : faire face à l'émergence de nouveaux <i>flavivirus</i>	118
3.1.1.2.3.1.	Contexte	118
3.1.1.2.3.2.	Résultats	119
3.1.1.2.3.3.	Discussion et conclusion	121
3.1.1.3.	Outils de diagnostic sérologique multiplexe : application de la méthode MIA au sérodiagnostic du LIV chez les ovins	121
3.1.1.3.1.	Matériel et méthodes	122
3.1.1.3.1.1.	Production des protéines recombinantes LIV et BAGV	122
3.1.1.3.1.2.	Sérums terrains	126
3.1.1.3.1.3.	Méthode MIA	126
3.1.1.3.1.4.	Méthode ELISA	126
3.1.1.3.2.	Résultats	127
3.1.1.3.2.1.	Expression et purification des protéines recombinantes	127
3.1.1.3.2.2.	Utilisation de la méthode MIA pour le diagnostic LIV	128
3.1.1.3.3.	Discussion et conclusion	130
3.1.1.4.	Approche sérologique multiplexe pour la mise en place d'un diagnostic DIVA	131
3.1.1.4.1.	Contexte	131
3.1.1.4.2.	Résultats	132
3.1.1.4.2.1.	Résultats ELISA	132
3.1.1.4.2.2.	Résultats avec la méthode MIA	133
3.1.1.4.3.	Discussion et conclusion	136
3.1.2.	Nouvelles stratégies thérapeutiques	139
3.1.2.1.	Concept	139
3.1.2.2.	Matériel et méthode	141
3.1.2.2.1.	Lignée cellulaire	141
3.1.2.2.2.	Virus	141
3.1.2.2.3.	Molécules	142
3.1.2.2.4.	Tests de viabilité cellulaire	142
3.1.2.2.5.	Inhibition de la réplication virale évaluée par quantification du génome viral et par titrage	143
3.1.2.3.	Résultats	145
3.1.2.3.1.	Le sr1057 inhibe l'infection à CHIKV sur cellules HEK293T	145
3.1.2.3.2.	Le sr1057 inhibe l'infection à JEV sur cellules HEK293T	152
3.1.2.3.3.	Le sr1057 a une activité modeste sur la réplication du WNV	155
3.1.2.4.	Discussion et conclusion	158

3.2	Discussion générale et perspectives	161
3.2.1	Nouvelles stratégies diagnostiques des <i>flavivirus</i> neurotropes.....	161
3.2.1.1	Diagnostic des flavivirus neurotopes par méthode MIA.....	161
3.2.1.2	MIA et vaccination.....	164
3.2.2	Nouvelles stratégies thérapeutiques des flavivirus neurotropes.....	166
	BIBLIOGRAPHIE	169
	ANNEXES 1 : Articles.....	185
	ANNEXES 2 : Publications, posters et présentations	187

TABLE DES ABBREVIATIONS

A

AA	Acide aminé
AcN	Anticorps neutralisants
AcM	Anticorps monoclonaux
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
ARN	Acide ribonucléique
ARS	agences régionales de santé
ATP	Adénosine triphosphate

B

BAGV	Bagaza virus (virus Bagaza)
BHE	Barrière hémato encéphalique

C

CC ₅₀	Cytotoxicité 50
CCL	C-chemokine ligand 2
CERMN	Centre d'Etudes et de Recherche du Médicament de Normandie
CHIKV	Chikungunya virus (virus du Chikungunya)
CHIKV/Ren	Virus du Chikungunya exprimant la luciférase Renilla
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CP	Contrôle positif
CT	Cycle Threshold (cycle seuil)

D

DENV	Dengue virus (virus de la dengue)
DDPP	Directions départementales de la protection des populations
DGAI	Direction générale de l'alimentation
DGS	Direction générale de la santé
DHODH	Dihydroorotate déshydrogénase
DIII	Domaine III
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals (test différenciant les animaux infectés des vaccinés)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde

E

sE : Forme soluble de la Glycoprotéine d'enveloppe (E)
 ECDC European Centre for Disease Control (Centre européen pour le contrôle des maladies)
 ECP Effet cytopathique
 EDIII Domaine III de la glycoprotéine E
 EID Entente Interdépartementale de Démoustication
 EILA Essai InterLaboratoire d'Aptitude
 EJ Encéphalite japonaise
 ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Test Immuno-Enzymatique)

F

Fc Fraction cristallisable d'un anticorps

G

GTP Guanosine triphosphate

H

HVE1 herpès virus équin de type 1
 HEK293T Human embryonic kidney 293T (cellules rénales embryonnaires humaines qui expriment l'antigène T du virus simien 40, SV40)
 HIT Hemagglutination-inhibition test (Test d'Inhibition de l'Hémagglutination)

I

IC₅₀ Inhibitory concentration 50 (Concentration inhibitrice 50)
 IFCE Institut Français du cheval et de l'équitation
 IFI Immunofluorescence indirecte
 IFN Interféron
 IFNAR Interferon- α/β receptor (récepteur à l'interféron α/β)
 IgG Immunoglobuline de classe G
 IgM Immunoglobuline de classe M
 IMPDH Inosine monophosphate déshydrogénase
 InVs Institut national de Veille Sanitaire, renommé Santé Publique France depuis 2016
 IP Institut Pasteur
 IRBA Institut de recherche biomédicale des armées
 IRF IFN regulated factor (facteur régulé par l'IFN)
 ISG IFN stimulated gene (gène stimulé par l'IFN)
 ISRE IFN Stimulated Response Elements (Eléments de réponse à la stimulation de l'IFN)

J

JEV Japanese encephalitis virus (virus de l'encéphalite japonaise)

K

KUNV Kunjin virus (Virus Kunjin)
 KFDV Kyasanur Forest disease virus (virus de la maladie de la forêt de Kyasanur)

L

LIV	Louping ill virus (Virus louping ill)
LCR	Liquide céphalo rachidien
LCs	cellules de Langerhans
LNR	Laboratoire national de référence
LRUE	Laboratoire de Référence de l'Union Européenne

M

MAC ELISA	IgM antibody-capture ELISA (ELISA de capture des anticorps IgM)
MAD78	virus West Nile, souche Madagascar 78
MDA5	Melanoma-differentiation associated gene 5
MEABV	Meaban virus (virus Meaban)
MV	Measles virus (virus de la rougeole)
MIA	Microsphere-based immunoassays (immuno-essais sur billes)
MVEV	Murray valley encephalitis virus (virus de l'encéphalite de la Murray valley)
MyD88	Myeloid differentiation factor 88

N

NC	Nouvelle Calédonie
NF-kB	Nuclear factor kappa B (facteur nucléaire kappa B)
NK	Natural killer
NKV	No known vector
NS	protéine non structurale

O

OHFV	Omsk haemorrhagic fever virus (Virus de la fièvre hémorragique d'Omsk)
OIE	Organisation Mondiale de la Santé Animale (ex-Office international des épizooties)

P

PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
pi	post infection
PFU	Plaque forming unit (unité formant plaque)
POWV	Powassan virus (virus Powassan)
PKR	Protéine kinase R
PM	Poids moléculaire
pMT	promoteur de la Métallothionéine
PNNs	Polynucléaires neutrophiles
PRNT	Plaque reduction neutralization test (Test de Neutralisation par Réduction des Plages de Lyse)
PRRs	Pathogen recognition receptors (récepteurs de reconnaissance des pathogènes)

R

RE	Réticulum endoplasmique
----	-------------------------

RESPE Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Equine
 RIG1 Retinoic acid inducible gene 1 protein
 RLR RIG1-like receptor
 rMV2/Luc Virus de la rougeole recombinant exprimant la luciférase de luciole (firefly)
 RSV Respiratory syncytial virus (virus respiratoire syncytial)
 RT Reverse Transcriptase (transcriptase inverse)

S

SAPE Streptavidin-R-Phycoerythrin (Streptavidine-R-Phycoérythrine)
 Se Sensibilité
 SLEV Saint Louis Encephalitis virus (virus de l'encéphalite de Saint Louis)
 SNC Système nerveux central
 SNT Séroneutralisation
 Sp Spécificité
 SVF Sérum de veau fœtal

T

TX02 Virus West Nile, souche Texas 2002
 TBE Tick borne encephalitis (encéphalite à tique)
 TBEV Tick borne encephalitis virus (virus de l'encéphalite à tique)
 TCID₅₀ Tissue culture infective dose 50 (dose infectant 50 % des cellules)
 TLR Toll-like receptor
 TNF Tumor necrosis factor (facteur de nécrose tumorale)
 Treg Lymphocyte T régulateur
 TRIF TIR-domain-containing adaptor inducing IFN β
 TYUV Tyuleniy virus (virus Tyuleniy)

U

UE Union Européenne
 USUV Usutu virus (virus Usutu)

W

WNND West Nile neuroinvasive disease (maladie neuro-invasive à WNV)
 WNF West Nile fever (fièvre West Nile)
 WNV West Nile Virus (virus West Nile)

Y

YFV Yellow fever virus (virus de la fièvre jaune)

Z

ZIKV Zika virus (virus Zika)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Comparaison des séquences génétiques complètes de différents <i>flavivirus</i> et regroupement en fonction de leur vecteur.	26
Figure 2 : Cycle de transmission du virus West Nile[25]	29
Figure 3 : Distribution du WNV dans le monde avec focus sur l'Europe en 2016 (source : Pubmed) ..	30
Figure 4 : Représentation de l'introduction des souches WNV en Europe.....	32
Figure 5 : Arbre phylogénétique établi à partir du séquençage du génome complet de différentes souches virales de WNV (seules 5 lignées ont été représentées).....	34
Figure 6 : Titre viral dans le sérum (en log PFU/ml) après infection expérimentale de différents groupes d'oiseaux [48]	35
Figure 7 : Représentation des différents couloirs migratoires des oiseaux sauvages dans le monde [59]	38
Figure 8 : Pays européens en 2016 avec le virus USUV isolé sur oiseaux et/ou moustiques et pays ayant détecté des réactions sérologiques positives à l'USUV chez des oiseaux ou des mammifères..	39
Figure 9 : Distribution du JEV en Asie (2016).	41
Figure 10 : cycle de transmission du JEV [81].....	42
Figure 11: Représentation de la répartition des différents génotypes de JEV en Asie	43
Figure 12: Distribution géographique d' <i>Ixodes spp</i>	47
Figure 13 : Cycle de transmission de TBEV [81]	49
Figure 14: Carte de répartition du LIV en Europe (2016).	50
Figure 15 : Représentation de l'aire de circulation des principaux <i>flavivirus</i> trouvés en Europe.....	54
Figure 16: Représentation schématisée de la structure des particules de <i>flavivirus</i>	60
Figure 17: Représentation schématisée de la particule de <i>flavivirus</i> et de la protéine E	62
Figure 18 : Localisation des AA307 et AA330 (E307 et E330) sur la glycoprotéine E du WNV dont les mutations sont associées à l'échappement du virus aux anticorps monoclonaux neutralisants [149]	63
Figure 19: Cycle de réplication virale des flavivirus.	66
Figure 20 : différentes étapes de transport du <i>flavivirus</i> dans le moustique	67
Figure 21 : Etapes précoces de l'infection virale après piqûre par un arthropode hématophage [174]	67
Figure 22 (a) Représentation schématisée du cerveau et (b) agrandissement de la barrière hémato-encéphalique (d'après https://tpeoem.wordpress.com/effet_sur_lhomme/).	68
Figure 23 : Moelle allongée d'un cheval mort de WND pendant l'épidémie 2015 en Camargue	69
Figure 24: Représentation schématisée de la réponse antivirale innée au niveau cellulaire et boucle d'amplification de l'IFN- α/β , adapté de [201].....	73
Figure 25: Mécanismes d'évasion du WNV au système immunitaire inné de l'hôte [201, 202].	74
Figure 26: Cinétique de la virémie, de l'excrétion virale (virurie) et des anticorps IgM et IgG au cours de l'infection par le WNV (aimablement fourni par Isabelle Leparc-Goffart).....	78
Figure 27: Schéma synthétique de la réponse immunitaire innée et adaptative lors d'une infection à WNV	80
Figure 28: (A) Principaux tests sérologiques utilisés pour le diagnostic des <i>flavivirus</i> (B) Principe de trois différentes méthodes d'ELISA	88
Figure 29 : Principes de la méthode Luminex.	91
Figure 30: Mécanismes antiviraux de la ribavirine [311]	97
Figure 31 : Algorithme décisionnel pour l'identification du WNV ou JEV par méthode MIA	112

Figure 32: Représentation schématique du plasmide vecteur.	123
Figure 33 : Schéma de la transfection des plasmides d'intérêt en cellules de drosophile S2 (Audrey Gabassi)	125
Figure 34 : Vérification de la production des protéines SNAP-BAGV.EDIII et SNAP-LIV.EDIII par Western-Blot.	127
Figure 35 : Compte rendu de la purification des protéines recombinantes établi par la plateforme PF5 de l'IP	128
Figure 36 : Courbes ROC calculées pour la détection d'anticorps spécifiques de LIV par méthode MIA dans les sérums ovins précaractérisés en HIT.	129
Figure 37 : Courbes ROC calculées pour la détection d'anticorps anti-NS1 WNV par méthode MIA sur des sérums de chevaux naturellement infectés et précaractérisés en ELISA de compétition WNV ..	134
Figure 38 : Représentation des résultats de fluorescence MIA de la bille WNV.NS1 pour les chevaux vaccinés respectivement avec le vaccin Zoétis et Merial. Seuil de positivité de la bille WNV.NS1 = 3	135
Figure 39 : Effet antiviral du composé sr1057 sur la réplication de rMV2/Luc et du CHIKV/Ren (A) Structure chimique du sr1057. (B)	140
Figure 40 : Protocole du test de viabilité cellulaire des cellules HEK 293T avec différentes molécules antivirales	143
Figure 41 : résumé du protocole d'infection des cellules HEK293T par CHIKV, JEV ou WNV	144
Figure 42 : Inhibition de l'infection CHIKV des cellules HEK293T (distribuées à J0) par l'ajout d'antiviraux.....	147
Figure 43 : Titrage de l'infection CHIKV des cellules HEK293T à J2 pi en présence de différents antiviraux (cellules HEK distribuées à J0).	148
Figure 44 : test de viabilité cellulaire avec mesure de la luminescence à 0 heure (témoin cellules), 24 et 48 heures après dépôt des différents composés antiviraux sur des cellules HEK293T distribuées concomitamment dans le puits.	149
Figure 45 : Inhibition de l'infection CHIKV des cellules HEK293T distribuées à J-1 par l'ajout d'antiviraux.....	151
Figure 46 : test de viabilité cellulaire avec mesure de la luminescence à 24 et 48 heures après dépôt des différents composés sur des cellules HEK293Tensemencées 24 heures avant traitement.	152
Figure 47 : Inhibition de l'infection JEV des cellules HEK293T distribuées à J0 par l'ajout d'antiviraux	153
Figure 48 : Titrage de l'infection JEV des cellules HEK293T à J2 pi en présence de différents antiviraux (cellules HEK distribuées à J0).	154
Figure 49 : Inhibition de l'infection JEV des cellules HEK293T distribuées à J-1 par l'ajout d'antiviraux	155
Figure 50 : Inhibition de l'infection WNV des cellules HEK293T distribuées à J0 par l'ajout d'antiviraux	156
Figure 51 : Titrage de l'infection WNV des cellules HEK293T à J2 pi en présence de différents antiviraux (cellules HEK distribuées à J0).	157
Figure 52 : Comparaison du pourcentage de réduction de l'ARN viral du WNV sur cellules déposées à J-1 ou J0 avant traitement par le sr1057.....	158
Figure 53 : Visualisation des cellules HEK293T incubées depuis 48 heures avec du sr1057 à 5, 10 et 20µg ou du DMSO et infectées avec CHIKV à 0.0001 MOI au microscope optique.....	159
Figure 54 : Méthode MIA par biotinylation des antigènes	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux <i>flavivirus</i> neurotropes vectorisés par des moustiques ou des tiques en médecine vétérinaire	27
Tableau 2 : Description des vaccins équins WNV ayant une AMM européenne et des vaccins JEV commercialisé dans l'espèce équine uniquement au Japon.....	94
Tableau 3 : Pourcentage d'homologie en AA des rEDIII du WNV (AY033389.1), JEV (FJ979830.1) et TBEV (AY268437.1).....	111
Tableau 4 : Identification des <i>flavivirus</i> circulant en Nouvelle-Calédonie par méthode MIA et SNT .	119
Tableau 5 : Bilan des analyses par séroneutralisation DENV1, ZIKV et WNV.....	120
Tableau 6 : Souches choisies pour la synthèse des EDIII des virus BAGV et LIV.	122
Tableau 7: Identification d'anticorps ovins anti-LIV par 3 techniques différentes (HIT LIV, ELISA compétition (ID Screen® West Nile competition kit) et MIA LIV)	130
Tableau 8: Résultats ELISA (kit ID Screen® West Nile competition kit) obtenus sur des chevaux vaccinés avec les vaccins Proteq® West Nile (Merial) et Equip® WNV (Zoétis).....	133
Tableau 9: Bilan des résultats obtenus par MIA sE/EDIII/NS1 WNV sur des chevaux infectés ou vaccinés contre le WNV.....	135

RESUME

Les *flavivirus* ayant un impact en médecine vétérinaire sont largement distribués dans le monde (à l'exemple de la fièvre West Nile (WNV) présente sur les cinq continents ou de l'Encéphalite japonaise (EJ) en Asie) et sont responsables de maladies à dominante neurologique chez l'homme et/ou le cheval.

La virémie étant généralement brève lors de ces infections virales, les méthodes de diagnostic utilisées sont essentiellement sérologiques. Or le chevauchement fréquent des aires de répartition des *flavivirus* complique le diagnostic sérologique. En effet, des réactions sérologiques croisées entre *flavivirus* sont observées lors de l'utilisation de méthodes de diagnostic usuelles telles que l'ELISA et l'immunofluorescence (IF). Les résultats sérologiques doivent donc être confirmés par la méthode fastidieuse de séroneutralisation (SNT) virale avec les différents *flavivirus* existants dans la région. De plus, le risque d'émergence sur un territoire donné de nouveaux *flavivirus*, comme le virus Zika au Brésil ou en Amérique du Nord, ne peut être exclu.

Nous avons donc développé dans la première partie de ce travail une nouvelle stratégie de diagnostic sérologique multiplexe à l'aide de la méthode d'immuno-essai (MIA) sur billes. Sachant que la glycoprotéine d'enveloppe soluble (sE) des *flavivirus* est divisée en 3 domaines (D) structuraux, DI, DII et DIII et que les épitopes du DIII sont spécifiques de chaque *flavivirus*, des protéines EDIII recombinantes de différents *flavivirus* d'intérêt ont été synthétisées en système d'expression *Drosophila* S2 et leur antigénicité a été testée sur sérums équins et ovins. Nous avons obtenu des résultats très encourageants en démontrant que l'utilisation des EDIII, associée à la capacité de multiplexage de la méthode MIA, apparaît comme une réponse adaptée au défi du diagnostic sérologique des infections à *flavivirus*.

Nous avons en outre utilisé la même méthode de multiplexage mais avec des antigènes NS1 du WNV pour mettre en place un test DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) permettant de différencier les chevaux infectés par le WNV des chevaux vaccinés avec un vaccin recombinant WNV.

Un autre écueil en médecine vétérinaire est le traitement des affections à *flavivirus*. En effet l'arsenal thérapeutique est limité et le traitement est avant tout symptomatique. Nous avons dans la seconde partie de ce travail testé *in vitro* une molécule antivirale à large spectre, le sr1057 sur nos virus d'intérêt (WNV et JEV). Cette molécule qui provient d'une stratégie de criblage développée par l'Institut Pasteur a probablement pour cible la cellule de l'hôte car elle est capable d'inhiber des virus très différents, à génome à ARN de polarité positive ou négative et ADN.

Les résultats que nous avons obtenus avec ce composé sont en demi-teinte pour les *flavivirus* testés avec une efficacité démontrée pour le JEV mais plus modeste pour le WNV. Ils n'excluent cependant pas une possible utilisation de cet antiviral en médecine vétérinaire équine car une activité inhibitrice *in vitro* sur les virus de l'Herpes équin de type I et de l'artérite virale a été confirmée par d'autres collaborateurs.

ABSTRACT

Flaviviruses with a major impact in veterinary medicine are widely distributed (e.g. West Nile fever (WNV) has spread across the five continents and Japanese Encephalitis (JE) is reported in South-East Asia) and are mainly responsible for neurological diseases in humans and/or horses.

After *flavivirus* infection, viremia in mammal hosts is generally short and consequently indirect methods are mostly used to diagnose *flavivirus* infections. However, frequent spatial overlapping in their circulation areas renders the interpretation of serological assays difficult. Indeed, cross-reactions between *flaviviruses* are observed in rapid serological tests such as in ELISA and immunofluorescence assays (IFA). Serological assay results should thus be confirmed by the tedious comparative virus neutralization test (VNT) using a panel of viruses known to circulate in the area. Moreover, the risk of emergence of new *flaviviruses* such as reported recently with the Zika virus in Brazil or in North America should be considered when studying *flavivirus* epidemiology.

In the first section, a new strategy aiming at improving the serological diagnosis of *flavivirus* infections was developed using the multiplexing capacity of microsphere immunoassays (MIA). The *flavivirus* soluble envelope (sE) glycoprotein ectodomain is composed of three domains (D), e.g. DI, DII and DIII, with EDIII containing virus-specific epitopes. Recombinant EDIIIs of different *flaviviruses* were synthesized in the *Drosophila* S2 expression system. The microspheres coupled with rEDIIIs were assayed with equine and ovine sera from natural and experimental *flavivirus* infections or non-immune samples. Very encouraging results have been obtained and this innovative multiplex immunoassay based on flavivirus rEDIIIs appears to be a powerful alternative to ELISAs and VNTs for veterinary diagnosis of *flavivirus*-related diseases.

MIA with WNV nonstructural 1 protein were also implemented to differentiate Infected from Vaccinated Animals (DIVA). Such a DIVA approach was only successful when horses had been immunized with a recombinant canarypox vaccine, while horses receiving inactivated WNV vaccine developed immune responses close to the ones induced after natural infection.

Another pitfall in veterinary medicine is the lack of therapeutics for viral diseases and specifically for *flaviviruses*. The therapeutic arsenal is indeed rather limited and animals are generally administered supportive treatments only. In the second part, the results of the in vitro testing of a broad spectrum antiviral named sr1057 on WNV and JEV replication are presented. This chemical, identified from a unique screening strategy developed by Pasteur Institute, is probably targeting the host cell and was found to inhibit the replication of varied RNA and DNA viruses belonging to different virus families. The sr1057 compound was not as efficient at inhibiting the replication of *flaviviruses* as for other RNA+ viruses, with a modest antiviral effect demonstrated for WNV and a higher efficacy on JEV. This antiviral presents however potentials for applications in equine veterinary medicine because it efficiently inhibited equine herpes virus-1 and equine arteritis virus in vitro, as clearly shown by other collaborators.

1. INTRODUCTION

1.1. Généralités sur les arbovirus émergents

Des émergences de maladies humaines et animales sont régulièrement notifiées par les organismes de santé publique : le virus de l'immunodéficience humaine dans les années 1980 au niveau mondial, le virus Schmallenberg en 2011 en Allemagne, le virus Ebola en Afrique de l'Ouest en 2013 ou encore le virus Zika au Brésil en 2015. Le terme « émergence » peut être employé pour 4 cas de figure :

- ✓ Une infection nouvellement apparue ou identifiée, causée par un micro-organisme connu ou auparavant inconnu ;
- ✓ La réapparition ou l'augmentation de l'incidence d'une infection connue dans un espace ou un groupe de population donné; on parle alors d'infection « résurgente » ou ré-émergente ;
- ✓ Une modification qualitative et/ou quantitative des caractéristiques de l'agent (résistance, virulence), de l'infection (nouveaux réservoirs) ou de la population touchée (modification du spectre d'hôte) et de son environnement ;
- ✓ Un syndrome inexpliqué dont le diagnostic définitif nécessite de nouvelles connaissances techniques ou scientifiques [1, 2].

Environ 75% des maladies infectieuses ayant récemment émergé et qui affectent les hommes sont des maladies d'origine animale [3] avec un réservoir dans la faune sauvage [4, 5]. On compte parmi elles les maladies vectorielles qui sont des maladies infectieuses transmises par des vecteurs, le plus souvent des arthropodes piqueurs et hématophages, qui assurent une transmission active d'un agent infectieux d'un animal vertébré à un autre. On distinguera :

- les vecteurs « biologiques » capables de multiplier ou de transformer les agents pathogènes (ex. moustiques et virus West Nile (WNV), tiques et *Borrelia burgdorferi*, bactérie responsable de la maladie de Lyme)
- les vecteurs « mécaniques » assurant le transport passif de l'agent pathogène (ex. taons et virus de l'anémie infectieuse des équidés)

Les vecteurs sont capables de transmettre des micro-organismes (agents viraux, bactériens ou parasitaires) présents dans le sang ou le derme d'un hôte infecté à un nouvel hôte vertébré.

Les arboviroses, infections virales à transmission vectorielle, sont plus fréquentes que les infections vectorielles bactériennes et parasitaires et leur fréquence ne cesse d'augmenter (40% des virus capables d'infecter les mammifères sont transmis par des arthropodes [6]).

Elles ont tendance à s'étendre vers de nouveaux territoires du fait de différents facteurs liés à l'évolution des activités humaines (réchauffement climatique dû à l'activité humaine, augmentation du trafic aérien, déforestation favorisant le contact entre l'homme et la faune sauvage...)[7]. Les récentes épidémies associées aux virus Zika en Amérique du Sud ou Chikungunya dans l'océan Indien ou les épizooties/épidémies impliquant le WNV en Amérique du Nord ou en Europe [8] illustrent les sévères conséquences que génèrent les émergences de virus à transmission vectorielle à la fois pour la santé publique et la santé animale. L'exemple de l'épidémie actuelle de Zika au Brésil, virus très proche génétiquement et antigéniquement du virus isolé en Polynésie française en 2013 et ayant probablement été introduit en Amérique du Sud à la faveur d'événements internationaux, constitue un des exemples récents les plus significatifs d'arbovirose émergente impliquant un *flavivirus* et ayant circulé très rapidement d'un continent à l'autre [9-11].

Un grand nombre de virus à acide ribonucléique (ARN) comme par exemple les *flavivirus* parmi les *Flaviviridae*, les *orbivirus* parmi les *Reoviridae* ou les *alphavirus* parmi les *Togaviridae*, sont transmis par des vecteurs. Cette constatation suggère que la stratégie de transmission vectorielle des virus à ARN est apparue à plusieurs reprises au cours de l'évolution des virus à ARN [9]. A contrario, un seul virus à acide désoxyribonucléique (ADN), le virus de la peste porcine africaine, est dénombré parmi les arbovirus. Cette dernière observation semble indiquer que les virus à ARN ont pu s'adapter à des cycles alternés de réplication dans les hôtes vertébrés et invertébrés du fait de leur plus grande plasticité génomique (taux de mutation élevé).

En santé animale, les maladies vectorielles peuvent faire l'objet d'une réglementation spécifique quand elles constituent des risques sanitaires majeurs et/ou des obstacles aux échanges internationaux d'animaux. La fièvre West Nile (WNF) ou l'encéphalite japonaise (EJ) font partie en France des maladies inscrites sur la liste des dangers sanitaires de catégorie 1 qui sont mentionnés dans l'article L.201-1 du code rural et de la pêche maritime (Ordonnance n°2011-862 du 22 juillet 2011). De plus, au niveau international, WNF et EJ sont inscrites dans le code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) et les foyers doivent obligatoirement être notifiés à cet organisme.

1.2. Contexte épidémiologique actuel des *flavivirus* neurotropes en médecine vétérinaire

1.2.1. Classification

1.2.1.1. Classification moléculaire

On compte plus de 53 espèces dans le genre *flavivirus* [12]. La majorité des virus identifiés dans ce genre sont des arbovirus transmissibles à l'homme. Le séquençage complet du génome viral permet de regrouper les *flavivirus* en fonction de leurs vecteurs et trois groupes distincts ont été identifiés : les virus transmis par les moustiques, ceux transmis par les tiques et ceux dont le vecteur est non connu (NKV) [13, 14]. Le comité de taxonomie des virus a défini 27 *flavivirus* transmis par les moustiques, 12 transmis par les tiques et 14 pour le groupe NKV [15] (figure 1).

Le groupe des virus transmis par les moustiques peut être subdivisé en deux clades (*Aedes* et *Culex*) qui se distinguent aussi par leur hôte vertébré et leur pathogénèse. Les virus du clade *Culex* ont un réservoir aviaire, sont neurotropes et causent fréquemment des méningo-encéphalites. Les virus du clade *Aedes* ont un réservoir primate et sont responsables dans la plupart des cas de maladies hémorragiques. Cette différence de réservoir peut s'expliquer par les comportements alimentaires différents entre les moustiques *Culex* et *Aedes*. En effet, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, principaux vecteurs de la Dengue ou du Zika, sont des moustiques anthropophiles bien adaptés à l'environnement urbain alors que *Culex pipiens* et *Culex modestus*, vecteurs du virus West Nile (WNV) sont des vecteurs à préférences trophiques larges pouvant piquer les oiseaux et de nombreux hôtes mammifères [16].

Les virus transmis par les tiques sont également subdivisés en deux groupes : ceux circulant au sein des oiseaux marins et dont les vecteurs sont des tiques molles et ceux transmis par des tiques dures (genre *Ixodes*) avec un réservoir rongeur et qui sont généralement responsables d'encéphalites chez l'homme et l'animal. Le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk (OHFV) et le virus des forêts de Kyasanur (KDFV), responsables de fièvres hémorragiques, font office d'exception dans ce groupe [13].

Un dernier groupe regroupe les *flavivirus* NKV. Il peut être subdivisé en 2 sous-groupes circulant soit chez des chauves-souris soit chez des rongeurs [13].

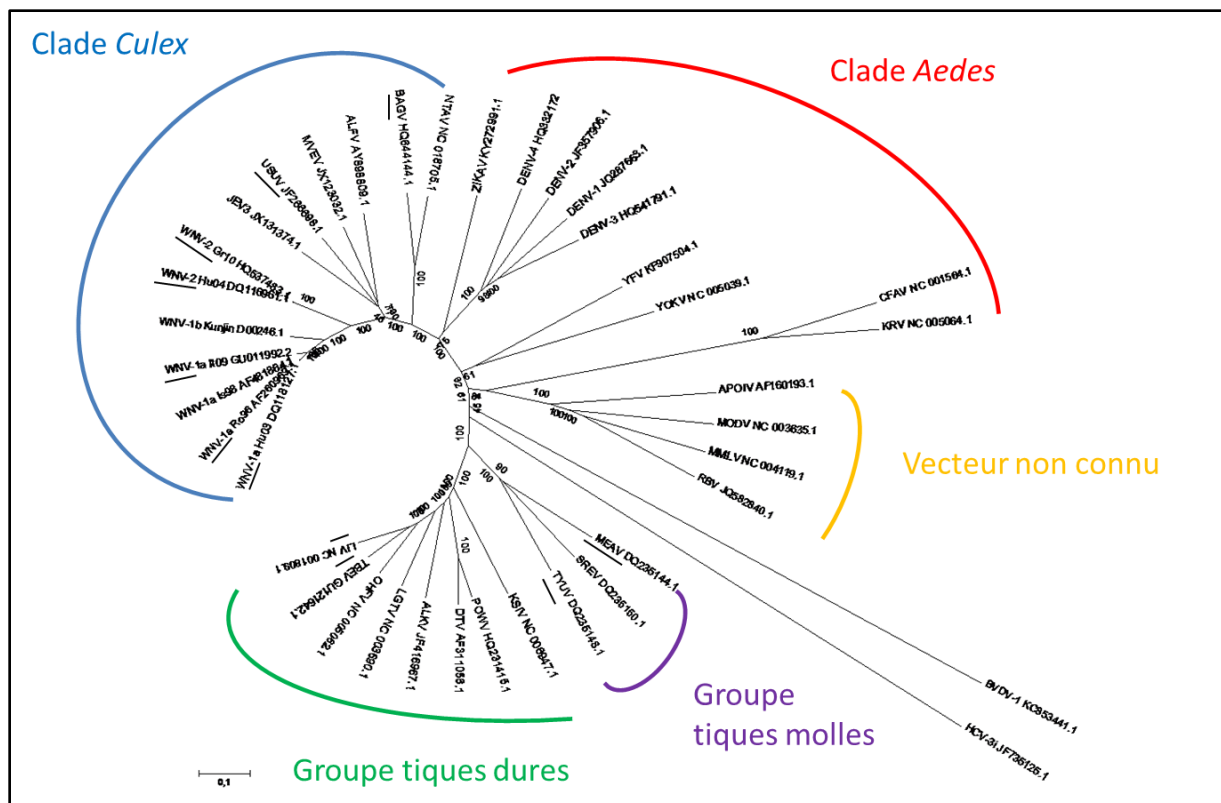


Figure 1 : Comparaison des séquences génétiques complètes de différents *flavivirus* et regroupement en fonction de leur vecteur.

L'identifiant GenBank des séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique est indiqué sur chaque branche de l'arbre. WNV : West Nile virus, JEV : Japanese encephalitis virus, USUV : Usutu virus, MVEV : Murray Valley encephalitis virus, ALFV : Alfuy virus, BAGV : Bagaza virus, NTAV : Ntaya virus, ZIKAV : Zika virus, DENV : Dengue virus, YFV : Yellow Fever virus, YOKV : Yokose virus, CFAV : Cell Fusing Agent virus, KRV : Kamiti River virus, APOIV : Apoi virus, MODV : Modoc virus, MMLV : Montana Myotis Leukoencephalitis virus, RBV : Rio Bravo virus, MEAV : Meaban virus, SREV : Saumarez Reef virus, TYUV : Tyuleniy virus, KSIV : Karshi virus, POWV : Powassan virus, DTV : Deer Tick virus, ALKV : Alkhurma virus, LGTV : Langat virus, OHFV : Omsk Hemorrhagic Fever virus, TBEV : Tick-Borne encephalitis virus, LIV : Louping Ill virus. 2 groupes externes ont été utilisés pour enraciner l'arbre phylogénétique, HCV pour Hepatitis C virus (genre *Hepacivirus*, famille des *Flaviviridae*) et BVDV pour Bovine Viral Diarrhea virus (genre *Pestivirus*, famille des *Flaviviridae*). Les *flavivirus* et souches WNV isolées en Europe sont soulignés [17].

1.2.1.2. Notion de sérocomplexe

Les *flavivirus* sont antigéniquement proches comme démontrés par les tests d'inhibition de l'Hémagglutination (HIT pour *Hemagglutination-inhibition test*) [18], *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou par séroneutralisation virale (VNT) [19, 20]. Un sérocomplexe est défini comme un ensemble de virus ayant des réactions sérologiques croisées lors de tests de neutralisation virale avec des anticorps polyclonaux. Ces réactions sérologiques croisées sont expliquées par le partage de sites antigéniques communs à la surface des virions, en particulier sur la glycoprotéine d'enveloppe.

On compte au moins huit sérocomplexes au sein des *flavivirus*. Le sérocomplexe de l'encéphalite japonaise regroupe dix virus dont le WNV, le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le virus de l'encéphalite de Saint Louis (SLEV), le virus de l'encéphalite de la Murray valley (MVEV) et le virus Usutu (USUV) [21].

Le sérocomplexe de l'encéphalite à tique est représenté entre autre par le virus de l'encéphalite à tique (TBEV), le virus Louping ill (LIV), le virus Powassan (POW) et le virus de la fièvre hémorragique de la vallée d'Omsk (OHFV).

Dans la suite de la thèse, nous nous intéresserons uniquement aux *flavivirus* neurotropes vectorisés par des moustiques ou des tiques qui ont un impact en médecine vétérinaire. Le tableau 1 présente les virus étudiés.

Clade	Virus		Réservoir	Vecteur principal	Principales espèces sensibles	Distribution géographique	Maladie/espèce sensible
Culex	WNV	SEROCOMPLEXE ENCEPHALITE JAPONAISE	Oiseaux	<i>Culex spp</i>	Homme et cheval Oiseaux (parfois)	Mondiale	Méningoencéphalite
	JEV		Oiseaux /Porc	<i>Culex spp</i>	Homme, bovin et cheval	Asie du Sud Est	Méningoencéphalite
	SLEV		Oiseaux	<i>Culex spp</i>	Homme et cheval	Amérique (nord, sud et centrale)	Méningoencéphalite
	MVEV		Oiseaux	<i>Culex spp</i>	Homme et cheval	Australie et Nouvelle Guinée	Méningoencéphalite
	USUV		Oiseaux	<i>Culex spp</i>	Oiseaux : merle et rapaces nocturnes (Homme avec historique d'immunosuppression)	Afrique et Europe	Infection généralisée/oiseaux (quelques cas d'encéphalites humaines)
	BAGV	SEROCOMPLEXE NTAYA	Oiseaux	<i>Culex spp</i>	Oiseaux : dinde, faisan, perdrix	Afrique, Espagne, Moyen Orient et Inde	Méningoencéphalite
Tique dure	TBEV	SEROCOMPLEXE ENCEPHALITE à TIQUE	Rongeurs	<i>Ixodes spp</i>	Homme, canidés	Europe et Asie	Méningoencéphalite
	LIV		Mouton, lagomorphes, rongeurs	<i>Ixodes spp</i>	Mouton, Homme	Principalement : Royaume-Uni et Irlande	Méningoencéphalite

Tableau 1: Principaux *flavivirus* neurotropes vectorisés par des moustiques ou des tiques en médecine vétérinaire

1.2.2. Les *flavivirus* neurotropes

1.2.2.1. Vecteurs moustiques (*Culex*)

1.2.2.1.1. Les *flavivirus* neurotropes présents en Europe

Le Virus West Nile (WNV)

Le WNV est un arbovirus transmis par des moustiques au sein d'un réservoir aviaire. Ce virus a été isolé pour la première fois chez l'Homme en Ouganda en 1937. Le WNV a probablement été introduit en Europe dès les années 1960 depuis l'Afrique sub-saharienne par la migration sur des longues distances d'oiseaux infectés.

a) Le cycle de transmission

Le WNV est entretenu et amplifié dans la nature selon un cycle impliquant les oiseaux et les moustiques. Cependant des cas de transmission directe par voie alimentaire soit par prédation de petits oiseaux infectés par le WNV soit par contacts directs entre oiseaux ont été décrits [22].

Le WNV est transmis à différentes espèces animales (mammifères mais aussi reptiles et amphibiens), par la piqure d'un moustique infecté à la fois ornithophiles et mammophiles. Le cheval et l'homme sont des hôtes accidentels sensibles et culs-de-sac épidémiologiques (figure 2). Chez ces deux espèces, les infections asymptomatiques sont les plus fréquentes mais dans de rares cas, des formes neuroinvasives avec méningite, encéphalite ou myélite peuvent survenir. Enfin, des cas de transmission inter-humaine suite à une transfusion sanguine, transplantation d'organe ou lors d'allaitement ont été rapportés ou sont suspectés (allaitement).

Les mécanismes de la persistance du virus en dehors de la période d'activité des vecteurs restent mal connus. La transmission verticale du WNV a été expérimentalement démontrée chez *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, et *Culex tarsalis* et le virus a été isolé de femelles moustiques en hibernation [23]. Cependant les *Culex* sont considérés comme des vecteurs peu efficaces en terme de transmission verticale pour le WNV [24].

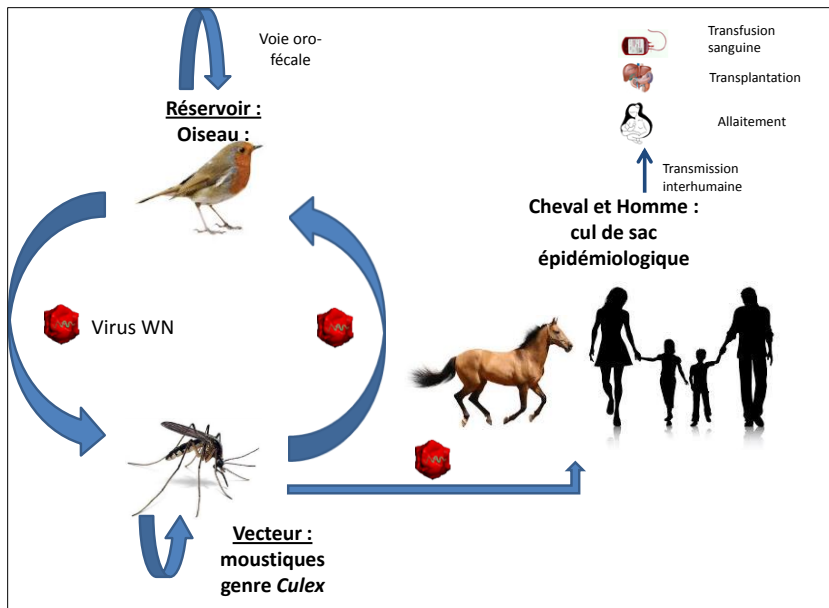


Figure 2 : Cycle de transmission du virus West Nile[25]

b) L'épidémiologie

De tous les *flavivirus* transmis par les moustiques du genre *Culex*, le WNV a la plus large distribution géographique (figure 3).

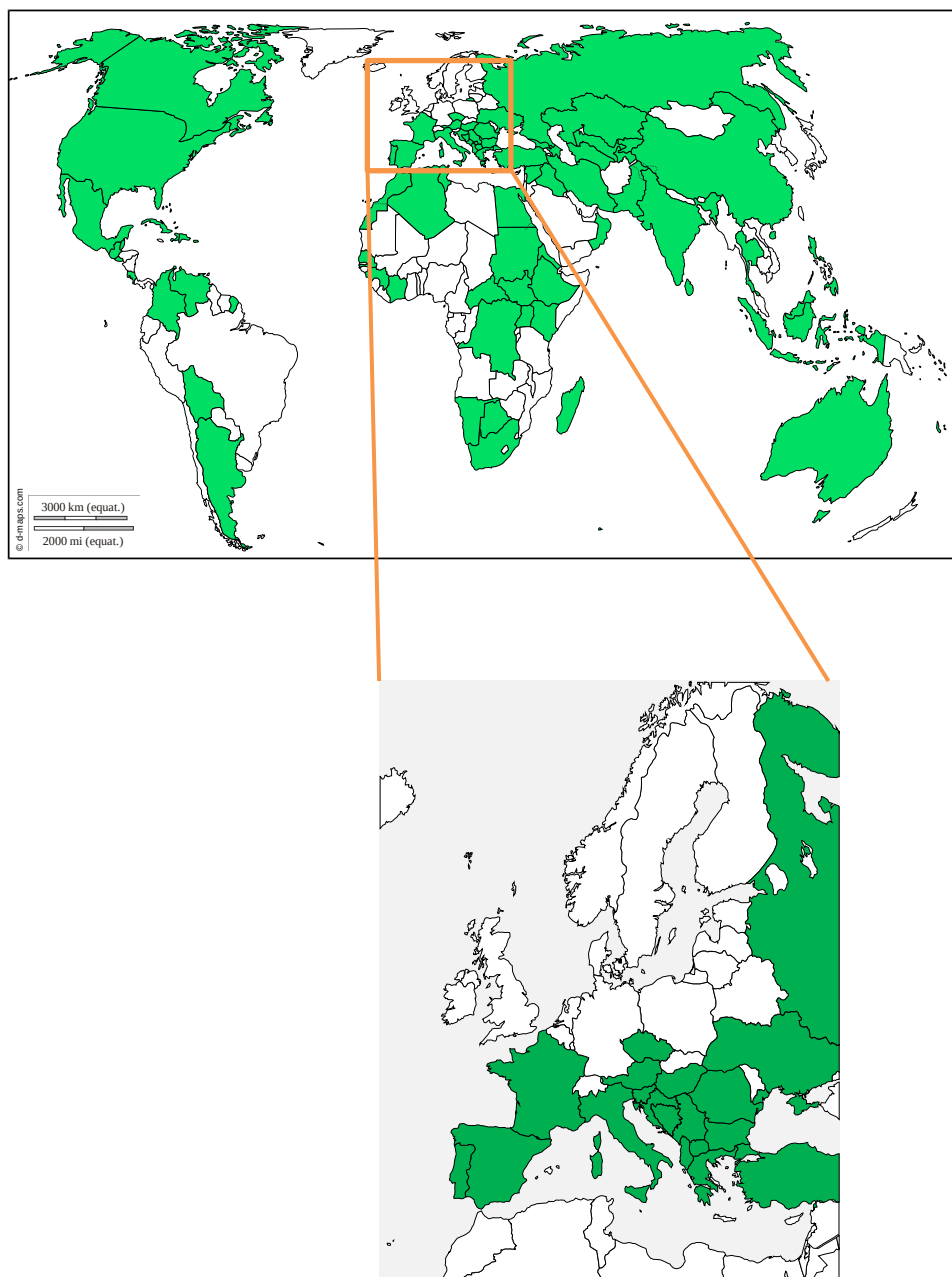


Figure 3 : Distribution du WNV dans le monde avec focus sur l'Europe en 2016 (source : Pubmed)

Ce virus a été décrit pour la première fois en Europe en 1960 quand des animaux séropositifs ont été identifiés et des isolements viraux réalisés en France, au Portugal et à Chypre [26, 27]. Après un silence de plus de 30 ans, le WNV lignée 1 (cf phylogénie dans la prochaine section c) a émergé à nouveau en Afrique du Nord (au Maroc (1996), en Algérie (1994) et en Tunisie (1997)) puis s'est rapidement étendu à l'Europe occidentale et de l'Est (Roumanie (1996)[28] et à la Russie (1999))

avant de ré-émerger en Italie en 1998 [29] puis en France en 2000 [30] (figure 4). Même si historiquement le WNV est considéré comme moins pathogène pour l'homme que les virus de la Fièvre jaune ou de la Dengue, des souches hautement pathogènes pour les oiseaux et les mammifères ont été isolées à partir de 1998 au Moyen-Orient (cluster israélo-américain au sein de la lignée 1). Le fait le plus marquant dans l'histoire du WNV a été l'introduction d'une souche très proche de ces isolats du Moyen-Orient en pleine ville de New York en 1999 et sa diffusion rapide sur tout le continent américain. Cette émergence virale a causé en seize ans aux États-Unis plus de 39 300 cas humains avec une issue fatale dans 1600 cas ainsi que plus de 25 000 cas équins [31].

En Europe, la situation n'a rien de comparable avec celle du continent américain. Le WNV reste cantonné au bassin méditerranéen et à l'Europe de l'Est et est associé à des cas cliniques sporadiques. Les différentes flambées ont toutes été observées en période estivale, en liaison directe avec l'abondance des vecteurs, généralement entre mi-juillet et octobre.

Néanmoins un regain d'activité du WNV a été associé en particulier avec l'introduction en 2004 d'une nouvelle souche de lignée 2 (cf phylogénie en c) originaire d'Afrique [32, 33]. Cette souche de lignée 2 a été initialement identifiée en Hongrie en 2004 puis a diffusé de la Hongrie vers la partie est de l'Autriche et les pays du sud de l'Europe, jusqu'en Italie. Suivant une introduction indépendante, une autre souche appartenant elle aussi à la lignée 2 a également été détectée en 2004 à Rostov Oblast, au sud de la Russie [34]. Cette souche a par la suite diffusé vers la région de Volgograd et en Roumanie en 2010.

Depuis 2008, des flambées sans précédent d'épizooties équine et de cas humains dans de nombreux pays de l'Union européenne (UE) ont été causées par différentes souches de lignée 1 et de lignée 2 du WNV (Italie, Espagne, Roumanie et Hongrie avec une circulation endémique du virus rapportée dès 2008-2010). De plus, la diffusion du virus à de nouvelles régions d'Europe (Bulgarie et Grèce en 2010, Albanie, Ukraine et Macédoine en 2011, Croatie, Serbie, Monténégro et Kosovo en 2012, Bosnie-Herzégovine en 2013) a été rapportée mais le génotypage du virus n'a hélas pas systématiquement été réalisé (figure 4) [35-38].

Les saisons 2010-2013, en particulier, ont été marquées par d'importantes épidémies à WNV dans l'UE, avec un pic pour l'année 2010 où 334 cas humains associés à des infections neuro-invasives ont été comptabilisés en Autriche, Grèce, Hongrie, Italie, Roumanie et Espagne. La Grèce a été particulièrement touchée, avec 262 cas et 34 morts en Macédoine.

En conclusion, le WNV est bien implanté en Europe avec de manière préoccupante une endémisation dans des pays plus nombreux (Roumanie dès les années 1990, Italie, Grèce, Espagne, Hongrie plus récemment), et une extension progressive de la maladie à de nouvelles régions comme les Balkans.

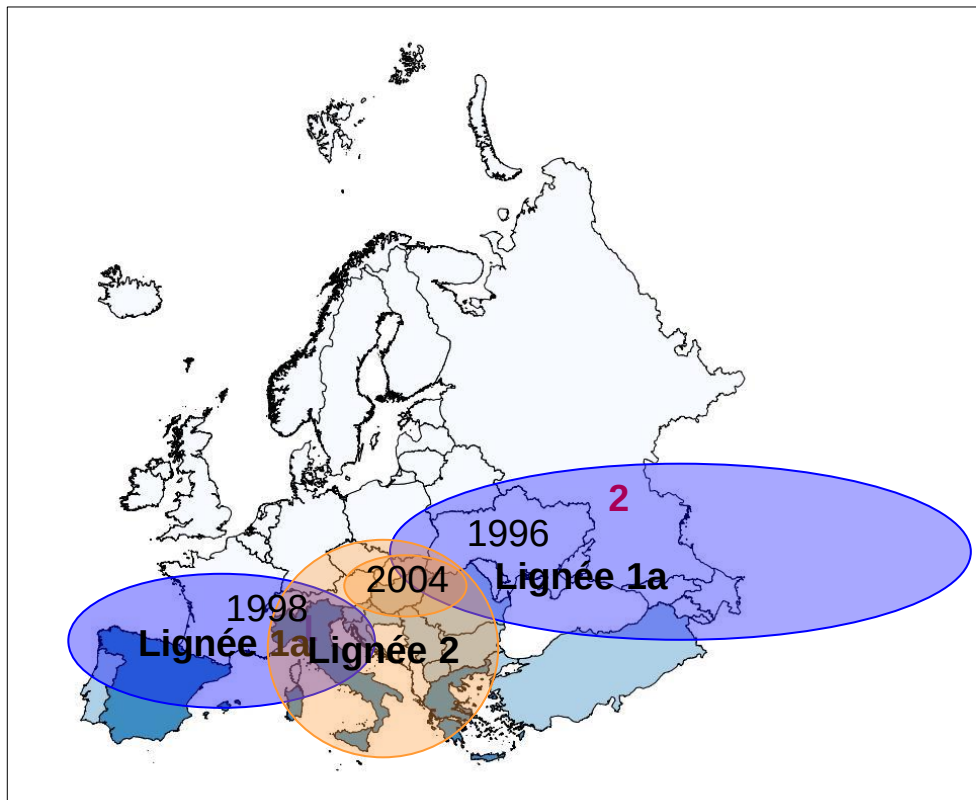


Figure 4 : Représentation de l'introduction des souches WNV en Europe

Les souches historiquement identifiées en Europe appartenaient toutes à la lignée 1a (Roumanie, 1996 ; Italie, 1998 par exemple). Deux souches de lignée 2 ont d'abord été mises en évidence en Hongrie et en Russie (2004), avant de diffuser plus largement en Europe jusqu'en 2014 [38]

c) La phylogénie

Le WNV peut actuellement être subdivisé en 8 lignées (figure 5). Les lignées 1 et 2 sont celles regroupant les souches pathogènes pour l'homme et le cheval et responsables des épidémies les plus importantes.

- La lignée 1 peut être divisée en 2 clades avec le clade 1a très largement répandu au niveau mondial et représenté par des isolats provenant d'Europe, d'Amérique du Nord, du Moyen-Orient et d'Afrique et le clade 1b (le virus Kunjin) limité à l'Australie [39].
- La lignée 2 était uniquement décrite en Afrique et à Madagascar et était considérée comme faiblement pathogène. Dans les années 2000, l'épidémiologie de ces souches a changé avec la découverte concomitante en Hongrie et Russie en 2004 de souches de lignée 2 pathogènes pour l'homme et le cheval, leur diffusion en Europe et Russie (cf : ci-dessus), ainsi que la mise en évidence de cas humains et équins en Afrique du Sud [33, 40].

- Les lignées 3 et 4 ont été décrites uniquement à partir d'isolats d'Europe centrale. La lignée 3 est représentée par une unique souche virale isolée de moustiques *Culex pipiens* et *Aedes rossicus* en République tchèque en 1997 (virus Rabensburg) [41]. La lignée 4 a été isolée de tiques *Dermacentor marginatus* et de moustiques *Uranotaenia unguiculata* en Russie (Virus Leiv) et à partir de grenouilles *Rana ridibunda*. La lignée 4 est proche de la lignée 6 (anciennement lignée 4b) isolée de moustiques *Culex pipiens* en Espagne (2006) et de moustiques *Uranotaenia unguiculata* en Autriche (2013) (anciennement lignée 4c)[42].
- La lignée 5 regroupe des souches isolées en Inde dans les années 1950 et 1980. Cette lignée avait initialement été classée comme étant une lignée 1c [43].
- Les lignées 7 et 8 correspondent respectivement à un isolat particulier de WNV classé initialement à tort parmi les souches Kunjin (souche Sarawak, Malaisie) et au virus africain Koutango isolé au Sénégal [44, 45].

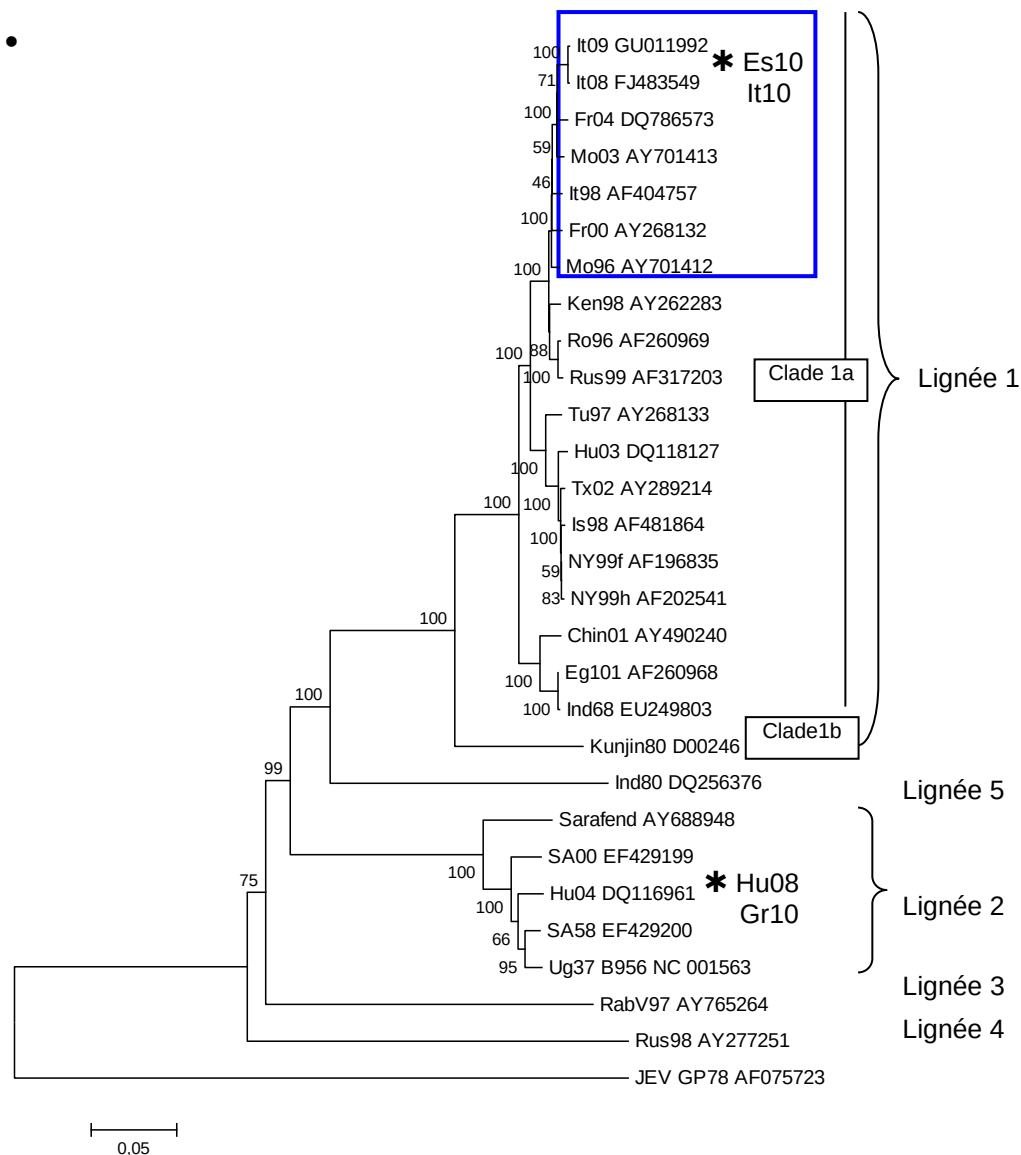


Figure 5 : Arbre phylogénétique établi à partir du séquençage du génome complet de différentes souches virales de WNV (seules 5 lignées ont été représentées).

La nomenclature des souches suit la règle suivante : initiales du pays (It : Italie, Fr : France, Mo : Maroc, Ken : Kenya, Ro : Roumanie, Rus : Russie, Tu : Tunisie, Hu : Hongrie, Tx : Texas, Is : Israël, NY : New York, Chin : Chine, Eg : Egypte, Ind : Inde, SA : Afrique du Sud, Ug ; Ouganda, Es : Espagne) ou nom de la souche (Kunjin présent en Australie, Sarafend prototype des souches de lignée 2, Rab pour Rabensburg présent en République tchèque) suivi de l'année d'isolement (04 pour 2004, 96 pour 1996) et du numéro d'enregistrement dans la base Genbank de données de séquences. Les souches isolées lors des foyers récents en Europe occidentale, en France, Italie (jusqu'en 2011 ; à partir de 2011, des isolats de lignée 2 ont été rapportés dans ce pays), Espagne en particulier, sont très proches génétiquement (>99% homologies) et appartiennent au même cluster méditerranéen (bloc entouré en bleu) au sein de la lignée 1. Les souches présentes en Europe de l'Est présentent une variabilité génétique plus grande et appartiennent soit à la lignée 1 (ex : Ro96), 2 (Hu04), 3 (RabV97, isolé en République tchèque) ou 4 (Rus98). Les souches isolées en 2010 et 2011 en Europe ont été ajoutées sur l'arbre (localisation approximative avec un astérisque), quand une caractérisation génétique des souches a été réalisée.

d) L'écologie

Le WNV est maintenu par un cycle « moustique-oiseau-moustique ». Le WNV est transmis à un hôte naïf par la pique d'un moustique contaminé après un repas sanguin sur un oiseau infecté. Il faut un délai de 5-9 jours pour que le moustique devienne infectieux, délai appelé période extrinsèque nécessaire pour que le virus gagne les glandes salivaires du moustique.

De nombreux genres de moustiques ont été trouvés infectés incluant : *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* et *Mansonia* mais seules quelques espèces du genre *Culex* sont de réels vecteurs compétents.

En Europe, deux espèces de moustiques, *Culex pipiens*, un moustique « urbain », et *Culex modestus*, présent dans les zones humides, rizières et roselières en Camargue par exemple, sont principalement impliquées dans la transmission du virus [46, 47].

Les oiseaux sauvages constituent le réservoir naturel du WNV et la compétence des oiseaux dans l'amplification et la transmission du WNV varie en fonction du groupe et de l'espèce d'oiseau considérée. Les Passeriformes (la plus grande « communauté » aviaire avec plus de 600 espèces recensées) très représentés en Amérique du Nord et en Europe avec les corbeaux d'Amérique (*Corvus brachyrhynchos*), les pies communes (*Pica pica*) et les moineaux (*Passer domesticus*) mais aussi les charadriiformes (oiseaux aquatiques), les strigiformes (rapaces nocturnes) et les falconiformes (rapaces diurnes) sont des hôtes très compétents pour le WNV et présentent des niveaux de virémie généralement suffisants pour infecter la plupart des moustiques [48, 49].

En revanche, les colombiformes (pigeons), les piciformes (piverts) et les ansériformes (canards, etc.), généralement résistants à l'infection, développent une virémie très faible (figure 6).

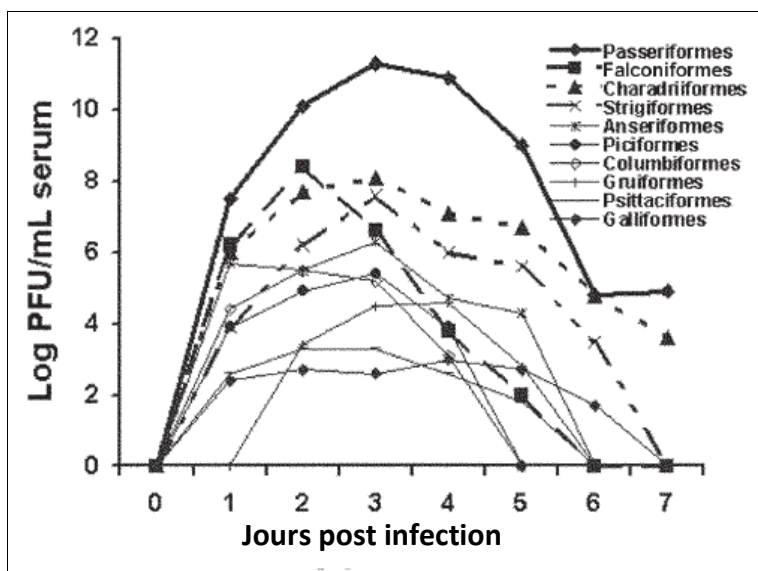


Figure 6 : Titre viral dans le sérum (en log PFU/ml) après infection expérimentale de différents groupes d'oiseaux [48]

Le seuil de virémie à atteindre chez l'oiseau est de 10^5 - 10^6 PFU/ml pour permettre l'infection de moustiques *Culex*

En Europe, les oiseaux sont le plus souvent des porteurs asymptomatiques du WNV. Des souches très virulentes du WNV, appartenant au clade 1a et au sous-groupe israélo-américain, ont cependant été associées en Israël à des mortalités massives chez des oiseaux sauvages comme les cigognes blanches (*Ciconia ciconia*) ou chez des oiseaux domestiques comme les oies entre les années 1997 et 2001 [50]. Des souches génétiquement proches ont aussi été responsables de forte mortalité chez les oies en Hongrie en 2003 [33]. De même, l'épizootie de WNV aux Etats-Unis en 1999, due à une souche très proche génétiquement de la souche Israël 1998, a été associée à un haut taux de mortalité chez plusieurs espèces aviaires [51] : corbeaux américains, pies, moineaux en particulier. L'hypothèse de l'émergence du WNV sur des hôtes aviaires naïfs pour le WNV ou d'autres *flavivirus* apparentés a été évoquée pour expliquer un tel taux de mortalité dans l'avifaune nord-américaine [48, 52].

Des souches de lignée 2 ont, quant à elles, été responsables de mortalités de rapaces, comme les autours des palombes (*Accipiter gentilis*) en Hongrie et dans les pays voisins à partir de 2004 [33, 53].

e) Les symptômes cliniques

Chez l'Homme, suite à une infection à WNV, 20% des individus développent des symptômes avec, dans la plus grande majorité des cas, une forme pseudo-grippale estivale dénommée fièvre West Nile (WNF). Moins de 1% des cas évoluent vers une maladie neuro invasive sévère (WNND) avec des symptômes de méningite, d'encéphalite ou de paralysie flasque (syndrome de Guillain-Barré). Les personnes âgées et immunodéprimées sont les plus sensibles à l'infection à WNV [54].

Chez le cheval, après une période d'incubation de 3 à 15 jours, il est plus fréquent d'observer une affection de type pseudo-grippale (chez près de 65 % des chevaux malades) se caractérisant par une hyperthermie, une faiblesse de l'animal ou encore des coliques. Les signes cliniques traduisant une atteinte neurologique ne sont rapportés que dans 10 % environ des infections par le WNV : ataxie, parésie ou paralysie des membres, postérieurs le plus souvent, sont les signes d'appel les plus couramment décrits. Le tableau clinique d'atteinte parétique ou paralytique peut s'accompagner de fasciculations musculaires, de troubles comportementaux de type somnolence, hyperexcitabilité, hyperesthésie, agressivité et de paralysies faciale et linguale, de dysphagie et de grincements des dents, traduisant une atteinte des nerfs crâniens VII, XII et IX. Une anorexie est observée dans 25 % des cas environ. À la différence de ce qui est observé chez l'homme, les signes neurologiques ne sont pas nécessairement rapportés chez les individus les plus âgés. La létalité associée aux formes neurologiques est évaluée entre 20 et 57 % chez le cheval [55]. Le cheval apparaît légèrement plus sensible à l'infection par le WNV que l'homme (proportion plus importante de formes neurologiques, létalité plus forte) et cette espèce est considérée comme une sentinelle pertinente du risque

d'infection chez ce dernier. La déclaration de cas cliniques chez le cheval précède ainsi généralement de 1 à 2 semaines les premiers cas humains.

Le virus Usutu (USUV)

Le cycle de transmission de ce virus est semblable à celui du WNV avec de nombreuses espèces de moustiques *Culex* intervenant comme vecteurs, en particulier *Culex pipiens* considéré comme le vecteur principal en Europe.

a) L'épidémiologie

L'USUV est un virus ancien puisqu'il a été découvert en Afrique du sud en 1959 avant d'être isolé par la suite dans de nombreux pays africains (République centrafricaine, Sénégal, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Nigeria, Ouganda et Tunisie). Des analyses génétiques des souches africaines et européennes d'USUV suggèrent que le virus a émergé il y a plus de 500 ans en Afrique et que les souches européennes auraient été introduites d'Afrique par le biais de la migration des oiseaux.

En Europe, un premier virus a été isolé en Autriche en 2001 à la suite d'un épisode de fortes mortalités de merles (*Turdus merula*) à Vienne. Des analyses rétrospectives menées par la suite sur des oiseaux morts en Italie en 1996, dans la région de la Toscane, ont montré que le virus USUV circulait déjà en Europe à cette époque [56, 57]. Selon les études phylogénétiques disponibles, au moins trois introductions virales auraient eu lieu en Europe via les deux principaux couloirs migratoires en provenance d'Afrique. Le virus aurait été introduit à deux reprises en Espagne dans les années 1950 puis 1990 selon un couloir migratoire Atlantique Est. Par ailleurs, une introduction en Europe centrale serait survenue dans les années 1980 en suivant un couloir migratoire mer Noire/Méditerranée [58] (figure 7).

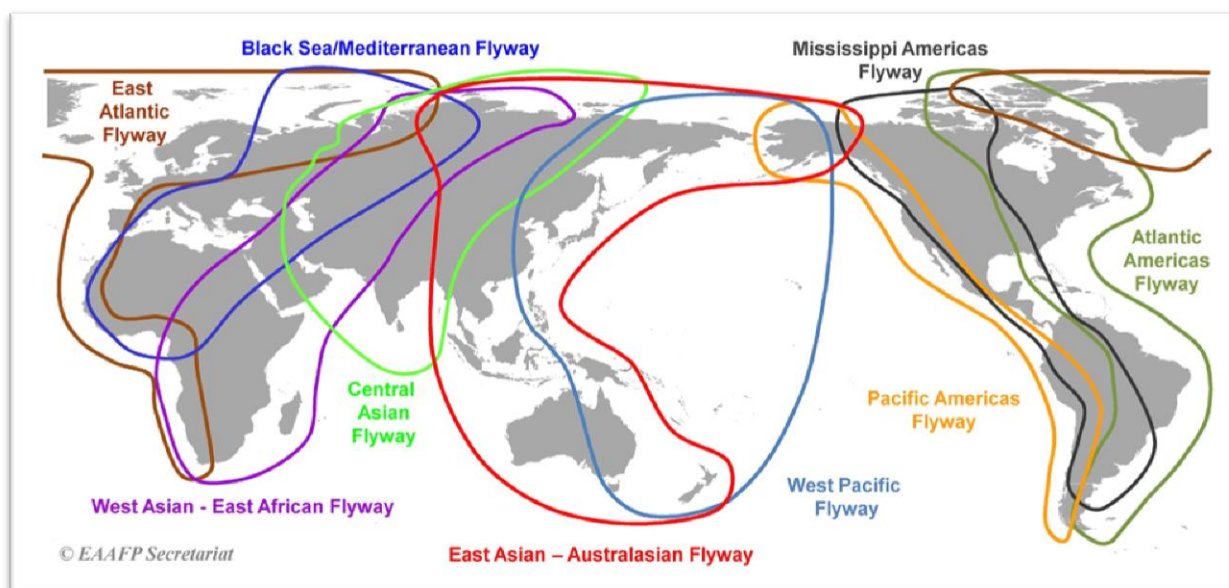


Figure 7 : Représentation des différents couloirs migratoires des oiseaux sauvages dans le monde [59]

Jusqu'à l'été 2015, huit pays européens, dont cinq ayant une frontière commune avec la France (Allemagne, Belgique, Suisse, Italie et Espagne) avaient rapporté l'isolement de ce virus à partir de moustiques ou d'oiseaux (figure 8). En France, la présence du virus USUV (ou d'un virus proche) avait été suspectée suite à la mise en évidence par un test de séroneutralisation virale d'anticorps neutralisants USUV sur des pies bavardes (*Pica pica*) prélevées entre novembre 2009 et décembre 2010 en Camargue [60] mais ce n'est qu'en 2015, suite à des mortalités de merles signalées dans les départements du Haut-Rhin et du Rhône, que les premiers isollements de USUV ont été réalisés en France [61].

Les trois isolats français d'USUV obtenus en 2015 (deux pour le département du Haut-Rhin et un pour le département du Rhône) ont été séquencés entièrement à la plateforme de séquençage haut débit de l'ANSES. L'analyse phylogénétique a montré que les isolats du Haut-Rhin étaient très proches de la souche allemande 5684 isolée en 2012 (99.8% d'homologie nucléotidique) alors que l'isolat du Rhône était proche de la souche espagnole isolée en 2006 (Genbank KF573410, 97.8% d'homologie nucléotidique entre ces deux derniers isolats). Ces données suggèrent l'existence de deux vagues d'introductions distinctes sur notre territoire, l'une via le couloir Atlantique Est avec une souche très proche des isolats espagnols identifiés ces dernières années et l'autre en provenance d'Allemagne [61, 62].

En 2016, la circulation d'USUV a été une nouvelle fois mise en évidence par diagnostic direct (RT-PCR et séquençage) dans les départements du Haut-Rhin et du Rhône et a été détectée pour la première

En 2016, les Pays-Bas ont à leur tour détecté l'USUV pour la première fois sur des merles et des chouettes portant à 10 le nombre de pays européens ayant signalé des cas [63](figure 8).

Bien qu'asymptomatique chez un grand nombre d'espèces d'oiseaux sauvages, l'USUV peut

chevaux, rongeurs et l'homme) constituent des hôtes accidentels pour lesquels le virus se montre peu pathogène.

Chez l'homme, les infections à USUV passent généralement inaperçues. Quelques cas de méningo-encéphalite, principalement chez des patients immunodéprimés, ont été décrits en Afrique [65], en Italie [66] et en Croatie [67]. Les symptômes les plus fréquemment rencontrés sont de la fièvre, un rash cutané, des maux de tête, de la rigidité nucale et des tremblements des mains. Ces cas peuvent facilement être confondus avec d'autres infections, notamment par le WNV, et être sous-estimés [68].

Chez les chevaux, les infections sont jusqu'à nouvel ordre asymptomatiques et entraînent uniquement une séroconversion de l'animal [69, 70].

Le virus Bagaza (BAGV)

a) L'épidémiologie

BAGV est un virus transmis par les moustiques du genre *Culex* et qui appartient au sérocomplexe Ntaya. Ce virus a été isolé pour la première fois en République centrafricaine en 1966 à partir d'un pool de moustiques *Culex spp* [71]. Il a été trouvé par la suite dans d'autres pays comme l'Afrique du Sud, de l'ouest (Sénégal) et en Inde [72-74]. Le virus BAGV est identique au virus de la méningo-encéphalite de la dinde, virus qui a été identifié pour la première fois en Israël en 1960 à partir de dindes présentant des symptômes neurologiques (ITMV pour *Israel turkey meningoencephalitis virus*) [75]. En 2010, l'introduction de BAGV en Europe a été mise en évidence sur des perdrix à queue rouge (*Alectoris rufa*) et des faisans de Colchide (*Phasianus colchicus*) au sud de l'Espagne [76]. Ce virus est très pathogène chez les perdrix et dans une moindre mesure chez les faisans. De plus, suite à une expérimentation où des perdrix infectées par le BAGV ont été mises dans la même cage que des perdrix saines, il a été démontré que ce virus pouvait être transmis par contact direct entre les perdrix en l'absence de transmission vectorielle [77].

b) Les symptômes cliniques

Chez les oiseaux, les signes cliniques regroupent un ensemble de symptômes peu évocateurs comme une diarrhée blanche, prostration, apathie, perte de poids, mauvaise coordination motrice ou encore une forte létalité chez les oiseaux sensibles (30% de mortalité suite à une expérimentation chez les perdrix)[77].

Chez l'homme, la pathogénicité du virus est hypothétique. Des anticorps anti-BAGV ont été récemment trouvés en Inde dans 15% (8/53) des sérums de patients souffrant d'encéphalite, questionnant sur le caractère zoonotique de ce virus [72]. Aucune maladie chez le cheval après infection par le BAGV n'a encore été décrite.

1.2.2.1.2. Les *flavivirus* neurotropes à risque d'émergence en Europe

Le Virus de l'Encéphalite japonaise (JEV)

a) L'épidémiologie

Le JEV est un *flavivirus* transmis par les moustiques, responsable d'encéphalites, principalement chez les humains, les chevaux, les bovins et de troubles de la reproduction chez le porc. Son aire de répartition centrée sur l'Asie du Sud Est, le Japon et l'Indonésie, s'étend jusqu'au Nord de l'Australie (suite à une introduction du génotype II en 1995-1998 et du génotype I en 2000 (cf. partie c phylogénie)) [78, 79] et dans la région de Vladivostok en Russie (figure 9).

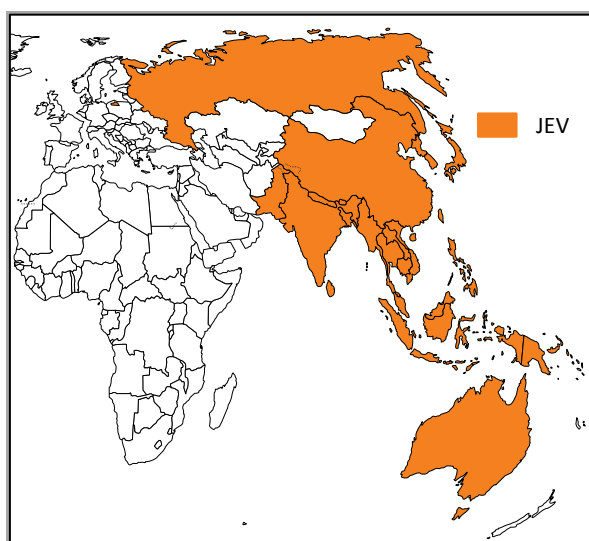


Figure 9 : Distribution du JEV en Asie (2016).

Les pays pour lesquels des cas chez l'homme ou le cheval ont été enregistrés, ou pour lesquels le virus a été identifié chez les animaux réservoirs (oiseaux marins, porcs) ou chez les vecteurs (moustiques) sont colorés en orange.

b) Le cycle de transmission

Cette maladie est présente en zone rurale, principalement dans les rizières où les moustiques vecteurs *Culex tritaeniorhynchus* prolifèrent et sont en contact avec les oiseaux aquatiques

migrateurs (hérons, aigrettes ...) qui constituent le réservoir du virus. Fréquemment les moustiques vecteurs (*Culex* et *Aedes* spp) piquent des mammifères dont les porcs, les hommes et les équidés. Les porcs ont une virémie relativement longue (de 2 à 4 jours) et forte et constituent le principal hôte amplificateur du virus [80] alors que les hommes et les équidés ne présentent pas de virémie suffisante pour transmettre le virus à de nouveaux moustiques et sont des culs-de-sac épidémiologiques (figure 10).

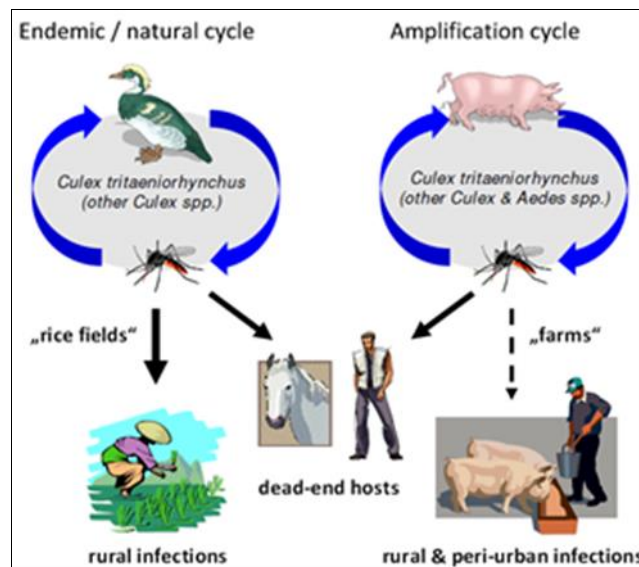


Figure 10 : cycle de transmission du JEV [81]

Des études récentes ont démontré que des porcs infectés pouvaient transmettre le virus à d'autres porcs non infectés par contact oro-nasal direct en absence de vectorisation par un moustique [82].

On peut distinguer en Asie du Sud-Est trois régions différentes d'un point de vue épidémiologique pour le JEV avec 1/ une région endémique (sud de l'Inde, Thaïlande, Vietnam) où les moustiques piquent en priorité les oiseaux et les porcs avec de rares cas humains symptomatiques, 2/ une région intermédiaire subtropicale (nord de l'Inde, Népal, nord de la Thaïlande et sud de la Chine) où des infections humaines sont peu nombreuses avec un pic de cas entre avril et octobre et enfin 3/ une région tempérée épidémique (nord de la Chine, Japon, Corée, Taïwan et sud de la Russie) où les cas humains sont inconstants et saisonniers avec des épidémies pouvant être sévères en été et en automne [83].

c) La phylogénie

Un seul sérotype du JEV a été identifié mais les études phylogénétiques permettent de distinguer 5 génotypes (nommés I à V).

La plupart des virus de génotype I ont été isolés au nord de la Thaïlande, en Corée, au Cambodge, en Chine, au Japon et au nord de l'Australie. Le génotype II a été mis en évidence au sud de la Thaïlande, en Malaisie, en Indonésie et au nord de l'Australie. Le génotype III a été identifié dans des zones tempérées comme le Japon, la Chine, mais aussi à Taïwan, aux Philippines, en Inde et au Sri Lanka. Le génotype IV a, quant à lui, été trouvé en Indonésie et le génotype V en Malaisie, en Corée et en Chine [83, 84]. Il est vraisemblable que les 5 génotypes de JEV ont émergé dans les régions de Malaisie-Indonésie, parce que tous les génotypes, incluant les génotypes les plus rares et divergents (c.à.d. génotypes IV et V), ont été isolés dans cette région (figure 11).

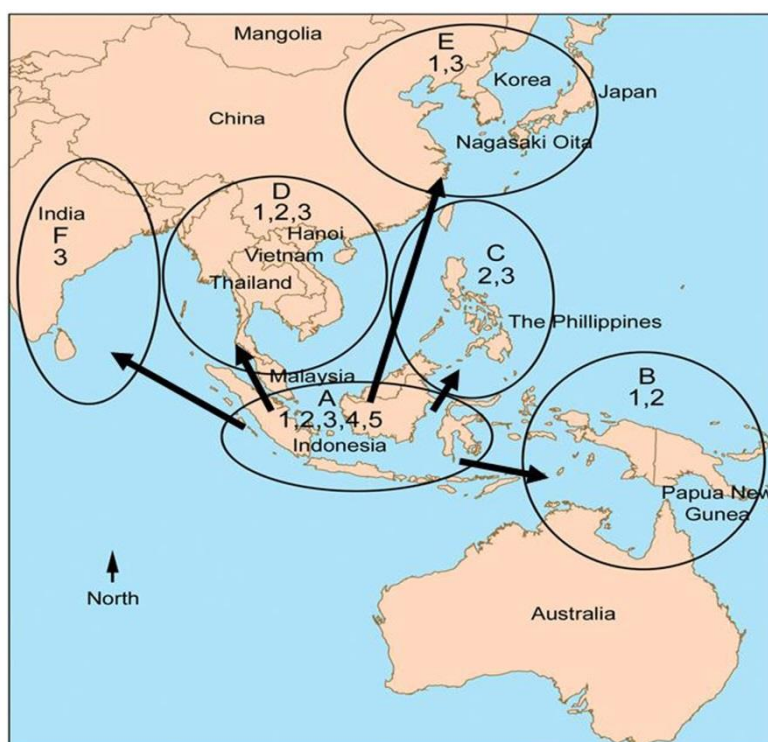


Figure 11: Représentation de la répartition des différents génotypes de JEV en Asie

Visualisation par des cercles de différentes zones (A, B, C, D, E et F) en fonction des génotypes qui circulent [83]

Les génotypes I et III sont associés aux formes épidémiques, alors que les génotypes II, IV et V sont associés aux formes endémiques. Actuellement, de nombreuses études montrent que le génotype I tend à supplanter le génotype III dans les régions où les 2 génotypes sont présents [85] et on assiste à une émergence du génotype I en Inde [86].

De manière préoccupante, une séquence génomique partielle de JEV (167nt) proche de souches de génotype III a été détectée sur un pool de moustiques *Culex pipiens* au nord-est de l'Italie en 2010 et antérieurement sur des oiseaux morts en Toscane entre 1997 et 2000 [87, 88]. Une des hypothèses

avancée dans l'article de Platonov [87] est une introduction sporadique du virus en Italie via les oiseaux migrateurs originaires des régions endémiques à JEV.

d) Les symptômes cliniques

Chez l'homme, l'infection par le JEV est le plus souvent asymptomatique. Les infections symptomatiques représentent entre 0,1 et 4% des infections [89]. Les enfants paient le plus lourd tribut à cette infection cérébrale qui provoque environ 20 000 décès par an. On estime en effet qu'environ 70% des cas symptomatiques surviennent chez des jeunes de moins de dix ans. La période d'incubation dure de 5 à 15 jours. Chez les enfants, les premiers signes sont souvent digestifs avec anorexie, nausées, douleurs abdominales aiguës, vomissements ou diarrhée. Au final, 25% des encéphalites sont mortelles et 30% des malades ayant eu une encéphalite à JEV gardent des séquelles neurologiques sévères avec des déficits graves tels que perte de mémoire, troubles du comportement, convulsions, déficits moteurs ou paralysies, troubles de la coordination [83].

Chez le cheval, le JEV provoque également des encéphalites. La période d'incubation est environ de 21 jours. Les symptômes, très proches de ceux du WNV, consistent en un abattement, une perte d'appétit, de la fièvre et une atteinte du système nerveux central avec des troubles du comportement (hypersensibilité de la tête et du cou, parfois agressivité ou photophobie), une paralysie des nerfs crâniens (dysphagie, ptose des paupières), une incoordination des quatre membres ou une ataxie limitée aux postérieurs. Les symptômes peuvent évoluer jusqu'à l'inconscience et la mort de l'animal [90].

Chez les bovins, les signes cliniques sont de la fièvre, une perte d'appétit, associés à un grincement des dents, tourner en rond, convulsion, rigidité des membres, inconscience et généralement mort quelques jours après le début des symptômes.

Les porcs ont un rôle d'amplificateurs du virus. Les porcs infectés ne présentent généralement pas de signes cliniques, hormis des épisodes d'avortements ou de mortinatalité.

Le virus de l'Encéphalite de Saint Louis (SLEV)

a) La phylogénie

Le SLEV a été identifié uniquement en Amérique. Ce virus appartient au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise et peut être divisé en 7 lignées (I à VII) en fonction de l'origine géographique des souches. Les lignées I et II circulent principalement en Amérique du Nord alors que les lignées III à VII se répartissent en Amérique centrale et du Sud [91, 92]. L'analyse de l'arbre phylogénétique

permet de suggérer que les lignées d'Amérique du Sud sont antérieures à celle d'Amérique du Nord avec de multiples introductions de SLEV du sud vers le nord.

La diversité génétique des souches est faible pour le SLEV (10% maximum de divergence nucléotidique pour l'ensemble des lignées) comparée à celle du WNV (jusqu'à 22% de divergences entre les lignées 1 à 5) [93] et peut s'expliquer par le fait que le SLEV, cantonné « au Nouveau Monde », a subi moins de pressions de sélection que le WNV [92].

b) L'épidémiologie

Les cycles de transmission lors des épizooties ou épidémies de SLEV impliquent des moustiques du genre *Culex* comme vecteurs et principalement des oiseaux passériformes et columbiformes comme réservoir.

Entre 1999 et 2007, 188 cas humains avec forme neuro-invasive ont été attribués au SLEV aux Etats-Unis. L'incidence moyenne du SLEV a tendance à diminuer aux USA avec trois fois moins de cas sur la période 1999-2007 par rapport aux années antérieures 1990-1998 [94]. Cette baisse du nombre de cas peut s'expliquer par le caractère sporadique des épidémies à SLEV ou à l'introduction du WNV aux USA qui aurait conféré une immunité croisée des oiseaux vis-à-vis du SLEV. Les raisons de la baisse incidence du SLEV ces dernières années ne sont cependant pas encore complètement connues.

c) Les symptômes cliniques

Comme pour le WNV, les infections à SLEV chez les humains sont le plus souvent asymptomatiques. Lors d'infection symptomatique, les personnes infectées présentent le plus souvent des symptômes pseudo grippaux. Les cas cliniques sévères sont caractérisés par de la fièvre, maux de tête et perte de la conscience, symptômes dus à une encéphalite ou méningoencéphalite qui touche plutôt les personnes âgées. Dans les cas les plus sévères, le taux de létalité peut atteindre 30% et des lésions du système nerveux central (SNC) peuvent être observées.

La description des signes cliniques chez le cheval est peu documentée. Il est seulement admis que le SLEV peut être responsable d'encéphalite équine [95].

Le virus de Murray Valley (MVEV)

a) La phylogénie

Le MVEV est localisé uniquement en Australie, Papouasie-Nouvelle-Guinée et Nouvelle-Guinée occidentale. On distingue quatre génotypes (G1-G4), dont seuls les génotypes G1 et G2 circulent activement. G1 est le génotype le plus souvent isolé avec 2 sous lignées G1a et G1b [96]. Les virus du génotype G2 sont uniquement isolés dans la région Nord-Est de Kimberley située au Nord-Ouest de l'Australie. Les génotypes G3 et G4 correspondent respectivement à des isolats de Papouasie-Nouvelle-Guinée isolés à partir de cas humains en 1956 ou de moustiques en 1966 [97].

b) L'épidémiologie

Le MVEV est amplifié selon un cycle entre les moustiques du genre *Culex* et les oiseaux marins. Le MVEV est endémique dans le nord de l'Australie et des flambées de MVEV peuvent avoir lieu sporadiquement dans le sud-est de l'île, comme en 1951, 1956, 1974 et 2011. En 1974, 58 cas d'encéphalite chez les humains ont été recensés avec un taux de létalité avoisinant les 20%. En 2011, à nouveau 13 cas humains, dont 3 cas mortels, et des cas neurologiques chez des chevaux ont été notifiés témoignant de l'importance de cette maladie en dépit de la rareté des épisodes épidémiques [98].

c) Les symptômes cliniques

Chez l'homme, il est estimé que 1/150 à 1/1000 des infections sont responsables de symptômes cliniques comprenant de la fièvre, des maux de tête, nausées, vomissements, diarrhées et symptômes nerveux qui ne peuvent être différenciés des autres *flavivirus* à tropisme nerveux [98].

Chez le cheval, on observe de l'ataxie, un déficit proprioceptif des membres antérieurs et une encéphalite non suppurée mais la symptomatologie de l'infection reste peu décrite [99, 100].

1.2.2.2. Vecteurs tiques : Ixodes

Le virus de l'Encéphalite à tique (TBEV)

Le TBEV est le pathogène transmis par les tiques le plus important en Europe et en Asie. On estime l'incidence annuelle à 10 000 infections avec un taux de létalité compris entre 1 et 20%. Le TBEV est rapporté dans l'hémisphère nord de l'Europe et de l'Asie (figure 12). Le premier isolement date de 1938 sur une tique *Ixodes ricinus* collectée en Russie dans la région de Minsk.

a) La phylogénie et l'épidémiologie

Il existe 3 sous-types pour le TBEV : le sous-type occidental ou européen (TBEV-Eu) anciennement dénommé le *Central European encephalitis virus*, le sous-type sibérien (TBEV-Si) anciennement

dénommé le *west Siberian virus* et le sous-type d'Extrême-Orient (*Far Eastern*) (TBEV-FE) anciennement dénommé le *Russian Spring Summer encephalitis virus*. Toutefois ces 3 sous-types circulent en Europe avec le TBEV-Si et le TBEV-FE récemment détectés dans les pays baltes et à l'Est de la Finlande [101, 102]. La variation en acides aminés du génome complet à l'intérieur d'un sous-type est inférieure à 2% alors qu'elle varie entre 5 et 6% entre les sous-types [103].

Le virus a été initialement identifié en Sibérie et en Extrême-Orient. Le virus a ensuite diffusé vers le sud et l'ouest [104]. Durant sa propagation, de nouveaux sous-types et de nouveaux virus (Louping ill très proche génétiquement de TBEV-Eu, voir ci-dessous) sont apparus. Le TBEV-Eu et le Louping ill ont gagné l'Europe de l'Ouest, les Îles Britanniques, l'Espagne et la Norvège alors que la propagation vers l'est a conduit à l'émergence du TBEV-FE (Chine et Japon) et d'un autre virus, le virus Powassan (POWV) qui est présent en Russie et en Amérique du Nord.

b) Le cycle de transmission

Les principaux vecteurs arthropodes sont les tiques dures du genre *Ixodes* avec presque exclusivement l'espèce *Ixodes ricinus* pour TBEV-Eu et *Ixodes persulcatus* pour TBEV-Si et TBEV-FE. On dénombre néanmoins d'autres vecteurs tiques occasionnels des genres *Haemaphysalis*, *Dermacentor* et *Hyalomma (marginatum)* [105].

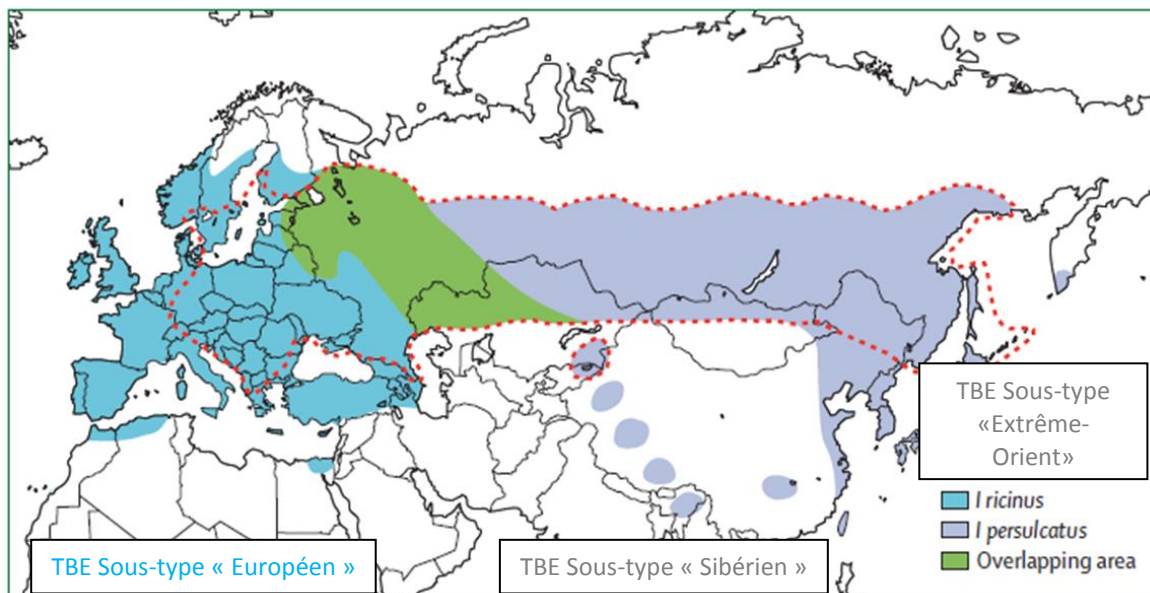


Figure 12: Distribution géographique d'*Ixodes* spp

Distribution à l'Ouest pour *Ixodes ricinus* et distribution à l'Est pour *Ixodes persulcatus*. En pointillé, région avec risque d'infection à TBEV (Adapted from [103])

Remarque : Pour POWV, les vecteurs tiques du genre *Ixodes* impliqués dans la transmission sont différents : *Ixodes cookei*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes Marxi* et *Ixodes spinipalpus*.

A l'inverse des moustiques qui s'infectent uniquement si la virémie chez l'hôte est suffisante, les tiques peuvent s'infecter lors d'un repas partagé ou « *co-feeding* », ne nécessitant pas une infection systémique de l'hôte [106]. En effet, les tiques adultes et immatures ainsi que les larves et les nymphes sont attachées sur leur hôte pendant plusieurs jours et peuvent se nourrir conjointement sur le même réservoir. La contamination entre tiques naïves (non infectées) et tiques infectées peut avoir lieu lors de ce repas. Le *co-feeding* est facilité par la proximité des tiques et l'action de la salive qui permet le transfert des arbovirus dont le TBEV [107].

Une transmission du TBEV par voies trans-ovarienne (transmission d'une femelle infectée aux œufs), transsexuelle (transmission du mâle à la femelle lors de l'accouplement) et trans-stadiale (l'agent infectieux persiste entre les différents stases larvaire, nymphale ou adulte) a aussi été rapportée [108]

Les hôtes réservoirs vertébrés de TBEV sont en majorité des rongeurs du genre *Myodes* et *Apodemus* bien que d'autres petits rongeurs insectivores peuvent contribuer au cycle naturel de transmission (figure 13). Les ovins, les caprins et plus rarement les bovins peuvent être des hôtes compétents additionnels. Les chèvres, brebis et vaches excrètent le virus dans le lait.

L'homme, le cheval et le gibier (cervidés, sanglier, renard) sont des culs-de-sac épidémiologiques.

Chez l'homme, les deux grandes voies de transmission du TBEV sont la morsure par une tique infectée et plus rarement l'ingestion de lait ou produits laitiers non pasteurisés issus de chèvres et moins souvent de vaches ou de brebis infectées [109].

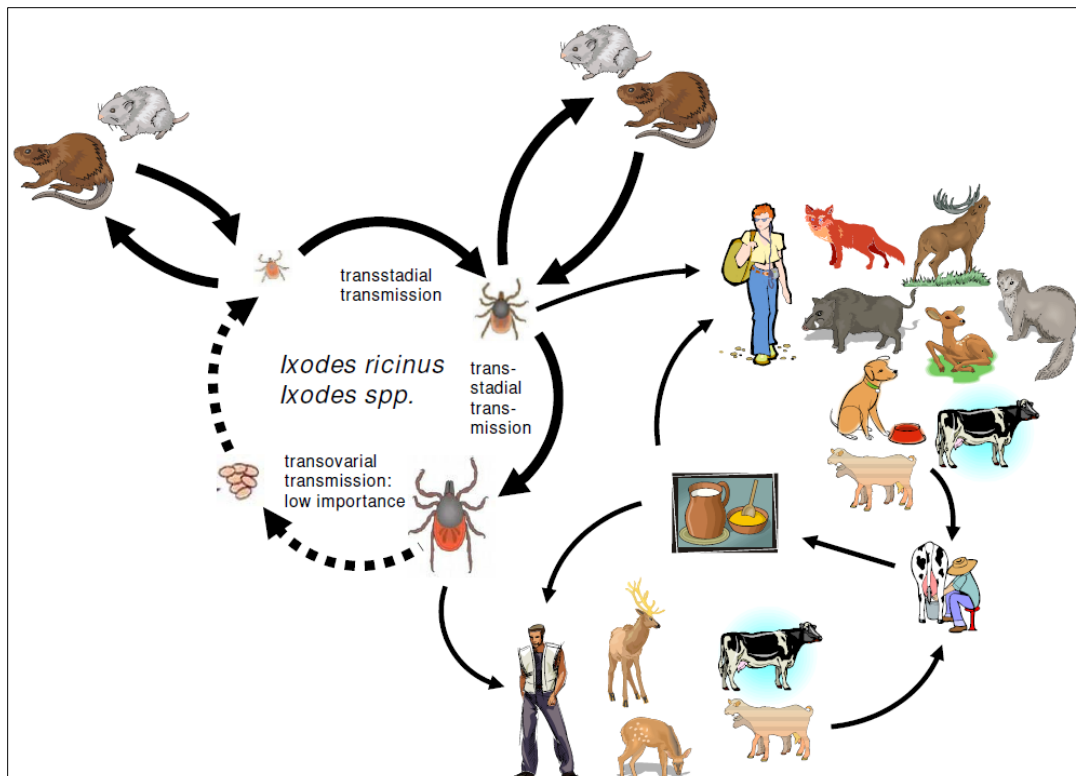


Figure 13 : Cycle de transmission de TBEV [81]

c) Les symptômes cliniques

Chez l'homme, la durée d'incubation varie de 7 à 14 jours. L'atteinte est habituellement modérée de type pseudo-grippal pouvant évoluer vers une méningite aseptique. Le TBE est classiquement une maladie évoluant sur un mode bi-phasique. La première phase est marquée par l'apparition de fièvre, de myalgies et de céphalées intenses persistant une semaine [110]. Après une phase de répit de 1 à 3 jours en moyenne, un quart à un tiers des patients symptomatiques développent des atteintes du SNC (rigidité, paralysie transitoire des membres, des épaules ou plus rarement des muscles respiratoires) secondaires à l'existence d'une méningo-encéphalite ou d'une méningite associée à une myélite. La récupération est très lente ; 20% des patients gardent des séquelles : parésies, troubles de la coordination, céphalées persistantes, troubles auditifs ou troubles psychiatrique mineurs.

Peu de publications décrivent des infections à TBEV chez les animaux. Une unique publication rapporte des symptômes cliniques de TBE chez une jument [111]. Généralement asymptomatiques chez le cheval, les infections à TBEV peuvent poser des problèmes de diagnostic du fait de la séroconversion des chevaux infectés par TBEV pouvant être confondus avec d'autres *flavivirus* comme le WNV et le JEV [112].

Le virus Louping ill (LIV)

a) La phylogénie et l'épidémiologie descriptive

Le LIV a été le premier arbovirus isolé en Europe en 1929 à partir d'un cerveau de mouton d'origine écossaise. Très proche du TBEV, le LIV pourrait être considéré comme le quatrième (ou historiquement le premier) sous-type du TBEV. En effet le LIV est génétiquement plus proche du TBEV-Eu que le TBEV-Si [113]. Hubalek et al (1995)[113] ainsi que Grard et al (2007)[114] proposent de considérer LIV comme un autre sous-type de TBEV et non comme un virus indépendant.

Son aire de répartition initialement limitée aux îles britanniques s'est agrandie, au gré des enquêtes épidémiologiques réalisées, avec des cas ou des séroconversions chez le mouton rapportés en Irlande, Norvège, Danemark et Espagne (figure 14) [101, 115-117].

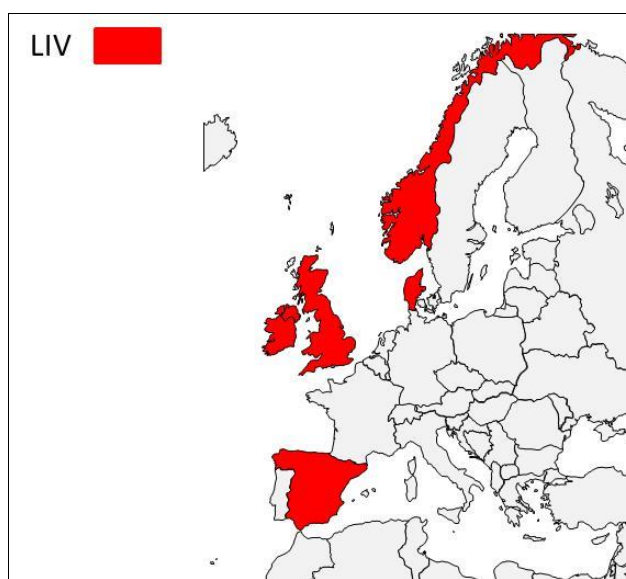


Figure 14: Carte de répartition du LIV en Europe (2016).

Les pays pour lesquels des cas ou des séroconversions ont été détectés chez le mouton sont représentés en rouge

b) Le cycle de transmission

La transmission se fait par des tiques dures *Ixodes ricinus*. Les hôtes réservoirs vertébrés sont le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*), la musaraigne commune (*Sorex araneus*), le lièvre des montagnes (*Lepus timidus*), le lagopède d'Ecosse (*Lagopus lagopus scoticus*) et le mouton (*Ovis aries*) [118].

Maladie principalement du mouton, elle peut atteindre occasionnellement les bovins, chevreux, cervidés captifs, porcs, chiens et l'homme. Enfin, quelques cas d'infection de chevaux par le LIV ont été décrits avec isolement du virus à partir de l'encéphale [119].

Les déplacements de moutons adultes sont associés à la diffusion du LIV aux régions indemnes. Les tiques femelles vectrices du LIV peuvent rester plus d'un an au sol sans se nourrir en conservant le virus infectieux car le LIV se réplique activement dans la tique et peut survivre lors des différentes stases larvaire, nymphale et adulte. Cependant une transmission transovarienne du LIV n'a pas été démontrée jusqu'à aujourd'hui [120]. Ce sont surtout les jeunes agneaux au pâturage, ne bénéficiant plus de l'immunité maternelle, qui sont les plus sensibles à l'infection.

Du LIV a été retrouvé dans du lait de brebis, mais la transmission de la mère à l'agneau par cette voie n'a pas été démontrée. En revanche, l'infection de chevreux par du lait contaminé a été démontrée expérimentalement [121].

c) Les symptômes cliniques

Chez le mouton, la maladie évolue suivant un mode bi-phasique avec une première phase fébrile (hyperthermie à 41°C) correspondant à la phase de virémie. S'il y a atteinte du SNC, on observe une méningo-encéphalomyélite avec apathie, refus de déplacement, ataxie et tremblements. Les moutons peuvent en outre souffrir d'un symptôme dénommé « *leaping* » par les Anglais (maladie du bond) caractérisé par des contractions musculaires spasmodiques.

La maladie est généralement mortelle en 24-48h. Chez les survivants, on observe souvent des séquelles nerveuses avec torticolis et/ou parésie des postérieurs [105, 122].

Le LIV est capable d'infecter l'homme et des cas ont été documentés sur des individus en contact avec des animaux (agriculteurs, vétérinaires, bouchers), en l'absence de transmission vectorielle par piqûre de tique à l'homme clairement démontrée [123]. Le tableau clinique est très proche de celui rencontré pour le TBEV avec une méningite bi-phasique typique comme pour le sous type TBEV-Eu [124].

Le risque de contamination de l'homme par le lait cru de chèvre ne peut être totalement écarté.

1.3. Co-circulation, risque d'émergence et systèmes de surveillance des *flavivirus* en Europe

1.3.1. Co-circulation des *flavivirus* en Europe

L'Europe fait face à la circulation de nombreux *flavivirus* aussi bien transmis par les moustiques que par les tiques.

Les *flavivirus* transmis par les moustiques sont très présents en Europe. En particulier, les *flavivirus* responsables d'encéphalite chez l'homme et/ou l'animal comme le WNV, l'USUV et, dans une moindre mesure le BAGV, circulent chaque année activement sur le vieux continent [17] (manuscrit N°1).

Le WNV et l'USUV touchent conjointement de nombreux pays du sud de l'Europe avec un isolement viral avéré de ces deux virus en Espagne, France, Italie, Autriche et Hongrie. L'Espagne a de plus été confrontée récemment à une incursion de BAGV. Enfin, le nombre de pays rapportant des cas d'infection par les WNV (homme, cheval) et USUV (oiseau) sont en constante augmentation. Depuis le début des années 2000, 12 pays de l'Union européenne (UE) ont signalé des cas de WNV par des souches de WNV appartenant aux lignées 1 ou 2 et 9 pays de l'UE ainsi que la Suisse ont mis en évidence la présence de l'USUV, les derniers pays nouvellement infectés par l'USUV ayant été la France en 2015 et les Pays-Bas en 2016.

Les *flavivirus* transmis par les tiques dures et présents en Europe sont des *flavivirus* neurotropes comme le TBEV et le LIV ; d'autres *flavivirus* comme le virus Powassan (POWV) ou le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk (OHFV) sont rapportés en Russie et responsables respectivement de maladies neurologiques et hémorragiques chez les humains et les rongeurs. Le virus Meaban (MEABV) et le virus Tyuleniy (TYUV), transmis par des tiques molles, circulent aussi au sein des oiseaux aquatiques respectivement en Méditerranée et en Russie [105, 125, 126].

La diversité des *flavivirus* transmis par les tiques est de ce fait plus grande en Europe qu'en Amérique du Nord où le POWV est le seul *flavivirus* transmis par les tiques [81].

Sur le continent européen, les aires de répartition du TBEV et LIV diffèrent avec le LIV cantonné principalement au Royaume-Uni et à l'Irlande, pays qui sont pour l'instant indemnes de TBEV. Cependant des anticorps neutralisants ces 2 virus ont été mis en évidence au Danemark [101] et dans la faune sauvage en Norvège [116]. Ce chevauchement des aires de circulation du LIV et du TBEV doit très probablement s'appliquer à d'autres pays européens.

La figure 15 présente une vue d'ensemble de l'aire de circulation des *flavivirus* en Europe.

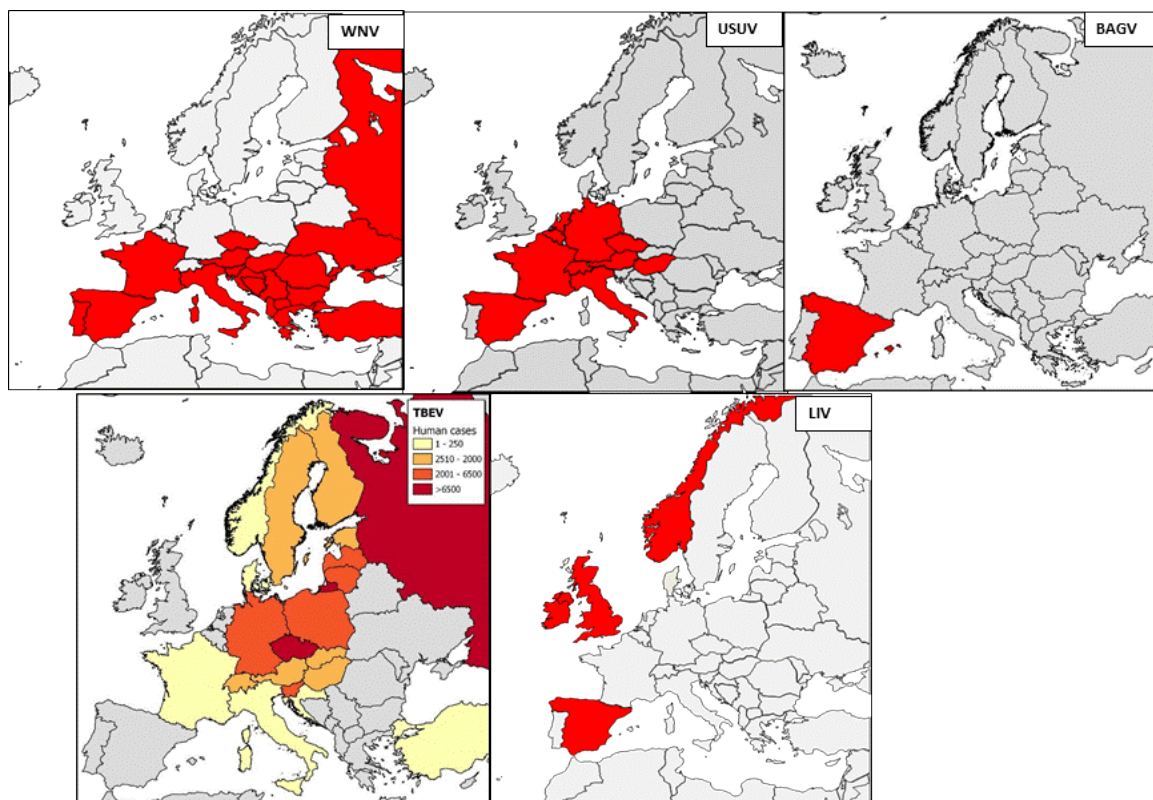


Figure 15 : Représentation de l'aire de circulation des principaux *flavivirus* trouvés en Europe

USUV, WNV, BAGV et LIV : pays pour lesquels des cas ont été détectés (bilan des cartes présentées dans la section 1.2 de ma thèse)

TBEV : bilan des cas humains (période 2000-2009) avec nombre de cas par pays indiqué [17]

Le chevauchement des aires de répartition des différents *flavivirus* en Europe est à l'origine de difficultés dans la mise en place de diagnostics sérologiques spécifiques (cf. 1.5).

1.3.2. Risque de résurgence et/ou d'émergence d'un nouveau *flavivirus* en Europe

Une étude récente menée par l'ECDC (*European Centre for Disease Control*) considère l'introduction de maladies vectorielles comme l'une des huit menaces infectieuses majeures pour l'UE, en « concurrence » par exemple, avec la résistance des bactéries aux antibiotiques ou avec une pandémie grippale [127].

1.3.2.1. *Flavivirus déjà introduits dans l'UE*

Concernant les *flavivirus* transmis par les moustiques, le continent européen a dû faire face à de nombreuses épidémies depuis le début du millénaire comme la résurgence de la lignée 1 du WNV en Roumanie en 1996 [28], Italie en 1998 [29] ou France en 2000 [30], l'émergence de l'USUV en 2001 [56], de la lignée 2 du WNV en 2004 [33] ou du BAGV en 2010 [76].

Les oiseaux sont le réservoir sauvage pour ces trois *flavivirus*. Le continent européen étant positionné principalement sur deux couloirs migratoires, le couloir mer Noire/Méditerranée et le couloir de l'Atlantique-Est (figure 7), l'introduction de ces différents *flavivirus* originaires d'Afrique a vraisemblablement trouvé son origine dans la migration des oiseaux sauvages avec par la suite une extension aux différents pays européens par contamination des oiseaux résidents et des populations locales de moustiques [33, 56, 76, 128].

En ce qui concerne les *flavivirus* transmis par les tiques, ils ont été principalement véhiculés par le déplacement de rongeurs, porteurs de tiques infectées, à partir de la Russie ou de l'Extrême-Orient et se sont dispersés de proche en proche sur de courtes distances vers le sud et l'ouest de l'Europe [105].

Cependant le transport sur de longues distances des *flavivirus* transmis par les tiques est encore assez mal évalué. Dans le cas du TBEV, les espèces sensibles que sont l'homme, les animaux d'élevage (bovins, ovins et caprins) ou les animaux sauvages (daims, sangliers, loups et renards) ne développent pas une virémie suffisante pour infecter de nouvelles tiques durant leur repas sanguin. Certains oiseaux pourraient jouer un rôle dans la dispersion de la maladie lors de leur migration du nord vers le sud de l'Europe [128]. Enfin, l'activité humaine, en particulier les échanges commerciaux d'animaux vivants ou les voyages, sous-tendant le transport de tiques infectées sur des rongeurs, animaux et/ou humains est aussi un facteur à prendre en compte [129]. Quant au LIV, originaire d'Irlande et du Royaume Uni, sa dispersion semble avoir été favorisée essentiellement par le déplacement du bétail associé au commerce d'animaux [81, 130].

1.3.2.2. Analyse du risque d'introduction des JEV, SLEV ou MVEV dans l'UE

D'une manière générale, le risque d'émergence d'une maladie dans un pays indemne résulte de la combinaison de trois composantes :

- Un émetteur, c'est-à-dire une source de virus (qu'il s'agisse d'un réservoir, d'un amplificateur, voire d'un vecteur susceptible d'introduire le virus dans l'UE) ;
- Un moyen de transmission, c'est-à-dire un vecteur compétent dans le cas des arboviroses ;
- Un « récepteur », c'est-à-dire un individu réceptif et éventuellement sensible

Nous analyserons ici uniquement la première composante, soit le risque d'introduction des JEV, SLEV ou MVEV dans l'UE, le risque d'établissement d'un de ces virus étant difficile à estimer car lié à la probabilité de rencontre entre les hôtes amplificateurs des virus dans la zone d'introduction, les

vecteurs locaux compétents et les espèces réceptrices, ainsi qu'à leur compétence et susceptibilité au virus.

Le risque d'introduction comprend le risque d'introduction d'un animal réservoir infecté ou d'un vecteur infecté.

1.3.2.2.1. Introduction via un animal infecté

On peut considérer que le risque d'introduction des JEV, SLEV et MVEV via les oiseaux migrateurs est faible, ceux-ci ne suivant pas de trajet migratoire direct Atlantique Ouest/Europe et les couloirs Australie et Asie centrale étant éloignés des frontières de l'Europe (figure 7).

Un autre risque d'introduction des SLEV, MVEV et JEV résulte du commerce des animaux vivants (oiseaux ou suidés dans le cas du JEV).

Le risque d'introduction du virus JEV dans l'UE a été analysé dans l'article de Benoit Durand et col. [131]. Les données de TRACES (TRAdE Control and Expert System) qui comptabilise les mouvements d'animaux et de produits d'origine animale à destination de l'UE et en provenance de l'extérieur ou au sein de l'UE, ont été obtenues auprès de la commission européenne (DG Santé) et analysées pour la période 2005-2009.

Cette étude a permis de montrer qu'aucune volaille ni aucun porc n'avait été importé en Europe depuis l'Asie du sud-est entre 2005 et 2009. Le risque d'introduction du JEV par ce biais est donc très faible.

Dans le même article, il a été montré qu'entre 2005 et 2009 aucune volaille n'avait été importée d'Australie, zone à risque pour le MVEV mais qu'en revanche environ 17 millions de volailles ou autres oiseaux avaient été importés d'Amérique vers le continent européen. Il y a donc un risque mal évalué d'introduction du SLEV par ce biais.

1.3.2.2.2. Introduction via un vecteur infecté

Le risque d'introduction via les transports de vecteurs infectés est difficilement quantifiable. L'amplification des *flavivirus* SLEV, MVEV et JEV doit obligatoirement se faire sur une espèce réservoir compétente. La probabilité qu'un *Culex* infecté importé des Etats-Unis ou d'Asie puisse transmettre la maladie à la population résidente des oiseaux et/ou porcs semble de ce fait très faible.

On peut cependant remarquer que l'analyse du risque d'introduction dans l'UE augmente considérablement avec d'autres *flavivirus* comme le virus Zika ou le DENV qui n'ont plus de réservoir animal et dont le vecteur *Aedes albopictus* est non seulement présent mais s'étend progressivement dans les aires urbanisées d'Europe. Des cas de Dengue autochtones sont ainsi régulièrement reportés

dans le sud-est de la France depuis 2010 [132], ce qui laisse présager une augmentation du nombre de cas humains dans l'UE dans les années à venir.

En conclusion, la dynamique actuelle des infections à *flavivirus*, avec la diffusion de différents *flavivirus* transmis par des moustiques et des tiques en Europe ainsi que le risque d'émergence d'un nouveau *flavivirus* venant d'un pays proche ou éloigné à la faveur de la globalisation des échanges internationaux plaident en faveur d'un système de surveillance adapté.

1.3.3. Différents systèmes de surveillance

Les systèmes de surveillance en Europe sont de deux types :

- événementiel avec la détection de marqueurs de l'infection chez les humains, les chevaux ou les oiseaux morts à la suite de symptômes nerveux.
- actif avec la mise en place d'un réseau spécifique pour la détection des séroconversions sur oiseaux, chevaux ou autres animaux ou la détection du virus dans les moustiques collectés.

Quel que soit le système de surveillance adopté, l'approche est obligatoirement pluridisciplinaire et concerne un volet humain, équin (si le cheval est un hôte sensible pour le *flavivirus* considéré), aviaire et entomologique.

En Europe, la plupart des systèmes de surveillance mis en place sont principalement événementiels avec une surveillance des cas neurologiques chez les humains et les chevaux pour le WNV qui sont renforcés dans les zones à risque pendant la période de circulation des vecteurs (juin-octobre pour la France). A cela s'ajoute parfois, comme c'est le cas pour la France, un suivi des mortalités anormales d'oiseaux (c.à.d. en priorité les corbeaux, pies, merles, moineaux ainsi que les rapaces nocturnes ou diurnes), système décrit comme le plus sensible pour la détection des WNV et USUV en Europe [49]. Un volet entomologique avec piégeage des moustiques ou autres arthropodes vecteurs, identification et comptage est souvent ajouté à cette surveillance.

Certains pays européens comme l'Italie et la Grèce avec des foyers de WNV rencontrés chaque année déploient, dans les zones et pendant la saison à risque, une surveillance active comprenant le suivi et des prélèvements réguliers d'oiseaux sentinelles (canards, poules ou pigeons généralement), de chevaux ou autres animaux pour détecter au plus près une éventuelle séroconversion de ces animaux, séroconversion prédictive d'un épisode WNV à venir chez l'homme ou le cheval [133, 134]. Le suivi des oiseaux sentinelles étant très contraignant, onéreux et peu sensible quand la prévalence

de la maladie est faible, il a été mis en place en France en 2001 dans le cadre de la surveillance WNV puis arrêté en 2007.

Au niveau français, les protagonistes des volets humain et entomologique de la surveillance WNV sont l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), l'Entente interdépartementale de Démoustication (EID), Santé Publique France (SPF, anciennement dénommée Institut de Veille Sanitaire, InVS) et les agences régionales de santé (ARS) sous l'autorité de la direction générale de la santé (DGS).

Entre le 1^{er} juin et le 31 octobre, une surveillance humaine coordonnée par Santé publique France vise à détecter les formes sévères neuro-invasives dues au WNV grâce à la participation des cliniciens et biologistes des 9 départements méditerranéens (Bouches-du-Rhône, Gard, Hérault, Haute-Corse, Corse-du Sud, Alpes-Maritimes, Var, Aude, Pyrénées-Orientales). Elle est complétée par une recherche systématique du WNV par l'IRBA (CNR arbovirus) sur des prélèvements provenant de la surveillance du Chikungunya (CHIK), Dengue (DEN) et Zika en zone d'implantation d'*Aedes albopictus*.

Le volet animal est coordonné par la direction générale de l'alimentation (DGAL) en lien avec les directions départementales de la protection des populations (DDPP), l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES, laboratoire de référence WNV), les vétérinaires cliniciens, le réseau d'épidémiologie-surveillance en pathologie équine (RESPE) qui est un système de surveillance passif basé sur la déclaration de vétérinaires sentinelles distribués dans de nombreux départements français, les laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) formant un réseau pour la détection en première intention des cas équins et aviaires d'infection et l'office national de la faune sauvage (ONCFS) pour les mortalités rapportées dans la faune sauvage [135].

Quel que soit le système de surveillance mis en place, il doit être suffisamment sensible pour détecter l'émergence ou la résurgence d'une maladie avant la survenue de cas humains et spécifique pour déterminer avec précision l'agent pathogène en cause. L'objectif final de ce système est l'anticipation de la survenue de la maladie afin de mettre en place rapidement des actions de lutte pour diminuer l'impact de la maladie chez l'homme et l'animal. Nous aborderons en partie 1.5 de cette thèse la difficulté du diagnostic sérologique des infections à *flavivirus* et des problèmes que cela soulève pour une surveillance efficace des maladies concernées.

1.4. Aspects virologiques et cliniques des *flavivirus* : exemple du WNV

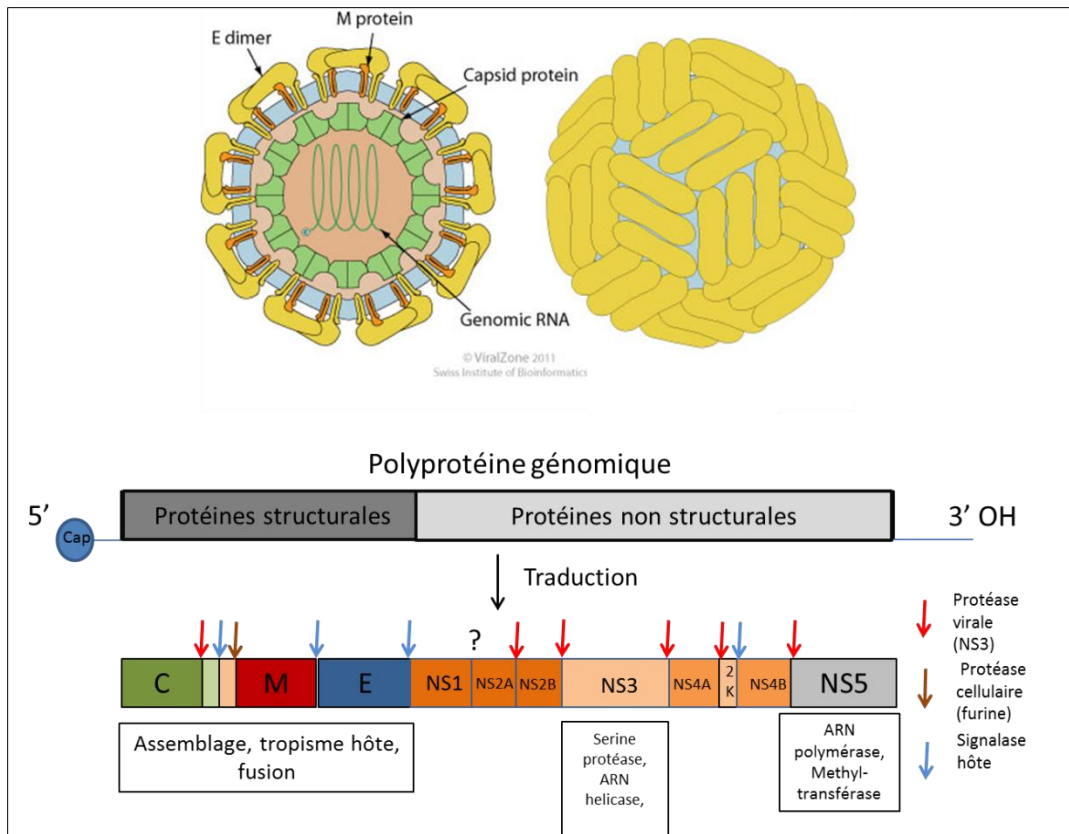
Nous axerons cette partie sur le WNV qui est un *flavivirus* neurotrope d'importance majeure en santé humaine et animale et qui, de plus, a été très étudié au niveau de sa structure et de ses interactions avec l'hôte.

1.4.1. Organisation du génome et biologie

1.4.1.1. Le génome viral

Les virus du genre *flavivirus* partagent de nombreux points communs entre eux. Ce sont des virus enveloppés, d'une taille de 40-65 nm, avec une nucléocapside à symétrie icosaédrique et un génome viral constitué d'un ARN simple brin de polarité positive [136]. Ce génome est d'environ 10 800 nucléotides et présente un seul cadre ouvert de lecture, c'est-à-dire un seul segment codant en une unique polyprotéine l'intégralité des protéines virales, à savoir trois protéines structurales : la protéine C (capside), la protéine prM (précurseur de la protéine M de membrane) et la protéine E (enveloppe), mais aussi sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Il est coiffé à son extrémité 5' (7-methylguanosine) et non polyadénylé en 3'. Les régions non codantes 5' (environ 100 nucléotides) et 3' (environ 700 nucléotides) sont conservées et forment des structures secondaires en épingles à cheveux, nécessaires pour la réplication et la traduction de l'ARN viral (figure 16) [137].

La polyprotéine virale est clivée pendant et après la traduction par des protéases virales et cellulaires. Le premier tiers de la polyprotéine code pour les protéines structurales (C, prM, E) et les deux tiers restants codent pour les protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5).



1.4.1.1.1. Les protéines structurales

Les protéines structurales sont nécessaires à l'encapsidation par la protéine C de l'ARN viral et aux interactions de la particule virale avec la cellule cible (reconnaissance des récepteurs, interaction et fusion de la protéine d'enveloppe E avec les membranes cellulaires).

- La protéine de capsid (C)

La protéine de capsid est une petite protéine très basique (11kDA). Le domaine C terminal sert de peptide signal pour la translocation au RE de la protéine de membrane (M).

- La protéine de membrane (M)

La protéine M provient d'un précurseur glycoprotéique de 26 kDa (prM). Sa région N terminale contient 1 à 3 sites de glycosylation et six résidus cystéine conservés qui forment des ponts disulfures [139]. La fonction principale de prM est de protéger la protéine d'enveloppe E pendant l'exocytose des particules virales lors du transport du virion immature dans le Golgi, en particulier d'éviter le réarrangement de E sous pH acide qui entraînerait l'exposition prématurée de son peptide de fusion. Les virions immatures sont recouverts par des complexes d'hétérodimères de prM-E. La conversion des particules immatures en particules matures coïncident ainsi avec le clivage protéolytique de prM en deux fragments, pr et M par la furine présente dans le Golgi. L'environnement acide induit un changement structural irréversible de prM qui rend les sites de clivage accessibles à l'enzyme [140]. Suite au clivage, pr est relarguée et des homodimères de E se forment (figure 17).

- La protéine d'enveloppe (E)

La protéine E est une protéine hautement glycosylée dont le poids moléculaire (PM) est de 53 kDa. Elle est constituée d'une partie soluble (sE : forme soluble de E) et d'un ancrage membranaire. sE est divisée en trois domaines structuraux (DI, DII et DIII) qui sont séparés par des articulations flexibles et organisés sous forme d'homodimères antiparallèles dans les virions matures (figure 17).

DI est le domaine central, permettant l'articulation des DII et DIII. DII a une forme de doigt allongé et contient un peptide de fusion hydrophobe qui est impliqué dans la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes endosomales; ce domaine, très conservé chez tous les *flavivirus*, est situé entre les acides aminés (AA) 70 et 115 de la protéine E (AA1-AA405). Lors de l'acidification du milieu suite à la formation de la vésicule d'endocytose (cf. 1.4.1.2), les homodimères de E se dissocient en monomères puis se réorganisent en trimères avec les peptides de fusion du DII exposés vers la membrane avec laquelle la particule virale va fusionner (figure 17).

DIII a une forme proche de celle des immunoglobulines et est impliqué dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires (c.f partie 1.4.2)[141, 142].

Les études visant à caractériser les anticorps monoclonaux anti-E ont permis de montrer que la plupart des épitopes B localisés sur DI et DIII étaient communs aux souches de WNV mais distincts des autres *flavivirus* [143]. En revanche les épitopes reconnus par les anticorps responsables des réactions croisées entre *flavivirus* sont localisés au niveau de DII (en particulier au niveau de la boucle de fusion) [144, 145].

La majorité des anticorps neutralisants produits chez l'hôte infecté ou immunisé sont dirigés contre DIII [146-148]. Il a ainsi été montré que la résistance aux anticorps neutralisants était corrélée à des mutations dans cette région. [143, 145, 149].

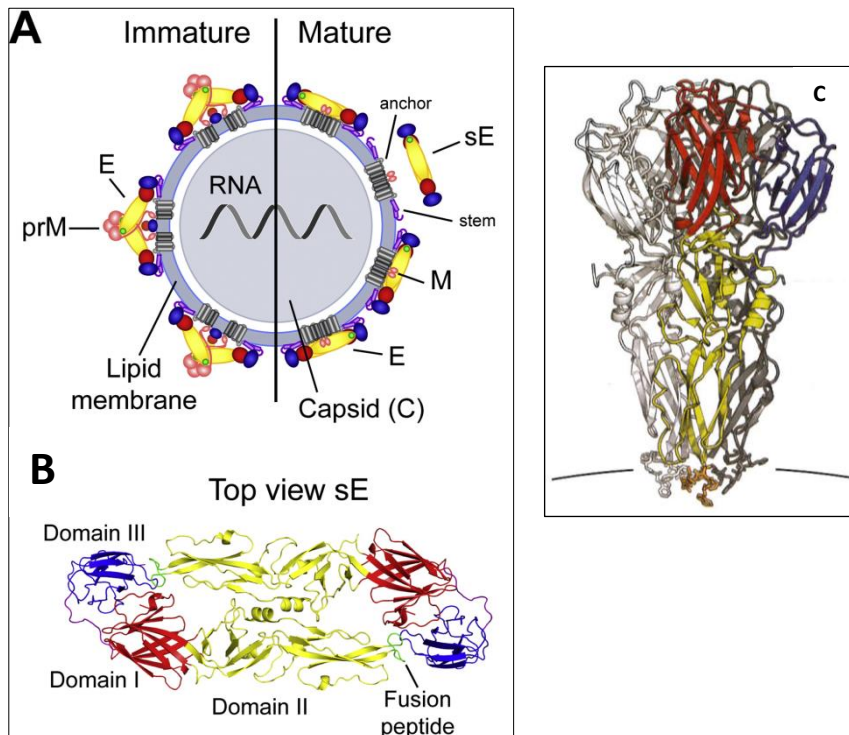


Figure 17: Représentation schématique de la particule de *flavivirus* et de la protéine E

A) Représentation schématique de la particule de *flavivirus* A gauche : virion immature ; à droite : virion mature. Les virions immatures sont recouverts par des complexes de 60 trimères d'hétérodimères de prM-E. Le clivage protéolytique de prM résulte en une réorganisation de la protéine E et la formation d'un virion lisse recouvert de 90 homodimères de E ; sE : forme soluble de E sans l'ancrage membranaire et la séquence cytoplasmique adjacente.

B) Représentation en vue de dessus de la structure de la protéine d'enveloppe (forme homodimérique présente à la surface des particules virales matures), organisée en trois domaines (DI rouge, DII jaune et DIII bleu ainsi que le peptide de fusion vert) [150].

C) Représentation de la forme trimérique de E lors de l'étape de fusion aux endosomes. Sous l'effet de l'acidification de l'endosome, les peptides de fusion, en orange, sont exposés vers la membrane de l'endosome [137].

En étudiant les mutants viraux d'échappement à l'action d'anticorps monoclonaux neutralisants d'une souche de WNV lignée 1, Beasley et al ont mis en évidence que les mutations étaient ponctuelles et avaient lieu en particulier sur les AA307 (Lys pour Arg) et AA330 (Thr pour Ile) localisés sur DIII (figure18) [149].

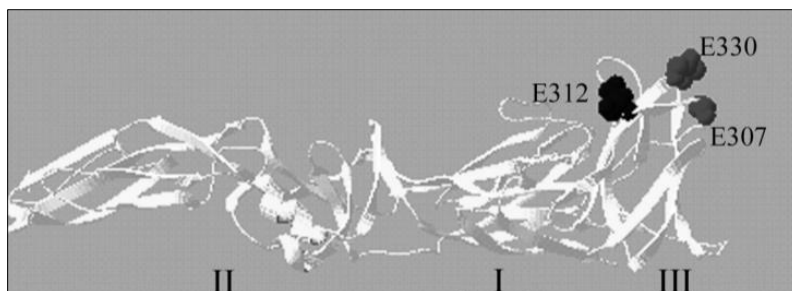


Figure 18 : Localisation des AA307 et AA330 (E307 et E330) sur la glycoprotéine E du WNV dont les mutations sont associées à l'échappement du virus aux anticorps monoclonaux neutralisants [149]

1.4.1.1.2. Les protéines non structurales

Les protéines non structurales jouent un rôle dans la réplication virale, l'assemblage des virions et l'échappement à la réponse antivirale de l'hôte.

- NS1

La protéine NS1 est une glycoprotéine de 46-55 kDA (en fonction de son état de glycosylation), transloquée vers le RE pendant sa synthèse et clivée de la protéine E par une signalase cellulaire et de NS2A par une protéase cellulaire non identifiée [151, 152].

La protéine NS1 est unique car elle est absente du virion mature, existe sous différentes formes conformationnelles et peut avoir trois localisations : soit retrouvée dans des vésicules à l'intérieur des cellules infectées, soit localisée à la surface cellulaire (dans ces deux localisations elle est sous une forme dimérique), soit enfin sécrétée dans le milieu extérieur où elle acquiert une forme hexamérique [153]. La forme intracellulaire est centrale dans la réplication virale alors que les formes membranaire et sécrétée interviennent dans la régulation de la réponse immunitaire.

Sous sa forme intracellulaire, elle est localisée dans les sites de réplication de l'ARN viral [154]. Même si son rôle dans la réplication de l'ARN n'est pas clairement défini, des mutations sur son site de glycosylation peuvent entraîner des défauts dans la réplication de l'ARN viral et la production virale [155].

La protéine NS1 joue un rôle important dans l'immunité protectrice contre les *flavivirus* en inhibant en particulier les différentes voies du complément (cf. 1.4.3.2).

Durant l'infection, une réponse humorale forte a lieu à l'encontre de cette protéine. Comme la protéine NS1 n'est pas un composant du virion, les anticorps produits contre cette protéine ne sont pas neutralisants. On pense que les anticorps anti-NS1 se fixent aux protéines NS1 exprimées à la surface cellulaire formant un complexe Ag/Ac. Celui-ci induit la phagocytose des cellules infectées par les cellules spécialisées de l'immunité du fait de l'interaction entre le complexe Ag/Ac et les

récepteurs Fc γ (Fc γ pour fraction cristallisable gamma, récepteur de la partie Fc des IgG) (cf. 1.4.3.2) [156, 157].

Une forme plus longue de la protéine NS1, appelée NS1', est le résultat d'un décalage ribosomique du cadre de lecture en 5' de NS2A et est détectée lors d'infections par les membres du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise [158] et DENV [159]. Ce décalage résulte dans l'addition de 52 acides aminés (AA) supplémentaires à la protéine NS1 et augmente la capacité de neuro-invasion des virus [158].

- NS2A et NS2B

NS2A est une petite protéine hydrophobe de 22kDa. Elle est localisée dans les sites de réplication virale au niveau du RE et interagit avec les protéines NS3 et NS5 ainsi qu'avec la région 3' NC de l'ARN génomique [160]. Elle coordonne la réplication et l'empaquetage de l'ARN viral.

NS2B est aussi une petite protéine (14kDa) associée à la membrane du RE. Elle forme un complexe stable avec NS3 et agit comme cofacteur du domaine protéase de NS3 [161].

- NS3

NS3 est une grosse protéine (70kDa) multifonctionnelle impliquée dans la réplication et le clivage de la polyprotéine virale. La partie N-terminale de la protéine comporte le domaine catalytique du complexe serine protéase de NS2B/NS3 et la partie C-terminale a des activités nucléoside triphosphatase (NTPase) et hélicase [138]. Le domaine catalytique de la protéase NS3 clive les jonctions NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4B/NS5 et est impliqué dans la maturation des régions C-terminales de la protéine de capsid [162] et NS4A [163].

La protéine NS3 possède également une activité ARN triphosphatase (RTPase) qui lui permet de déphosphoryler la partie 5' de l'ARN avant ajout de la coiffe [164]. Enfin, la protéine NS3 semble jouer un rôle dans l'effet cytopathique des *flavivirus* et induire l'apoptose par activation de la caspase 8 [165].

- NS4A, 2K et NS4B

NS4A et NS4B sont de petites protéines hydrophobes (16 et 27kDa) séparées par le peptide 2K. Celui-ci sert de séquence signal à la translocation de la protéine NS4B dans la lumière du RE [163].

Les protéines NS4A et NS4B font partie du complexe de réplication, ce qui suggère le rôle de ces deux protéines dans la réplication virale [160]. Il a d'ailleurs été montré qu'une mutation dans la partie C-terminale de NS4B réduisait la vitesse de réplication de l'ARN viral [166].

- NS5

NS5 est une protéine de 103 kDa hautement conservée et multifonctionnelle. C'est l'ARN polymérase ARN dépendante nécessaire à la réplication de l'ARN viral dans le RE [138]. Elle possède de plus une activité méthyltransférase (MTase) nécessaire à l'ajout de la coiffe [137, 167]

1.4.1.2. Le cycle viral

Le cycle de réplication des *flavivirus* débute par l'attachement de la glycoprotéine E à des récepteurs membranaires qui ne sont pas formellement identifiés. Le TLR3 [168], DC-SIGN et DC-SIGNR [169], la protéine de liaison à la laminine [170], l'intégrine $\alpha_v \beta_3$ [171] sont des candidats potentiels. Après internalisation du virus par endocytose, l'acidification dans l'endosome entraîne la modification conformationnelle de la protéine E, l'exposition du peptide de fusion, la fusion de l'enveloppe à l'endosome et la libération de la capside virale dans le cytoplasme. L'ARN viral est immédiatement traduit en une polyprotéine qui est clivée par les protéases virales et cellulaires (cf. 1.4.1). Les protéines virales forment un complexe de réplication (RC) au niveau du RE dans lequel débute la synthèse par la protéine NS5, à partir de l'ARN génomique de polarité positive, d'un brin d'ARN de polarité négative qui sert ensuite de base pour la synthèse de nombreux néo-ARN génomiques. La réplication est couplée à la traduction et à l'assemblage des protéines structurales en néo-particules. L'acquisition de l'enveloppe se fait par bourgeonnement du virion au niveau du RE. Une fois le bourgeonnement réalisé, il y a formation de particules virales immatures avec un aspect hérissé correspondant à l'insertion d'hétérodimères prM-E dans l'enveloppe virale. La maturation des virions se déroule lors du transit dans les compartiments acides du Golgi où a lieu le clivage de prM en M par les protéases furine d'origine cellulaire, ce qui donne un aspect lisse à la particule virale [150]. Enfin, les virions matures sont libérés de la cellule hôte par exocytose (figure 19).

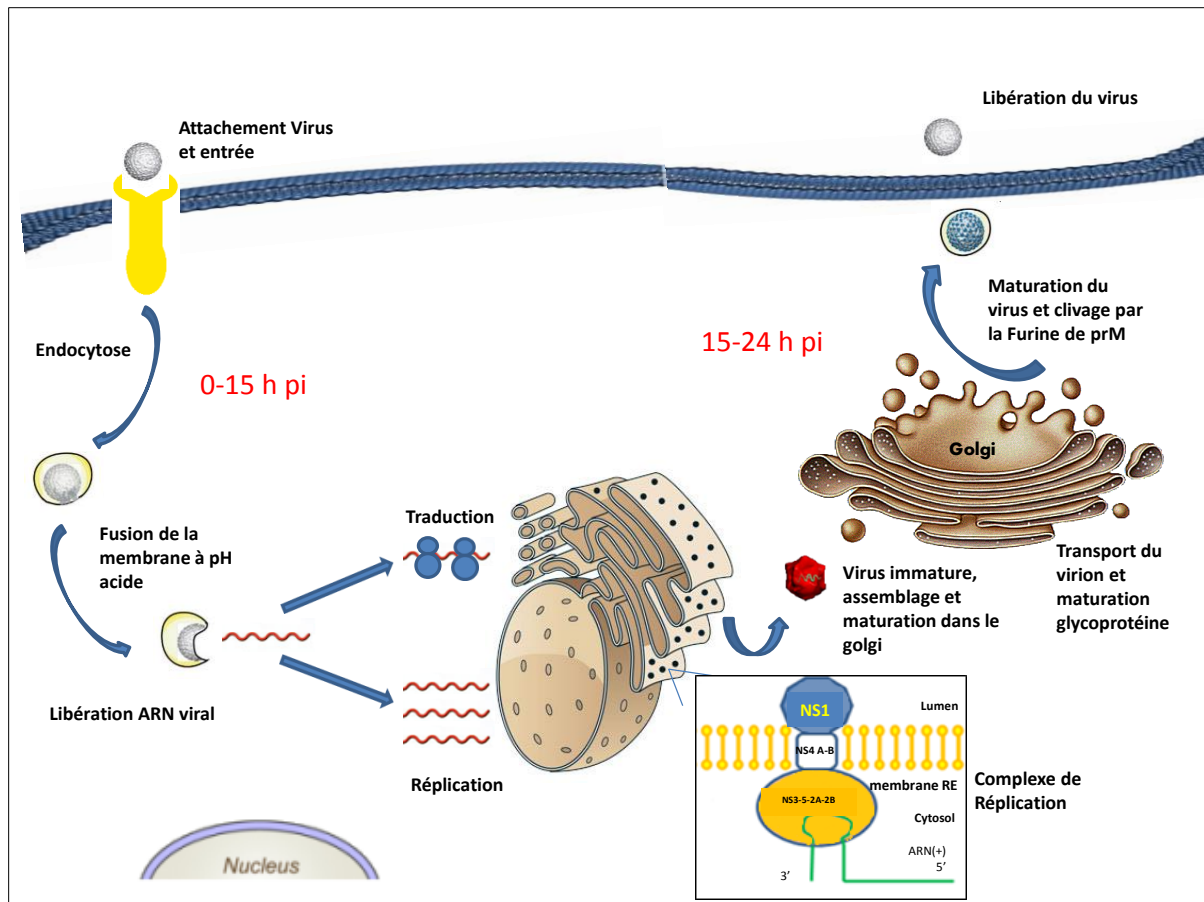


Figure 19: Cycle de réplication virale des flavivirus.

En encadré, représentation du complexe de réplication au niveau du RE avec les protéines non structurales [25].

1.4.2. Infection des insectes, mammifères et oiseaux

1.4.2.1. Insectes

Après un repas sanguin sur un oiseau virémique (virémie $> 10^5$ PFU/ml pour infecter un moustique *Culex pipiens*) (1- figure 20), le WNV infecte, se réplique et est excrété par les cellules épithéliales mésentériques (2- et 3- figure 20). Dans un second temps, le virus se réplique dans les adipocytes (4- figure 20), impliquant une infection systémique de l'insecte, une atteinte via l'hémolymphe des glandes salivaires (5- figure 20) et une forte réplication et production virale dans la salive (6- figure 20). Il faut une à trois semaines d'incubation extrinsèque dans le moustique pour que celui-ci puisse contaminer des mammifères ou des oiseaux suite à un repas sanguin.

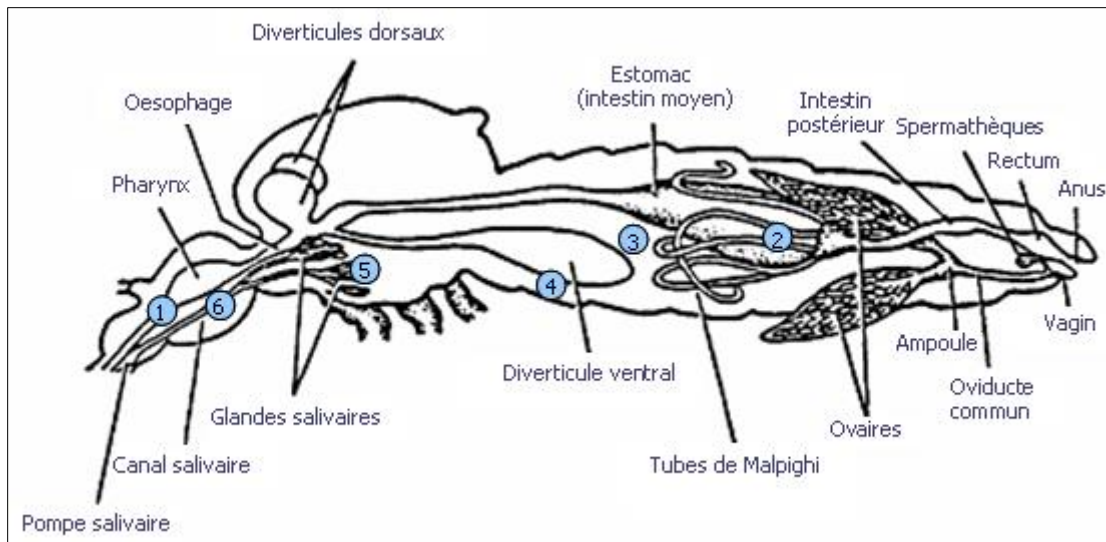


Figure 20 : différentes étapes de transport du *flavivirus* dans le moustique

(1) repas sanguin ; (2-3) cellules épithéliales mésentériques ; (4) cellules graisseuses ; (5) glandes salivaires ; (6) salive (Philippe Desprès, cours de l'Institut Pasteur).

1.4.2.2. Mammifères

Après piqûre d'un moustique infecté, le WNV se réplique localement au site d'inoculation dans les kératinocytes [172] les cellules de Langerhans (LCs) et les cellules dendritiques dermales de la peau (DCs). Les DCs infectées présentent l'antigène via le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) et migrent au ganglion lymphatique loco-régional où la présentation de l'antigène aux lymphocytes T entraîne une expansion leucocytaire [173] (figure 21). A ce stade, l'infection et le risque de dissémination du virus sont contrecarrés par la réponse innée de l'hôte (cf. 1.4.3.1).

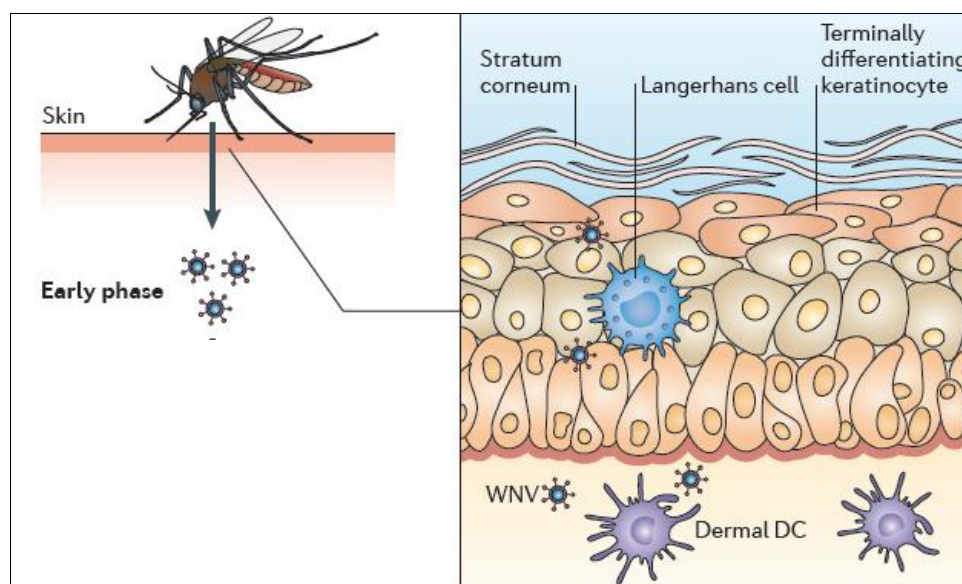


Figure 21 : Etapes précoces de l'infection virale après piqûre par un arthropode hématophage [174]

Skin : peau ; early phase : phase précoce ; Langerhans cell : cellules de langerhans ; Terminally differentiating keratinocyte : kératinocyte différencié terminal ; Demal DC : cellules dendritiques du derme

On observe ensuite une virémie fugace de 3 -4 jours et l'infection des organes périphériques incluant des organes permissifs (rate) et non permissifs (foie et rein). A 4 jours post infection (pi), la réplication virale atteint son maximum dans la rate et le sérum. La clairance du virus du sang et des organes périphériques a lieu environ 7 jours pi et le virus infectieux n'est alors plus détecté que dans le cerveau et la moelle épinière, à la condition d'une réplication périphérique intense [174].

Le mécanisme exact de l'entrée du WNV dans le système nerveux central (SNC) n'est pas élucidé mais 5 modèles peuvent être proposés qui s'appuient sur l'anatomie de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (figure 22).

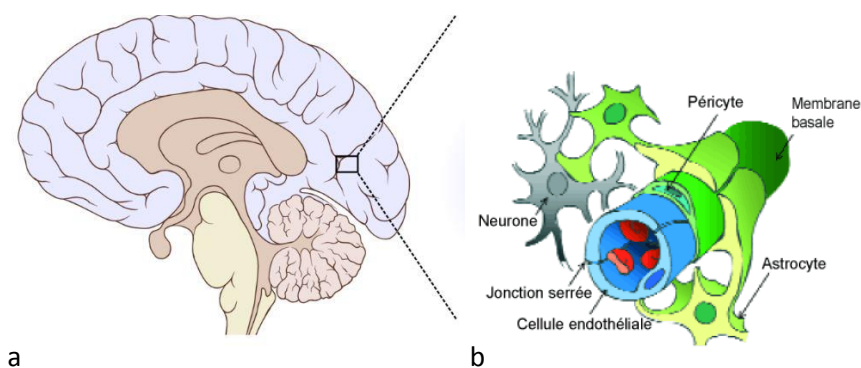


Figure 22 (a) Représentation schématique du cerveau et (b) agrandissement de la barrière hémato-encéphalique (d'après https://tpeoem.wordpress.com/effet_sur_lhomme/).

Les cellules endothéliales forment des jonctions serrées. Les vaisseaux sanguins sont entourés par les pieds des péricytes et des astrocytes isolant les neurones.

- Une entrée à travers la BHE via des leucocytes infectés (mécanisme dénommé cheval de Troie) [175].
- Un passage direct de la barrière hémato-méningée après que son intégrité a été compromise par l'action du Tumor necrosis factor (TNF α) ou de la métalloprotéinase MMP9 induisant des modifications dans la perméabilité capillaire [176].
- Une infection directe des cellules endothéliales des capillaires cérébraux [177].
- Une infection ou un transport passif à travers les cellules épithéliales des plexus choroïdes dont la fonction est la production du liquide céphalo-rachidien (LCR) [178].
- Une infection du WNV via la voie neuronale par l'infection de neurones olfactifs et/ou transport axonal dans le sens rétrograde [179]. Ce dernier transport axonal favorise l'entrée dans le SNC à partir d'une inoculation périphérique à proximité de liaisons nerveuses et la paralysie flasque aiguë d'un membre.

Dans un modèle expérimental d'infection, chez le hamster, le WNV est présent 4-5 jours après infection dans de multiples sites du cerveau et de la moelle épinière. Des foyers d'infection neuronale sont observés dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet, les noyaux gris centraux ou encore la corne antérieure de la moelle épinière [180].

L'infection neuronale est associée à une dégénérescence neuronale, une perte de l'architecture cellulaire et une apoptose dépendante de la caspase 3. L'apoptose contribue vraisemblablement au dysfonctionnement du SNC et à la sévérité des formes neuro-invasives de WNV même si son importance dans la pathogénie des infections est encore débattue. De plus, une mort cellulaire par nécrose, qui dépend de la dose infectieuse, peut aussi être observée [181, 182]. Les neurones et les cellules gliales qui sont infectés par le WNV subissent une mort cellulaire et libèrent des molécules inflammatoires (IL1- β , IL6, IL8, TNF α ...) qui ont potentiellement des effets toxiques sur les neurones non infectés.

Plus tard, au cours de l'infection, des infiltrats de cellules mononuclées peuvent être observés au niveau des régions infectées (figure 23), cellules qui libèrent des cytokines proinflammatoires détruisant les cellules infectées par le WNV mais contribuant aussi à la pathogénie du virus par leur action toxique sur le SNC.

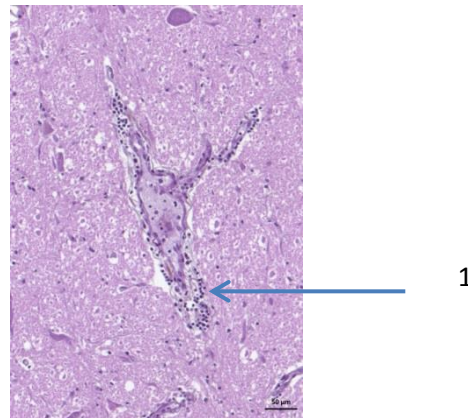


Figure 23 : Moelle allongée d'un cheval mort de WNND pendant l'épizootie 2015 en Camargue
Coupe histologique colorée en hémalaun-éosine-safran : 1= manchon lymphocytaire périvasculaire (photo Eve Laloy).

1.4.2.3. Oiseaux

Concernant les oiseaux, peu d'informations sont disponibles sur les stades précoces de l'infection. On suppose que le WNV se multiplie au site d'inoculation et qu'il est ensuite distribué à tous les organes par voie lymphatique et sanguine. Le virus peut être détecté 30 à 45 minutes (généralement une journée) dans le sang après la piqure d'un moustique infectant suggérant qu'il n'y a pas comme pour

les hôtes mammifères besoin d'une répllication locale. La virémie et la distribution dans les organes varient largement entre les espèces d'oiseaux. Le WNV peut infecter tous les organes vitaux de l'oiseau avec comme organes les plus fréquemment infectés : le foie, la rate, les reins, la peau et l'encéphale. Le WNV atteint le SNC par voie sanguine par le biais de l'infection des cellules endothéliales ou des cellules immunitaires infectées [183]. Bien que la connaissance soit faible concernant les défenses immunitaires des oiseaux vis-à-vis du WNV, il est classiquement considéré que leur système immunitaire favoriserait la persistance virale.

1.4.3. Réponse antivirale de l'hôte vertébré : illustration avec le WNV

La sévérité des symptômes due au WNV est augmentée chez les patients immunodéprimés, ce qui suggère un rôle essentiel de l'immunité pour contrôler l'infection.

La réponse innée est le premier mécanisme de défense contre l'invasion d'un pathogène. Il alerte les cellules spécialisées de la présence d'un pathogène et ainsi tente de retarder l'infection jusqu'à ce que le système immunitaire adaptatif soit actif. La réponse immunitaire innée inclut la défense immunitaire antivirale intrinsèque à la cellule, la réponse cellulaire innée impliquant les neutrophiles, les cellules natural killer (NK), les lymphocytes T γ/δ intra-épithéliaux et la voie du complément.

1.4.3.1. L'immunité innée intrinsèque à la cellule

Cette défense implique la production d'interféron (IFN), cytokine clé de la régulation de la réponse immunitaire innée. Les IFN sont des cytokines immuno-modulatrices produites en réponse à l'infection virale.

Les IFN de type-I comprennent les IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω et reconnaissent un récepteur commun à la surface cellulaire, le récepteur à l'IFN α/β (IFNAR) [184] constitué d'un hétérodimère de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. Les IFN- α/β sont les mieux caractérisés et sont produits par la plupart des types cellulaires.

L'IFN de type II (IFN- γ ou gamma) a comme récepteur le récepteur à l'IFN gamma. Il est produit par des cellules spécialisées de la réponse immunitaire innée (*natural killer* (NK) et les lymphocytes T γ/δ intra-épithéliaux) et une fois la réponse adaptative installée, par les lymphocytes T CD8+ et par les lymphocytes T CD4+ Th1. C'est un activateur important des macrophages et il induit l'expression du CMH II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, favorisant la présentation des antigènes

viraux captés par phagocytose ou pinocytose. Il joue un rôle dans le contrôle précoce de la dissémination du WNV [185].

L'IFN type III (IFN- λ ou lambda) cible un récepteur hétérodimérique différent des IFN type I et II et qui est restreint aux cellules d'origine épithéliales. Néanmoins si les récepteurs sont différents entre les IFN type I et III, ils activent chez une large variété de cellules cibles la même cascade de signalisation conduisant à un état antiviral [186].

1.4.3.1.1. Principes généraux de la stimulation et régulation de la voie IFN type I

L'induction de la réponse IFN de type I par les virus, dont le WNV, démarre après la reconnaissance par la cellule d'un signal de danger. De nombreux récepteurs connus sous le nom de PRR (*Pathogen recognition receptor*) comprenant entre autre les *Toll-Like receptors* (TLRs) mais aussi le *Retinoic acide inducible gene 1 protein* (RIG1) et le *Melanoma-differentiation associated gene 5* (MDA5) sont impliqués dans l'identification de signaux générés lors de l'invasion d'un pathogène ou lors de stress cellulaire. Les PRR les plus étudiés sont les TLR.

1.4.3.1.1.1. Récepteurs cellulaires TLR et RLR et synthèse des IFN de type I

Les TLR sont constitués de 11 glycoprotéines transmembranaires, homologues des récepteurs Toll identifiés chez la drosophile, qui sont présentes à la surface externe des cellules ou sur les membranes internes comme les endosomes [187] ou les lysosomes. Chaque TLR possède un domaine reconnaissant les motifs spécifiques des pathogènes et un domaine cytoplasmique (TIR) activant la voie de signalisation. Les TLR reconnaissent une large variété de ligands incluant les peptidoglycanes bactériens (TLR1, 2 et 6), l'ARN double brin (TLR3), l'ADN (TLR9), l'ARN simple brin (TLR7 et 8) ou le lipopolysaccharide (TLR4) [188]. Trois membres de cette famille (TLR 3, 7 et 8) sont donc impliqués dans la reconnaissance des ARN viraux. Il a d'ailleurs été démontré que TLR 3 et 7 sont primordiaux pour la détection du WNV conduisant entre autre à la production d'IFN et à la protection cellulaire contre l'infection [189, 190].

Quand le TLR rencontre un ligand, son domaine TIR intracellulaire active des protéines telles que MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) ou TRIF (*TIR containing adaptator inducing IFN β*) qui vont elles-mêmes activer des facteurs de transcription comme NF- κ B, des facteurs de régulation de l'IFN (IRF) comme l'IRF3 et entraîner la production de molécules pro-inflammatoires et d'IFN type I (INF- α , INF- β , INF- ϵ , INF- ω)[191] (figure 23).

Un groupe de récepteurs identifié plus récemment peut entraîner la synthèse des IFN de type I, en particulier en réponse à une infection par un virus à ARN, il s'agit des récepteurs de la famille *RIG1-like receptor* (RLR). Ce groupe est constitué de 3 membres, RIG1, MDA5 et le *Laboratory of Genetics and Physiology protein 2* (LGP2), tous localisés dans le cytoplasme. RIG1 et MDA5 reconnaissent des ARNdb différents [192]. RIG1 reconnaît préférentiellement des ARNdb avec un 5' triphosphate [193]. MDA5 semble plus spécifique des fragments d'ARN de haut poids moléculaire. LGP2 enfin n'est pas capable d'induire la cascade produisant les IFN de type I mais semble être un régulateur de RIG1 et MDA5. Ces deux récepteurs sont aussi impliqués dans la détection du WNV et la mise en place rapide de l'immunité innée cellulaire [194].

TLRs et RLRs activent des voies de signalisation qui conduisent à l'activation des facteurs de transcription IRF3 /IRF7 et NF- κ B conduisant à la synthèse des IFN (figure 23).

1.4.3.1.1.2. Amplification de la réponse IFN de type I

Le potentiel de ces cytokines comme antiviral à large spectre a été rapidement suspecté après leur découverte en 1957 et ces molécules ont depuis lors été largement utilisées pour le traitement des maladies infectieuses virales [195, 196]. Ils sont responsables de l'induction d'un ensemble de gènes acteurs de la réponse antivirale cellulaire : les ISG (*Interferon Stimulated Genes*).

Suite à l'activation des récepteurs IFNAR par l'IFN de type I, deux kinases JAK1 et Tyk2 associées aux domaines cytoplasmiques des récepteurs IFNAR sont phosphorylées et transmettent le signal aux facteurs de transcription STAT1 et STAT2 qui sont phosphorylés à leur tour. Cette cascade d'activation résulte en la translocation dans le noyau d'un complexe trimérique appelé facteur 3 de transcription (ISGF3) constitué de STAT1, STAT2 et IRF9 qui se fixe aux éléments de réponse ISRE (*IFN Stimulated Response Elements*) présents dans le promoteur des ISG. Cette fixation d'ISGF3 sur l'ISRE induit la transcription de plus d'une centaine de gènes ISG (figure 24). Les protéines synthétisées ont une activité antivirale et antiproliférative directe et limitent la réplication et la diffusion virale à d'autres cellules [197].

Le rôle de l'IFN n'est pas limité à l'induction d'un état cellulaire antiviral. Il participe aussi à la maturation et au trafic des cellules dendritiques, à l'activation directe des lymphocytes T et B, à la commutation isotypique [198] ainsi qu'à la prévention de la mort des cellules T nouvellement activées [199]. Enfin des articles récents suggèrent que les IFN- α/β peuvent contrôler la perméabilité de la barrière hémato-méningée au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales en contact avec le SNC en diminuant la perméabilité des cellules endothéliales au WNV [200].

1.4.3.1.1.3. Régulation de la réponse IFN de type I

La famille des facteurs régulant l'IFN (IRF) est composée de 9 protéines structurellement proches. Les protéines IRF3 et IRF7 ont été identifiées comme les clefs de la régulation de la transcription des gènes de l'IFN de type I après infection virale. IRF3 et IRF7 sont homologues structurellement, présentes à l'état inactif dans le cytosol et transloquées au noyau après phosphorylation et dimérisation pour induire la transcription des IFN de type I. IRF3 est constitutivement présente dans la plupart des types cellulaires alors que IRF7 fait elle-même partie des ISG.

En conclusion, le schéma établi pour la réponse à l'activation de l'IFN de type I est représenté comme une boucle d'amplification en deux étapes. L'induction de la réponse interféron est obtenue par l'activation des PRR et la translocation de l'IRF3 activée au noyau induisant la production d'IFN- α et - β par les cellules infectées. L'amplification de la réponse est assurée par l'activation des récepteurs IFNAR par les IFN nouvellement synthétisés et l'activation de la cascade JAK-STAT (figure 24), l'activation de cette voie de signalisation résultant en un état antiviral par l'expression d'un certain d'ISG différents incluant l'IRF7. Les ISG codent pour un large éventail de facteurs antiviraux qui assurent l'inhibition du cycle viral à différentes étapes, depuis l'entrée du virus jusqu'à la libération des particules néoformées.

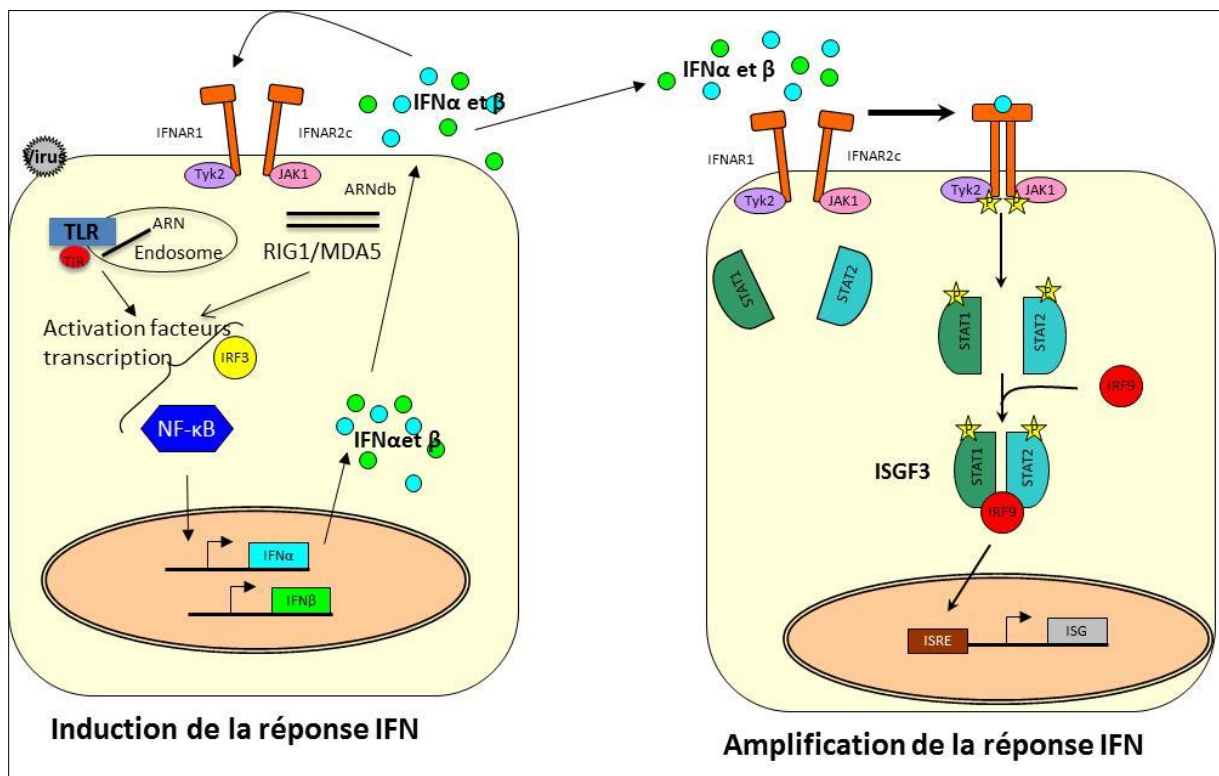


Figure 24: Représentation schématique de la réponse antivirale innée au niveau cellulaire et boucle d'amplification de l'IFN- α/β , adapté de [201]

1.4.3.1.2. Stratégies d'évasion du WNV au système immunitaire inné de la cellule

1.4.3.1.2.1. Inhibition de la réponse IFN

Pour se répliquer et diffuser rapidement, le WNV a élaboré des stratégies d'échappement à la réponse IFN de type I. Le WNV est ainsi résistant aux effets antiviraux de l'IFN de type I en culture cellulaire une fois que l'infection est établie [202]. Le WNV bloque les fonctions de l'IFN à de nombreux endroits de l'induction et de l'amplification de la réponse.

La protéine NS1 est impliquée dans l'inhibition de la transduction du signal induit par le TLR3 ce qui se traduit par l'incapacité de la translocation nucléaire d'IRF3 et de NF- κ B [203] (figure 25). L'expression de NS1 diminue aussi la production d'interleukine 6 dépendante de TLR3 et donc la mise en place d'un état antiviral [204].

La glycoprotéine E inhibe la voie de signalisation initiée par le TLR3 de façon indépendante à la protéine NS1 [203, 205].

La protéine NS2A inhibe quant à elle la transcription du gène de l'IFN- β [206]. Enfin NS4B et NS5 empêchent l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 et STAT2 [207-209]

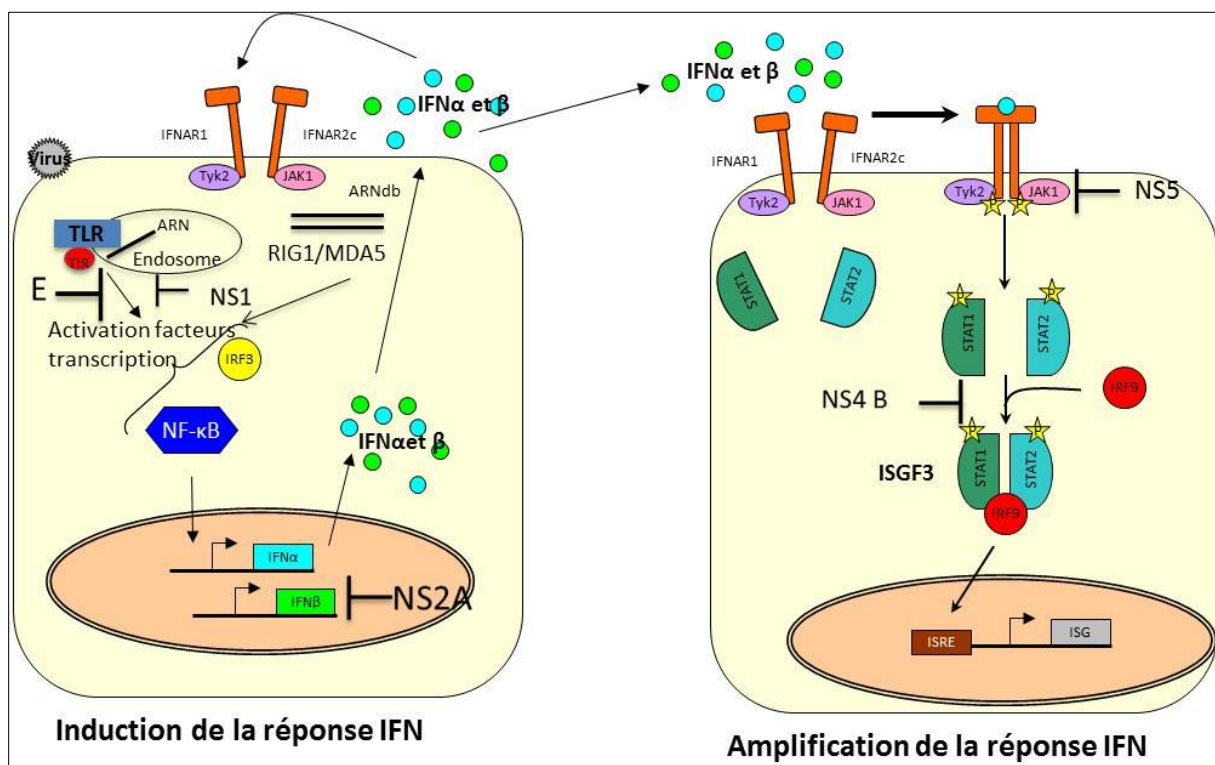


Figure 25: Mécanismes d'évasion du WNV au système immunitaire inné de l'hôte [201, 202].

1.4.3.1.2.2. *Conséquences sur la virulence des souches de WNV*

Brian C Keller et al. [197] ont démontré en comparant des souches de lignée 1 émergentes comme la souche Texas 2002 (TX02) et de lignée 2 non émergentes comme la souche Madagascar 78 (MAD78) que la résistance aux $\text{INF}\alpha/\beta$ est un facteur clé de la virulence des souches. *In vivo*, sur modèle murin, la souche TX02 est beaucoup plus pathogène que la souche MAD78 (90% de mortalité avec TX02 versus 0% de mortalité avec MAD78). Ils ont démontré *in vitro* que la souche MAD78 est avirulente car elle ne peut inhiber l'action de l'IFN par la voie JAK/STAT. A l'inverse la protéine NS5 de la souche TX02 bloque la phosphorylation de la tyrosine Tyk2 ce qui empêche la phosphorylation de STAT1 et STAT2 et leur translocation au noyau. La virulence des souches MAD78 est ainsi restaurée lors de l'infection de souris avec un récepteur à l' $\text{INF}\alpha/\beta$ non fonctionnel (IFNAR-/-). Ce contrôle de la voie d'activation JAK-STAT semble être fondamental dans la virulence des souches WNV [210].

De même, la faible pathogénicité de l'USUV pour les humains, virus pourtant très proche génétiquement du WNV, semble être dû aussi à son incapacité à bloquer la réponse antivirale innée de l'hôte [211].

1.4.3.2. *Interface entre l'immunité innée et adaptative*

Les cellules dendritiques et les macrophages sont des cellules sentinelles de l'immunité. *Ex vivo*, ces cellules sont activées suite à l'infection par le WNV et libèrent en culture des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines comme l'IFN type I, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, CC-chemokine ligand 2 (CCL2), CCL3, CCL5 et IL8 [212, 213].

Ces cytokines sont importantes dans la régulation de l'immunité cellulaire innée impliquant les cellules NK, les polynucléaires neutrophiles (PNNs) et les lymphocytes T γ/δ intra-épithéliaux ainsi que dans le développement de l'immunité adaptative.

De la même manière, l'activation de la voie du complément peut directement contrôler l'infection virale et favoriser la mise en place de l'immunité adaptative.

1.4.3.2.1. Les cellules spécialisées de l'immunité innée et le système du complément

1.4.3.2.1.1. *Les cellules spécialisées de l'immunité innée*

Les cellules NK activées par l'IFN de type I induisent la mort des cellules infectées par la libération de granules cytolytiques et de cytokines.

Les PNN qui sont aussi activés par l'IFN de type I ont un rôle plus controversé. Ils sont en effet rapidement recrutés sur le site de l'infection chez la souris et sont le lieu d'une réplication efficace du virus [214]. Cependant leur déplétion, après que l'infection a eu lieu, induit une réplication virale accrue montrant à l'inverse qu'ils sont essentiels dans la clairance du virus lors des phases tardives du processus [214].

Enfin les lymphocytes T γ/δ intra-épithéliaux sont cruciaux pour le contrôle de la réplication virale par un mécanisme direct faisant intervenir la sécrétion de l'IFN- γ et des perforines [215].

1.4.3.2.1.2. *Le système du complément*

Le système du complément est un système de défense anti-infectieux comprenant une importante famille de protéines présentes dans le sérum ou fixées à la surface cellulaire (souvent des récepteurs). Ce système se met en alerte en présence de pathogènes ou de complexes immuns.

Il y a trois voies biochimiques qui activent le système du complément : 1/ la voie classique du complément, 2/ la voie alterne du complément et 3/ la voie des lectines liant les résidus mannose des membranes bactériennes [216]. Le complément peut s'activer en l'absence d'anticorps, dans le cas de la voie alterne et de la voie des lectines, c'est pour cela qu'il est considéré comme faisant partie de l'immunité innée. Néanmoins la voie dite classique d'activation débute par la reconnaissance d'anticorps et fait à ce titre partie de l'immunité acquise (dite aussi adaptative).

Les différentes protéines du complément sont des pro-enzymes inactives et qui sont activées en cascade par clivage. Le clivage libère une fraction ayant une activité enzymatique de protéase et un petit fragment qui possède souvent un rôle sur les cellules inflammatoires.

Toutes les voies du complément contribuent à la protection contre l'infection par le WNV. Les souris déficientes en facteur C3 (ce qui se traduit par une déficience des trois voies)[217], C1q ou C4 (déficience de la voie classique)[218] ou déficientes pour la voie des lectines [219] montrent toutes une augmentation de susceptibilité à l'infection au WNV.

1.4.3.2.2. *Stratégies d'évitement de l'activation du complément par le WNV*

Les *flavivirus* incluant le WNV ont développé des stratégies pour contrecarrer le système du complément.

La protéine NS1 en solution ou associée aux membranes bloque la voie alterne du complément en recrutant une protéine régulatrice (le facteur H), ce qui facilite l'inactivation de C3b et empêche la formation du complexe d'attaque membranaire [220].

Indépendamment de la voie alterne, la protéine NS1 de WNV bloque la voie classique et la voie des lectines par son interaction directe avec les protéines C4/C4b [221]. Ainsi une haute concentration de NS1 dans l'espace extra cellulaire peut efficacement bloquer l'activation du complément.

1.4.3.3. *L'immunité adaptative*

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'hôte face à l'infection alors que l'immunité adaptative est impliquée dans l'élimination ciblée du pathogène dans les phases tardives de l'infection et dans la mise en place de la mémoire immunitaire.

Comme pour toute infection virale, des réponses humorale et cellulaire sont induites suite à l'infection par le WNV.

L'immunité humorale médiée par les lymphocytes B assure la clairance du WNV dans le compartiment périphérique tandis que l'immunité cellulaire est fondamentale pour l'élimination du virus au niveau du SNC. Pour exemple, des souris déficientes en lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont plus sensibles aux encéphalites alors que leur concentration en immunoglobuline M (IgM) est identique aux souris sauvages [222, 223].

1.4.3.3.1. L'Immunité humorale :

Les IgM apparaissent dans le sang 2-8 jours après le début des symptômes fébriles, avec un pic à 15 jours post-infection (pi) suivi d'une décroissance rapide de leur concentration dans le sang (demi-vie moyenne de 3-4 mois chez le cheval). Chez l'homme, on note la présence d'IgM dans le liquide céphalorachidien (LCR) dans 80% des cas et les IgM persistent plus longtemps (50-250 jours), ce qui pose des difficultés dans la mise en place d'un diagnostic d'infection aiguë [224, 225].

Les IgM ne peuvent pas traverser la barrière hémato-méningée. Leur présence dans le LCR reflète donc soit une production intrathécale ou l'atteinte de la barrière hémato-méningée la rendant perméable aux IgM [225].

Les Immunoglobulines de classe G (IgG) apparaissent environ 8 à 12 jours après le début symptômes fébriles et peuvent persister plusieurs années (figure 26) [225, 226]. Ils permettent l'établissement d'une immunité à long terme.

Les IgG et IgM peuvent posséder des propriétés neutralisantes (AcN) empêchant l'entrée du virus dans la cellule et sa dissémination à d'autres cellules. La plupart des AcN sont dirigés contre prM et la glycoprotéine E, en particulier son domaine III (EDIII) qui intervient dans l'attachement de la glycoprotéine E aux récepteurs membranaires [148, 227](cf. 1.4.1.1).

A l'inverse, la boucle de fusion de DII, qui est en position cryptique dans les virions matures, produit des anticorps qui ne semblent pas contribuer à la neutralisation virale. Néanmoins les données *in vivo* ne corroborent pas cette distinction entre anticorps neutralisants et non neutralisants car une protection peut être démontrée chez les mammifères avec des anticorps anti-DII [228, 229]. En effet, ces anticorps anti-DII peuvent être protecteurs *in vivo*, probablement du fait de la fixation de leur portion Fc à des récepteurs Fc γ qui sont présents sur les monocytes et macrophages et à l'activation de la voie classique du complément [229].

Enfin, même si la plupart des anticorps reconnaissent les protéines structurales du WNV, certains reconnaissent la protéine NS1. Ces anticorps sont détectés dans les sérums lors de la phase aiguë de la maladie. En effet, la protéine NS1 est séquestrée dans les cellules infectées mais peut être aussi localisée à la surface cellulaire ou être sécrétée des cellules de mammifères (cf. 1.4.1.1). Il a été démontré dans le milieu des années 80 que des souris étaient protégées efficacement contre une épreuve virulente après administration passive d'anticorps monoclonaux (AcM) anti-NS1 [230]. Il a été alors suggéré que les anticorps anti-NS1 protégeaient d'une infection létale à travers des mécanismes de lyse cellulaire dépendants du complément [231]. Néanmoins des études récentes utilisant des souris « knock-out » pour des récepteurs Fc γ spécifiques de différents isotypes d'AcM anti-NS1 ont montré qu'il pouvait y avoir phagocytose et clairance des cellules infectées sans activation du complément via les IgG2a anti-NS1 reconnues par les récepteurs Fc γ des macrophages [156].

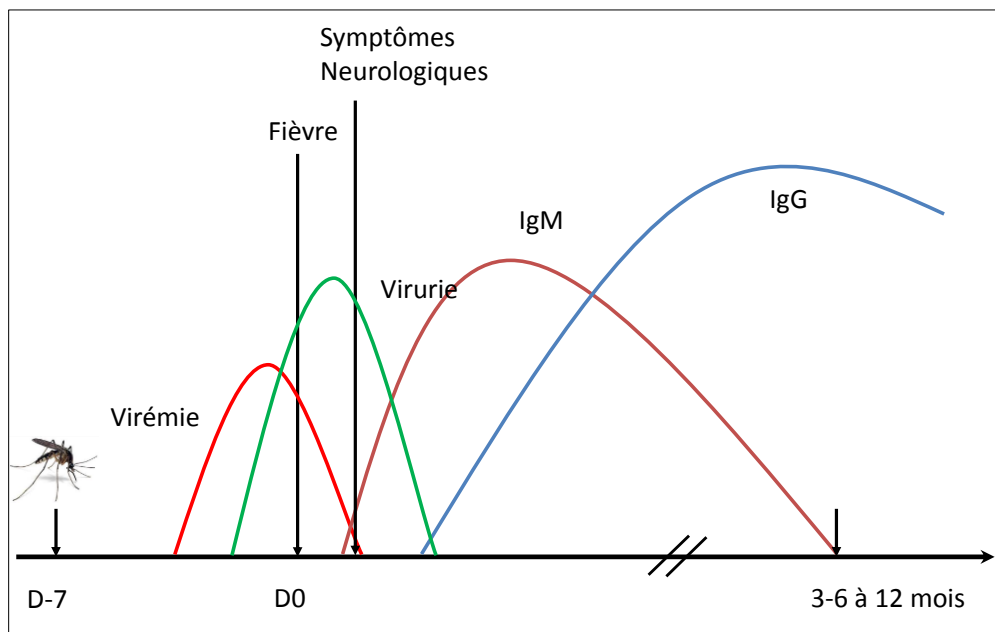


Figure 26: Cinétique de la virémie, de l'excrétion virale (virurie) et des anticorps IgM et IgG au cours de l'infection par le WNV (aimablement fourni par Isabelle Leparç-Goffart)

1.4.3.3.2. Immunité cellulaire

De nombreux acteurs interviennent pour limiter la multiplication virale au sein des organes périphériques et empêcher la dissémination du WNV au SNC (figure 27).

Les lymphocytes TCD8⁺ prolifèrent suite à l'identification de cellules infectées qui expriment à leur surface des CMH de classe I (CMH I) et sécrètent des cytokines proinflammatoires [232]. Les cellules infectées sont alors lysées sous l'effet des perforines et des granzymes A et B ou via les interactions Fas-Fas ligand [233, 234].

Les lymphocytes T CD4⁺ contribuent largement au contrôle de l'infection à travers de multiples mécanismes dont la production de cytokines, l'activation et la maturation des lymphocytes B et la cytotoxicité directe. Une déplétion en lymphocytes T CD4⁺ ou une déficience génétique en CMH II résulte en une réponse humorale atténuée et une augmentation de la létalité [235].

Le virus peut néanmoins échapper à cette première ligne de défense et traverser la barrière hémato encéphalique (BHE) (cf. 1.4.2). Les neurones sont alors les premières cibles du virus.

Suite à l'infection virale du SNC, des chimiokines inflammatoires (CCL5, CXCL10 et RANTES) sont produites par les leucocytes circulants, les astrocytes résidents et la microglie [236, 237]. L'augmentation de ces chimiokines permet le recrutement au sein du SNC des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ et des monocytes dont la fonction est la clairance virale.

L'équilibre entre l'élimination du virus et l'immuno-pathologie dans le SNC est modulé par la réponse immunitaire antivirale. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ produisent des cytokines pro-inflammatoires qui peuvent induire des dommages aux cellules gliales et aux neurones et entraîner une mort cellulaire [238]. Néanmoins leur présence est absolument nécessaire pour la clairance du virus [222, 239].

Des études récentes ont aussi impliqué les lymphocytes T régulateurs (Tregs) dans la modulation de l'immunité durant la phase aiguë de l'infection à WNV [240]. Il a été constaté que des donneurs de sang infectés par le WNV qui présentaient des symptômes avaient moins de Tregs que les donneurs asymptomatiques. De même, une augmentation de ces cellules a été observée 6-8 jours après infection par le WNV [241] et la déplétion de ces cellules entraîne une augmentation de la pathogénie du WNV et l'augmentation des cellules T CD8⁺.

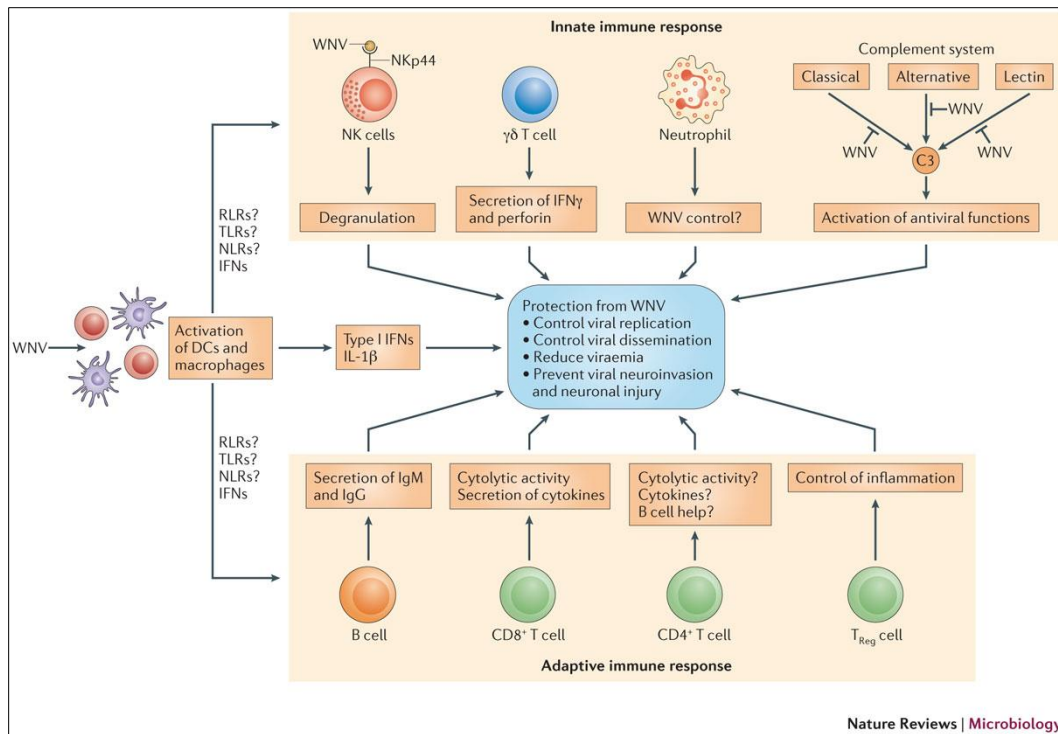


Figure 27: Schéma synthétique de la réponse immunitaire innée et adaptative lors d'une infection à WNV

Lors de l'infection par le WNV les cellules dendritiques et macrophages sécrètent des IFN de type I et des cytokines pro-inflammatoires; ces cellules présentatrices d'antigènes sont essentielles dans la stimulation des voies de l'immunité innée et adaptative. A l'interface de l'immunité innée et adaptative, les neutrophiles, les lymphocytes T γ/δ intra-épithéliaux et sûrement les NK sont impliqués dans le contrôle de l'infection précoce à WNV. A l'inverse les lymphocytes B, lymphocytes T CD8+, CD4+ et Treg sont essentiels pour la clairance virale et la protection contre l'infection [174].

1.5. Outils pour le diagnostic de l'infection

Les symptômes neurologiques et les lésions ne sont pas spécifiques de l'infection à WNV, ce qui rend les tests de laboratoire incontournables pour confirmer ou exclure l'étiologie virale.

Le diagnostic d'infection à WNV est délicat et repose sur la détection de l'ARN viral dans le sang et le LCR, l'isolement viral en culture cellulaire et/ou la détection des IgM et IgG dans le sérum et le LCR.

1.5.1. Détection du virus

1.5.1.1. Isolement viral

Le WNV peut être identifié, isolé et caractérisé à partir de prélèvements de cerveau, de moelle épinière, de LCR et de sang. Il a été récemment démontré que l'on pouvait aussi isoler du WNV à partir de l'urine de patients souffrant d'une infection aiguë à WNV [242] (cf. 1.5.1.2). L'isolement se fait classiquement par infection de lignées cellulaires de mammifères (cellules Vero ou BHK-21) ou de cellules de moustiques (cellules C6/36) avec le prélèvement. Un effet cytopathique (ECP) est visible 2-7 jours après l'inoculation suivant la charge virale et l'inoculum. Cette méthode a néanmoins quatre facteurs limitants : 1/ technique longue, 2/ qui ne peut se faire du vivant du patient ou de l'animal pour les prélèvements de SNC 3/ qui nécessite un laboratoire de confinement de niveau 3 et 4/ qui est moins sensible que la RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*).

1.5.1.2. Détection de l'ARN viral

La détection de l'ARN génomique viral du WNV est réalisée à l'aide d'une étape de transcription inverse puis d'une amplification du génome viral par PCR sur échantillon biologique (LCR, sang ou organe).

Différentes RT-PCR ont été développées pour le diagnostic du virus à partir de matériel biologique [226, 243, 244]. Les plus utilisées dans les laboratoires de diagnostic sont les RT-PCR quantitatives en temps réel utilisant des sondes TaqMan et ciblant les régions conservées du WNV (ex : région 3' NC [245] ou 5'NC [243, 246]). Ces RT-PCR sont très spécifiques et ne reconnaissent que le WNV.

La complexification de l'épidémiologie des *flavivirus* en Europe a conduit au développement de RT-PCR panflavivirus. Une RT-PCR classique ciblant le gène NS5 très conservé chez les *flavivirus* permet par exemple la détection de l'ensemble des *flavivirus* du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise [56]. Une étape de séquençage est par la suite nécessaire pour connaître le *flavivirus* en cause.

Enfin, des RT-PCR temps réel multiplexes, plus sensibles que les RT-PCR classiques panflavivirus ont été développées récemment et assurent la détection simultanée de nombreux *flavivirus*. Pour exemple, la RT-PCR temps réel de Chao et collègues détectent YFV, JEV, WNV et SLEV [247] et celle de Dyer et

collègues se définit comme une RT-PCR multiplexe pour les *flavivirus* transmis par les arthropodes car elle permet d'amplifier SLEV, WNV, DENV (1, 2, 3 et 4) et TBEV [248].

Cependant la virémie (hormis pour la Dengue) est très courte chez l'homme et le cheval (virus généralement détectable jusqu'à 5 jours après l'apparition des symptômes fébriles) (figure 25) [249]. Le résultat du diagnostic moléculaire est donc souvent négatif malgré la présence d'une infection par un *flavivirus*.

Des données plus récentes ont démontré que l'ARN du WNV pouvait être détecté dans l'urine des patients pendant un temps plus long et à une plus forte concentration que dans le sang ou le LCR [250]. Chez l'homme, la virurie dure entre 20 et 30 jours avec une charge virale ($100-10^6$ copies/ml) plus élevée que celle du plasma ($50-5 \times 10^5$ copies/ml) [251]. Chez le cheval, aucune donnée de la littérature ne vient pour l'instant confirmer la présence du WNV dans l'urine. Les prélèvements urinaires que nous avons réalisés au cours de la dernière épizootie de WNV en 2015 en région Camargue n'ont pas permis de mettre en évidence du virus dans les urines. Cependant de l'ARN du WNV a été détecté dans le sable vésical récolté en post-mortem chez un cheval mort du WNV (données non publiées).

1.5.1.3. Détection des antigènes viraux

Une autre approche dans le diagnostic direct des infections à WNV est la détection des protéines virales.

Comme décrit précédemment la protéine NS1 est une protéine qui est exprimée à la surface cellulaire et est sécrétée dans l'espace extracellulaire. Durant la phase active de l'infection, la protéine NS1 est largement sécrétée et détectable dans le sérum des mammifères infectés par les *flavivirus*.

Un kit de diagnostic commercial pour la détection de cette protéine existe pour le diagnostic de la Dengue chez l'homme. Il donne des résultats positifs entre le 1^{er} et le 9^{ème} jour après le début des symptômes cliniques [252, 253].

Des applications sont également à l'étude pour le diagnostic précoce du WNV avec cet antigène. L'analyse de la cinétique de la sécrétion de la protéine NS1 *in vitro* et *in vivo* a montré que seule une petite fraction de la protéine était sécrétée dans le milieu extracellulaire et qu'il existait un délai entre la sécrétion du virus et celle de la protéine NS1 [254]. Chez des hamsters infectés expérimentalement, la protéine NS1 a été détectée sous une forme multimérique dans le sérum 3 à 8 jours pi, avec un pic à 5 jours pi, avant le début de la maladie et la détection des IgM. En partant de cette découverte, un ELISA de capture des antigènes NS1 a été évalué avec des sérums de hamster

infectés expérimentalement et avec un sérum humain prélevé suite à une infection à WNV. Les résultats ont montré une bonne performance de cet ELISA permettant de dépister précocement une infection à WNV [254].

Un autre ELISA de capture de l'antigène NS1, conçu avec deux AcM qui reconnaissent des épitopes distincts de cette protéine (augmentant ainsi la spécificité et évitant les réactions croisées avec les autres *flavivirus* apparentés) a montré une meilleure sensibilité que la détection du virus par RT-PCR à partir de souris infectées expérimentalement [255].

Cependant, malgré ces résultats encourageants obtenus en laboratoire, aucun test commercial n'existe à l'heure actuelle. Ainsi, face à une virémie de courte et de faible intensité chez l'homme ou le cheval, le diagnostic de première intention est souvent un diagnostic indirect ou sérologique, avec la mise en évidence d'anticorps IgM ou IgG.

Les IgM sont détectables dans le sang approximativement 8 jours après l'infection et les IgG sont généralement présents quelques jours plus tard (figure 26).

1.5.2. Tests sérologiques

1.5.2.1. Tests de séroneutralisation virale

Le test de neutralisation virale en plaque de lyse (PRNT pour *plaque reduction neutralisation test*) est encore la technique de référence pour le diagnostic sérologique des infections à flavivirus. La méthode est réalisée suivant un protocole standard avec un seuil de réduction des plages de lyse de 90% (PRNT 90)[256]. Dans cette technique, la capacité des anticorps à réduire le nombre de plages de lyse en culture cellulaire est quantifiée visuellement. Un échantillon est considéré comme positif si le seuil de 90% de réduction des plages par rapport au contrôle sans sérum est atteint. Le test de microneutralisation virale (micro-VNT pour *micro-virus neutralization test*) qui s'appuie sur l'observation de cellules infectées et réfringentes en microscopie optique est une modification du PRNT. Il permet de tester dans une plaque 96 puits un plus grand nombre d'échantillons. Ces deux méthodes donnent un titre en anticorps neutralisants pour l'échantillon de sérum considéré.

Néanmoins PRNT et micro-VNT sont des méthodes longues et fastidieuses nécessitant un laboratoire de confinement de niveau 3. Ces méthodes sont moins sensibles que l'ELISA [257] et leur sensibilité peut dépendre de la souche de WNV étudiée [258]. De plus, les IgM sont difficilement détectables et ne peuvent être différenciées des IgG par cette technique. Enfin on observe des réactions croisées au sein du sérocomplexe de l'Encéphalite japonaise, ce qui nécessite parfois la mise en place d'algorithme décisionnel pour différencier les *flavivirus* dans un même sérocomplexe [259].

Afin de pouvoir faire les tests de neutralisation virale en laboratoire de confinement P2, une nouvel axe de recherche est la synthèse de virus chimériques recombinants, dans lesquels la protéine d'enveloppe d'un virus sauvage atténué de classe 2 (ex : YFV ou KUNV) a été remplacée par la protéine d'enveloppe d'un autre *flavivirus* (ex : SLEV ou JEV) [260, 261]. Cependant cette nouvelle méthode a besoin d'être standardisée et validée avant son application en routine pour le diagnostic des infections à *flavivirus*.

1.5.2.2. Tests d'inhibition de l'Hémagglutination (HIT)

Le test de l'inhibition de l'Hémagglutination (HIT) est encore utilisé dans certains laboratoires, en particulier pour les enquêtes sur les oiseaux [262], à l'inverse de la méthode CFT qui a été abandonnée du fait de la lourdeur de la technique. La méthode HIT exploite la capacité de la protéine E d'agréger les érythrocytes aviaires en l'absence d'anticorps E neutralisants. Technique fastidieuse, elle est de plus sujette aux réactions sérologiques croisées, ne permet pas de distinguer les IgM des IgG et demande des échantillons d'oiseaux devant être préalablement débarrassés des inhibiteurs non spécifiques par la protamine sulfate ou l'acétone [263] (figure 28a).

1.5.2.3. Immunofluorescence indirecte (IFI)

L'IFI utilise des lames sur lesquelles des cellules infectées par le *flavivirus* recherché ont été fixées. Les échantillons de sérum sont déposés sur les lames et l'attachement des anticorps sur les cellules infectées est révélé par une immunoglobuline marquée avec un fluorophore qui reconnaît les IgM et IgG spécifiques d'espèce. Cette méthode est rapide et facile à réaliser et peut être utilisée pour différencier la réponse IgG et IgM. Néanmoins elle n'est pas adaptée pour l'étude de multiples échantillons. Des lames fixées avec des antigènes de WNV, JEV, YFV ou DENV sont disponibles commercialement pour le diagnostic des infections humaines [264]. Le laboratoire de niveau 3 n'est pas requis du fait de l'utilisation d'un virus inactivé sur les lames. L'IFI montre une meilleure spécificité que l'ELISA pour la détection des IgM. En revanche l'IFI présente une mauvaise spécificité, comme l'ELISA quand il s'agit de détecter les IgG [265].

1.5.2.4. ELISA

1.5.2.4.1. ELISA classiques

Les ELISA sont les outils de diagnostic privilégiés du fait de leur rapidité, sensibilité, reproductibilité et prix peu coûteux. Trois différentes techniques sont utilisées couramment : l'ELISA de compétition qui

cible tous les isotypes d'anticorps, l'ELISA indirect révélant uniquement les IgG et l'ELISA de capture ou MAC ELISA ((MAC) ELISA pour *IgM Antibody-Capture ELISA*) mettant en évidence les IgM (figure 28, b). Des kits de diagnostic prêts à l'emploi sont commercialisés en médecine humaine et vétérinaire.

Les ELISA IgG indirects nécessitent l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-espèce [226, 266] (figure 28, b). Du fait de la grande variété des hôtes potentiels à WNV, les laboratoires de diagnostic vétérinaire ont graduellement remplacé les ELISA IgG indirects par les ELISA de compétition qui permettent à priori de tester les échantillons issus de toutes les espèces animales [139]. Cette polyvalence provient du fait que les anticorps présents dans le sérum entrent en compétition avec les anticorps monoclonaux anti-WNV pour la fixation au site antigénique. Les ELISA de compétition sont les plus sensibles de toutes les techniques décrites ci-dessus.

Des essais inter-laboratoires récents et impliquant des laboratoires de référence européens, du Moyen-Orient, d'Afrique et d'Amérique ont souligné les points faibles des techniques sérologiques actuellement utilisées [267] : des réactions croisées entre les anticorps dirigés contre le WNV et les anticorps dirigés contre des *flavivirus* du même groupe antigénique comme les virus JEV, TBEV ou USUV sont fréquemment mises en évidence, en particulier dans les tests ELISA indirects IgG, de compétition et dans une moindre mesure pour la détection des IgM par MAC-ELISA.

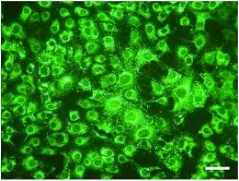
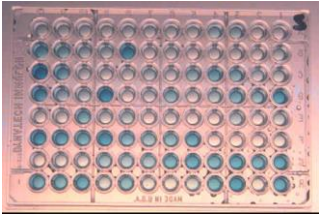
Du fait de leur rapidité et faible coût, les ELISA de compétition sont donc plus appropriés aux enquêtes sérologiques. Tout résultat positif nécessitera le recours à la méthode de référence, le test de neutralisation virale, long et laborieux, pour identifier le *flavivirus* en cause [17] (manuscrit N°1).

Les MAC-ELISA sont utiles pour détecter les infections aiguës (8–60 jours après l'infection) chez les humains et les chevaux. Néanmoins chez l'homme, les IgM peuvent persister jusqu'à un an dans 20 à 50% des cas et gêner le diagnostic d'infection aiguë [224]. Cependant les MAC-ELISA apportent des informations essentielles pour un diagnostic d'infection aiguë à WNV car :

- La présence d'IgM contre le WNV dans le LCR est un diagnostic de certitude pour l'infection du SNC, ces anticorps ne traversant pas en temps normal la BHE.
- Ils sont moins sujets aux réactions croisées que les ELISA IgG indirects ou de compétition [225, 267].
- La réponse IgM positive signe une infection aiguë à WNV plutôt qu'une vaccination. La bibliographie à ce sujet est cependant contradictoire avec certains articles considérant qu'il n'y a pas de réponse IgM induite après vaccination quel que soit le vaccin utilisé (vaccin inactivé ou vaccin recombinant canarypox) [268] alors que des réponses IgM positives

peuvent être détectées dans les premiers jours après vaccination avec le vaccin inactivé Duvaxyn® WNV dans d'autres études [269].

A)

	SNT (PRNT/Micro-VNT)	HIT	IFI	ELISA
Principe	Les anticorps neutralisent l'attachement du virus à la cellule, l'endocytose et/ou la fusion membranaire	Inhibition par les anticorps de l'agrégation érythrocytaire induite par le virus	Les anticorps reconnaissent les cellules infectées par le virus et fixées sur une lame de microscope ; ils sont mis en évidence par un anticorps-anti-espèce conjugué à un fluorochrome	ELISA indirect : les anticorps reconnaissent l'antigène viral fixé sur la plaque et sont révélés avec un anticorps anti-espèce lié à une enzyme (Autres ELISA : cf b)
Cible de l'anticorps	Epitopes neutralisants sur la protéine E	Protéine E	Virus entier	Virus entier, lysat de virus ou protéines recombinantes (prM-E, NS1, E-DIII...)
Interprétation	 + - - Protection des cellules en présence d'anticorps neutralisants	 - + Inhibition de l'Hémagglutination en présence des anticorps présents dans le sérum	 Fluorescence de cellules infectées par le virus en présence d'anticorps dans le sérum	 Réaction colorimétrique avec l'intensité de la coloration en rapport avec la concentration en anticorps
Avantages	- Standard - Très spécifique - Pas limitée à une espèce animale	- Peu cher - Méthode de dépistage (quelques heures) - Pas limitée à une espèce animale - Laboratoire de confinement P3 non nécessaire une fois que l'antigène a été produit	- Rapide (1-2 jours) - Kits commerciaux disponibles - Possibilité de différencier les IgG et IgM - Laboratoire de confinement P3 non nécessaire une fois que l'antigène a été inactivé	- Rapide (quelques heures) et peu cher - Méthode intéressante pour le dépistage - Kits commerciaux disponibles - Distinction des IgG et IgM - ELISA de compétition : pas limitée à une espèce animale - Laboratoire P3 non nécessaire avec antigènes inactivés et recombinants
Inconvénients	- Moins sensible que l'ELISA - Réactions sérologiques croisées limitées au sein d'un même sérocomplexe (JEV par exemple) - Méthode longue (3-7 jours) - Nécessite un laboratoire de confinement P3 - IgM et IgG non différenciées	- Moins sensible que l'ELISA - Moins spécifique que la SNT : réactions croisées dans le sérocomplexe JEV et avec les autres sérocomplexes des flavivirus - Présence d'inhibiteurs non spécifiques - IgM et IgG non différenciées	- Moins spécifique que la SNT : réactions croisées dans le sérocomplexe JEV et avec les autres sérocomplexes des <i>flavivirus</i> (en particulier pour les IFA mettant en évidence les IgG)	- Moins spécifique que la SNT : réactions croisées dans le sérocomplexe JEV et avec les autres sérocomplexes des <i>flavivirus</i> (en particulier pour ELISA IgG indirect et de compétition)
Applications sur le terrain	Confirmation d'infections passées	Enquête sérologique	Investigation de cas cliniques	ELISA IgG indirect et de compétition : investigation de cas cliniques, enquête sérologique, certification lors du transport MAC-ELISA: confirmation d'une infection récente ; certification lors du transport

(B)

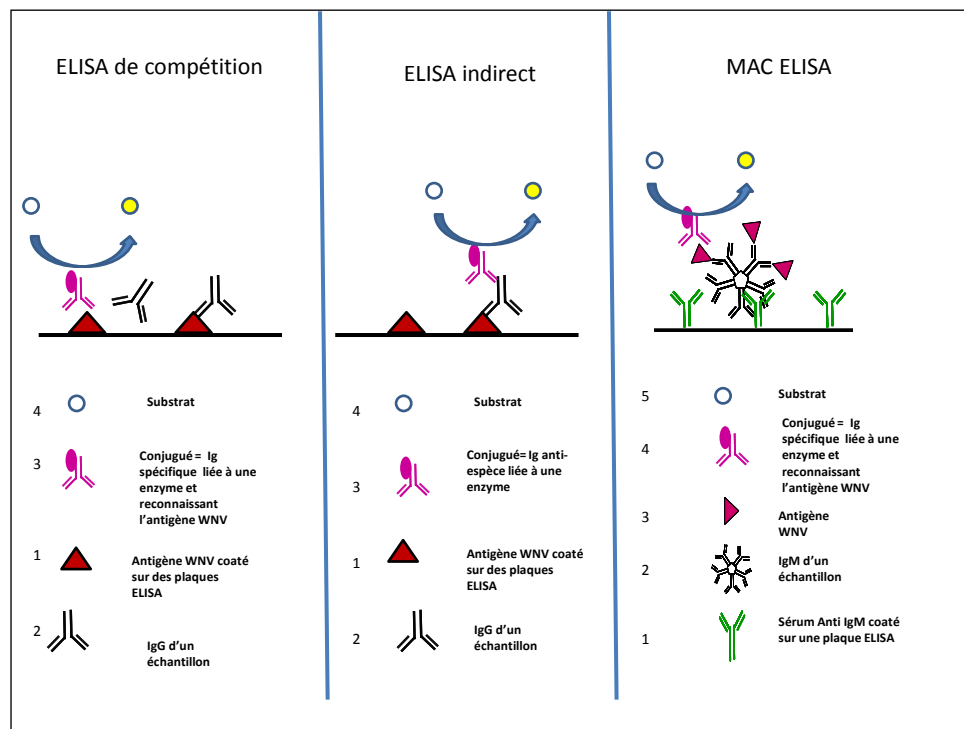


Figure 28: (A) Principaux tests sérologiques utilisés pour le diagnostic des *flavivirus* (B) Principe de trois différentes méthodes d'ELISA (les chiffres représentent les différentes étapes de la méthode) [17].

1.5.2.4.2. Développement d'ELISAs IgG plus spécifiques

La protéine d'enveloppe E est la protéine la plus antigénique des *flavivirus* et elle induit chez l'hôte des anticorps dirigés contre chacun de ses trois domaines (DI, DII et DIII) et principalement contre les DII et DIII. Des études sur les propriétés antigéniques de la protéine E ont montré que la majorité des épitopes responsables de réactions croisées entre *flavivirus* sont localisés à l'intérieur ou proche de la boucle de fusion [145] (cf. 1.4.1.1). Le DIII présente une séquence moins conservée entre *flavivirus* et induit des anticorps fortement neutralisants. Ces caractéristiques ont servi de base au développement d'ELISA plus spécifiques pour détecter et différencier entre elles les infections à *flavivirus* [270].

✓ Mutation ciblée sur la boucle de fusion

La première approche est de réaliser des mutations ciblées au niveau de certains épitopes de la boucle de fusion de DII. Un ELISA IgG utilisant l'antigène sE du WNV muté en 4 endroits de la boucle de fusion a permis de faire la distinction entre des sérums contenant des IgG dirigés contre le WNV par rapport à ceux dirigés contre le TBEV ou le DENV. En revanche cette méthode n'a pas permis de supprimer les réactions croisées entre les anticorps dirigés contre le WNV de ceux dirigés contre le JEV[271].

✓ ELISA ciblé sur le DIII de la protéine d'enveloppe

Un ELISA de compétition utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le DIII a été commercialisé en médecine vétérinaire (Ingezim® WN Compaq kit) et permet de distinguer les infections à TBEV des infections à WNV (cf. manuscrit N°2 partie expérimentale).

Une autre approche est la synthèse de domaines DIII recombinants comme antigène de coating pour les plaques ELISA. Une distinction entre les infections à *flavivirus* a ainsi pu être réalisée dans différents articles (exemples : distinction entre les sérocomplexes de l'encéphalite à tique et de l'encéphalite japonaise [272, 273], entre deux *flavivirus* vectorisés par des *Culex* (WNV et Wesselsbron) [272] ou entre le WNV et des *flavivirus* appartenant également au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise (JEV, SLEV et MVEV) chez des animaux expérimentalement infectés [274]).

Néanmoins, avoir une sensibilité optimale avec cette approche est difficile, car de nombreux épitopes immunogènes sont à l'extérieur de DIII [275].

✓ ELISA NS1

NS1 étant la seule protéine non structurale sécrétée des cellules de mammifères infectées par un *flavivirus*, cette protéine est considérée comme la seule protéine NS pouvant induire une forte réponse anticorps chez les humains et les animaux [137].

Des ELISA de capture avec des anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes spécifiques de la NS1 ont été mis au point afin de différencier par exemple les infections à WNV et JEV [276], KUNV et MVEV [277] ou WNV et SLEV [278].

Ces ELISA reposant sur l'utilisation de l'antigène NS1 sont intéressants pour différencier les animaux vaccinés avec des vaccins recombinants exprimant uniquement les antigènes prM/E du WNV (comme le vaccin Recombitek® WNV Merial) de ceux naturellement infectés avec le WNV. Konishi et al [279] ont de plus montré l'absence de protéine NS1 dans les vaccins inactivés JEV et l'intérêt de l'utilisation des ELISA NS1 JEV pour distinguer les chevaux infectés par le JEV au sein d'une population de chevaux vaccinés.

1.5.2.5. Tests sérologiques multiplexes

La volonté de tester plusieurs *flavivirus* en parallèle a impliqué le développement de méthodes multiplexes où le sérum à tester est mis directement en contact avec un grand nombre d'antigènes. Deux grands types de méthodes ont été développés (les méthodes multiplexes miniaturisées d'ELISA ou d'IFI et les méthodes multiplexes sur billes).

1.5.2.5.1. Méthodes multiplexes miniaturisées d'ELISA ou d'IFI

La technologie « *micro-array* » a permis le développement d'outils de diagnostic miniaturisés sur le principe de l'ELISA [280, 281] ou de l'IFI [269, 282, 283]. La lecture se fait par l'observation de spots de fluorescence. N. Cleton et col. ont montré à l'aide des protéines NS1 de WNV, TBEV, JEV et USUV qu'il est possible de distinguer les infections à *flavivirus* chez le cheval même si des réactions croisées gênaient encore l'interprétation pour certains échantillons [269] (annexe 1). Cette miniaturisation du diagnostic sérologique est encore à l'heure actuelle en développement.

1.5.2.5.2. Méthodes multiplexes sur billes

Les immuno-essais sur billes (MIA pour *microsphere-based immunoassays*) sont en revanche largement utilisés dans le diagnostic de nombreuses maladies humaines ou vétérinaires [284-289]. La méthode MIA est un système microfluidique sur bille dans lequel chaque antigène est couplé à une bille qui est identifiée par un cytomètre en flux (Luminex®). Les anticorps contenus dans le sérum se fixent aux antigènes des billes, sont reconnus par des anticorps secondaires anti-espèces marqués à la biotine et révélés par l'ajout du fluorophore Streptavidine-R-phycoérythrine (SAPE). A l'étape de lecture, l'intensité de fluorescence et le code couleur de la bille sont mesurés par deux lasers qui excitent les billes à 2 longueurs d'onde différentes (635 nm pour identifier la microsphère et donc l'antigène et 532 nm pour exciter la fluorescence de la SAPE). Un sérum peut ainsi être évalué pour sa réactivité contre différents antigènes en un seul essai. Le principe de la technique est décrit figure 29.

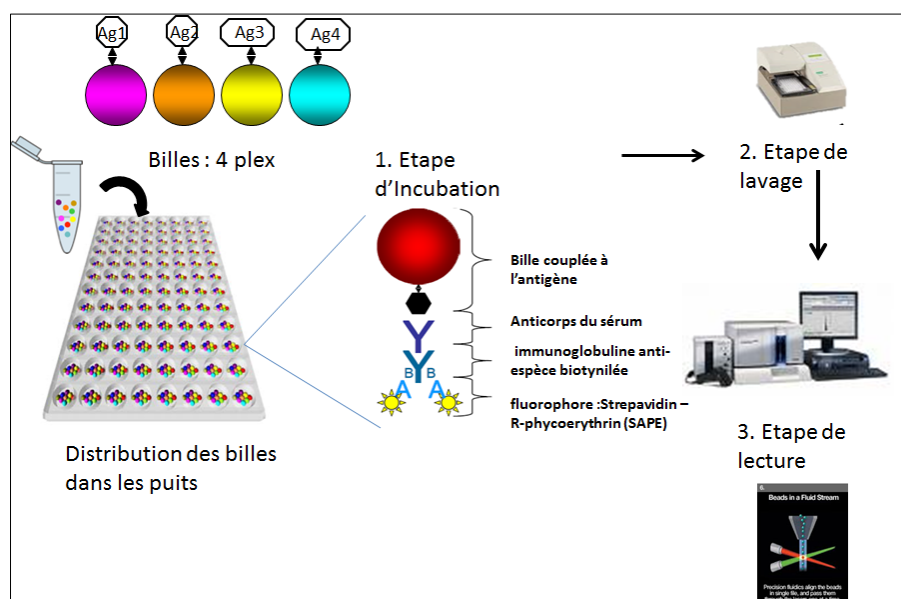


Figure 29 : Principes de la méthode Luminex.

Distribution de billes codées couplées à des antigènes spécifiques et mises en contact avec le sérum à tester et avec des anticorps secondaires anti-espèces marqués à la biotine. La fixation des anticorps sur les billes est révélée par l'ajout du fluorophore Streptavidine-R-phycoérythrine (SAPE). A l'étape de la lecture, l'intensité de fluorescence et le code couleur de la bille sont mesurés par deux lasers qui excitent les billes à 2 longueurs d'onde différentes (635 nm pour identifier la microsphère et 532 nm pour mesurer la fluorescence de la SAPE). Pour chaque sérum, la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) est calculée pour au moins 50 billes portant le même antigène.

Utilisée dans le cadre du diagnostic sérologique des *flavivirus*, cette méthode n'empêche pas les réactions croisées au sein du sérocomplexe JEV ou entre sérocomplexes si la glycoprotéine E entière est couplée aux billes. La partie résultat de cette thèse décrira le développement d'une méthode MIA pour le sérodiagnostic de maladies neurologiques à *flavivirus* chez le cheval qui est basé sur les DIII de WNV, TBEV et JEV [270].

D'autres approches MIA avec les antigènes NS3 et NS5 des *flavivirus* ont été évaluées dans le but de caractériser les infections récentes à WNV chez l'homme et de les différencier de patients vaccinés par JEV ou YFV ou infectés par les DENV et SLEV. La détection des anticorps anti NS3 avec l'antigène NS3 n'a pas été concluante. En revanche une bonne détection des anticorps anti NS5 a été obtenue avec la bille NS5 et peu de réactions croisées avec cet antigène ont été observées : 0% (JEV), 5% (YFV), 9% (DENV) et 5% (SLEV) [290].

Balasurya et al [291] ont, quant à eux, développé une méthode MIA utilisant 4 protéines recombinantes WNV E, NS1, NS3 et NS5 pour la détection des IgG équine anti-WNV dans le sérum de chevaux vaccinés ou naturellement infectés. Les billes couplées aux protéines NS ont été trouvées moins sensibles que l'ELISA ou la PRNT. Néanmoins, il est démontré dans cette publication que

l'antigène NS1 par méthode MIA est capable de distinguer les chevaux vaccinés avec le vaccin recombinant canarypox WNV (Recombitek® Equine WNV) de ceux naturellement infectés ou vaccinés avec un vaccin WNV inactivé [292].

Dans la partie « Résultats » de cette thèse, nous appliquerons cette technique sur les sérums de chevaux infectés ou vaccinés provenant de l'épizootie WNV qui a eu lieu en Camargue durant l'été 2015.

1.6. Modalités de lutte contre les *flavivirus* d'intérêt en médecine équine

1.6.1. La vaccination

Pour le WNV, trois vaccins équins possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne: l'Equip® WNV de Zoetis, l'Equilis® West Nile d'Intervet International BV (MSD santé animale) et le Proteq® West Nile de Merial. Le vaccin Equip WNV de Zoetis est composé du virus West Nile inactivé, souche VM-2 New York 1999 (numéro 1666142A) associé à un adjuvant [293]. Les deux autres vaccins sont des vaccins recombinants. Le Proteq West Nile est composé d'un vecteur poxvirus du canari exprimant les gènes prM et E du WNV et est également adjuvé [294]. Le vecteur canarypox réalise un cycle abortif de réplication dans les cellules de mammifères durant lequel le produit du gène inséré (transgène) est exprimé [295]. Enfin le vaccin Equilis West Nile d'Intervet est constitué de la souche vaccinale YFV 17D où les gènes prM et E du YFV ont été remplacés par ceux du WNV. Ce vaccin recombinant a été inactivé et adjuvé [296].

L'émergence en Europe en 2004 d'une première souche de lignée 2 a soulevé la question de l'induction d'une immunité protectrice contre cette nouvelle lignée par les vaccins commerciaux comportant des gènes ou antigènes de souches nord-américaines WNV (lignée 1). Des épreuves virulentes avec des souches de lignée 2 sur modèle murin vacciné avec un vaccin inactivé (Duvaxyn® WNV, qui a été renommé Equip® WNV) [297] ou sur des chevaux vaccinés avec le vaccin recombinant canarypox exprimant la prM/E d'une souche WNV lignée 1 (Recombitek® Equine WNV, équivalent du Proteq® West Nile pour le marché américain) [298] ont permis de confirmer l'efficacité de ces 2 vaccins contre des souches WNV de lignée 2 [17].

Concernant l'EJ, le seul vaccin équin, disponible uniquement au Japon, est un vaccin inactivé constitué de la souche BMIII dérivée de la souche Beijing et adjuvé (vaccin Kaketsuken Encevac ® ou Nisseiken qui contient en plus le virus Getah souche MI-110) (tableau 2).

Virus	Forme vaccinale	Antigène	Modalités Administration	Date AMM Européenne
WNV	Vaccin inactivé et adjuvé Equip® WNV	WNV inactivé, souche VM-2	2 injections à 3-5 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge ≥ 6 mois Rappel annuel	11/2008 (anciennement Duvaxyn®)
	Virus canarypox recombinant et adjuvé Recombitek® West Nile (Etats-Unis), Proteq® West Nile (Europe)	prM-E	2 injections à 4-6 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge ≥ 5 mois Rappel annuel	08/2011
	Vaccin chimérique recombinant inactivé et adjuvé Squelette du YFV, souche vaccinale 17D comportant les gènes prM-E du WNV Equilis® West Nile	prM-E	2 injections à 3-5 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge ≥ 6 mois Rappel annuel	06/2013
JEV	Vaccin inactivé et adjuvé Kaketsuken ou Nisseikein	JEV inactivé souche BMIII dérivée de la souche Beijing	2 injections à 4 semaines d'intervalle Rappel annuel	(Japon uniquement)

Tableau 2 : Description des vaccins équins WNV ayant une AMM européenne et des vaccins JEV commercialisé dans l'espèce équine uniquement au Japon

1.6.2. Traitements

1.6.2.1. Traitements symptomatiques

Que ce soit chez l'homme ou le cheval, il n'existe pas de traitement spécifique de l'infection par le WNV ou le JEV [299].

Chez le cheval un traitement symptomatique reposant sur une fluidothérapie, l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et/ou stéroïdiens et éventuellement de diméthylsulfoxyde peut être proposé et complété par la mise en œuvre de soins de soutien et de confort afin de limiter les risques de chute ou d'automutilation et prendre en charge la gestion des complications liées au décubitus [300].

1.6.2.2. Principales molécules antivirales candidates en thérapeutique contre le WNV

La recherche est très active en ce domaine. Les études sont réalisées sur des modèles d'infection à WNV *in vitro* et *in vivo* et ont pour but de trouver en premier lieu un traitement des formes invasives (WNND) chez l'homme ; elles s'appuient prioritairement sur des médicaments qui ont déjà fait la preuve de leur efficacité sur d'autres virus. Les molécules antivirales peuvent être d'origine biologique ou chimique. Elles peuvent cibler le virus ou les protéines de l'hôte qui sont essentielles pour l'infection ou la réplication virale.

Cette seconde approche centrée sur la cellule de l'hôte permet d'une part de contourner le problème de résistance aux antiviraux dû aux mutations virales mais aussi d'être en mesure de traiter des affections virales qui utilisent des voies métaboliques cellulaires identiques. Cependant même si cette stratégie est attrayante, un obstacle de poids demeure car l'antiviral peut inhiber des facteurs cellulaires indispensables à la cellule et de ce fait présenter une forte toxicité.

Pour le cas particulier du WNV et des autres *flavivirus* neurotropes une autre difficulté à surmonter est la nécessité pour la molécule antivirale de diffuser dans le SNC pour être curative tout en étant non neurotoxique.

1.6.2.2.1. Molécules antivirales d'origine biologique

✓ L'IFN- α/β

Les caractéristiques des IFN de type I comme antiviraux à large spectre ont déjà été abordées en partie 1.4.3.1 de cette thèse. L'IFN- α sous sa forme pégylée (fixation d'un polyéthylène glycol inerte pour augmenter sa demi-vie) associé ou non à la ribavirine constitue le traitement de référence de l'hépatite C [301].

Pour le WNV, la résistance de certaines souches de WNV aux IFN de type I a déjà été démontrée (cf. 1.4.3.1). Cette résistance est un marqueur de virulence qui est relié entre autre à la capacité du virus à inhiber la voie de signalisation JAK-STAT, ce qui limite l'emploi de cette molécule en traitement thérapeutique contre le WNV.

Cependant la grande innocuité de l'IFN- α , son rôle dans l'activation de l'immunité adaptative, un possible effet d'augmentation de la survie des neurones infectés [302] ainsi que la diminution de la perméabilité des cellules endothéliales de la BHE au WNV [200] plaident en faveur de la poursuite des essais *in vivo*.

✓ Anticorps thérapeutiques

Parmi toutes les approches antivirales en cours, les anticorps anti-WNV représentent l'approche thérapeutique la plus prometteuse pour inhiber l'entrée du virus dans les cellules cibles. Les

anticorps peuvent protéger contre une infection à *flavivirus* à travers différents mécanismes incluant l'inhibition de l'attachement de la glycoprotéine E à ses récepteurs membranaires ou le blocage de la fusion membranaire, l'activation des récepteurs Fc γ qui sont présents sur les monocytes et les macrophages et l'activation de la voie classique du complément, tous ces mécanismes favorisant la clairance virale.

Des études *in vivo* sur hamsters ont montré l'efficacité des anticorps monoclonaux (AcM) humanisés à protéger contre des encéphalites à WNV [303, 304]. Quelques études cliniques ont mis en évidence un effet bénéfique de l'administration d'immunoglobulines par voie intraveineuse sur des patients atteints de formes neuro-invasives à WNV [305, 306]. En revanche, la production d'AcM pour le traitement de cette affection n'a pas encore reçu d'autorisation de mise sur le marché (AMM).

1.6.2.2.2. Molécules antivirales d'origine chimique

✓ **Ribavirine**

La ribavirine a actuellement une AMM pour le traitement contre le virus de l'hépatite C en association avec l'IFN- α [307] et une autorisation temporaire d'utilisation dans le cadre des infections sévères par le virus respiratoire syncytial (RSV) [308]. Cette molécule a une activité mixte (directe et indirecte) car elle agit selon 5 modes d'action distincts (figure 30):

Mécanismes directs sur le virus

- Inhibition de l'activité de coiffage des ARN viraux en interagissant avec les enzymes responsables de cette activité (ARN phosphatase, ARN guanylyltransférase et ARN méthyl-transférase) ou en s'incorporant à la coiffe.
- Inhibition de la polymérase virale car la molécule qui est tri-phosphorylée par les kinases cellulaires entre en compétition avec le pool cellulaire de guanosines triphosphates (GTP) et adénosines triphosphates (ATP).
- Effet mutagène en s'incorporant dans les génomes nouvellement synthétisés impliquant des mutations délétères pour le virus.

Mécanismes indirects

- Diminution du pool intracellulaire de guanosine monophosphate par l'inhibition compétitive de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* des purines. Cette inhibition résulte en une déplétion du pool cellulaire de guanosine [309].

- Effet immunomodulateur avec une augmentation des réponses cellulaires de type 1 (Th1) et une diminution de la réponse auxiliaire de type 2 (Th2)[310].

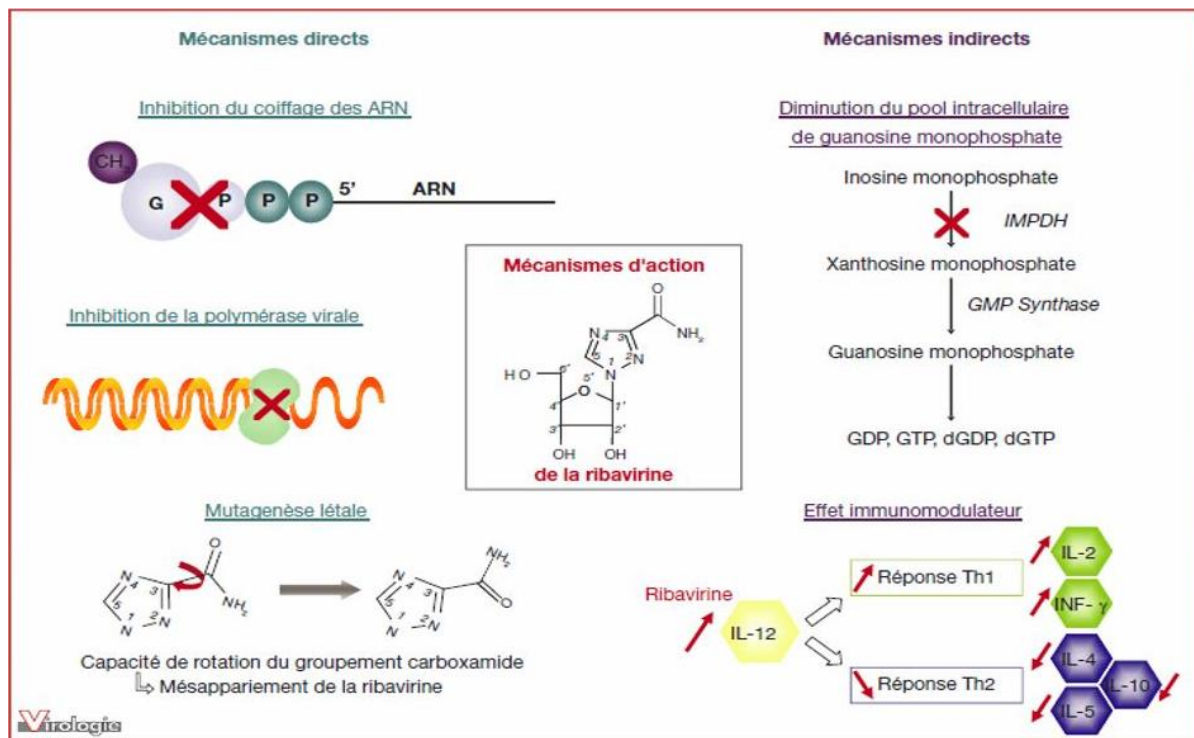


Figure 30: Mécanismes antiviraux de la ribavirine [311]

La ribavirine présente une activité antivirale *in vitro* contre de nombreux *flavivirus* (DENV, YFV)[312] et en particulier contre ceux responsables d'encéphalites virales [313]. Cependant cet antiviral étant cytostatique, son utilisation n'est possible que sur cellules confluentes.

Jordan et al ont montré que cette molécule présente *in vitro* une activité inhibitrice de la réplication du WNV à haute concentration (50-125 $\mu\text{g/ml}$) dans des oligodendrocytes humains [314].

La démonstration de son activité sur le WNV en modèle animal est cependant décevante. Son utilisation *in vivo* est limitée par son incapacité à traverser la BHE [311] et par sa concentration dans le sérum (3-4 $\mu\text{g/ml}$ pour une prise journalière par voie orale de 2400 mg) qui est bien inférieure à la concentration inhibitrice calculée par Jordan et al sur cellules neurales [314, 315].

Une protection dans un modèle murin d'infection par le WNV a été observée uniquement quand la ribavirine était utilisée en prophylaxie ou juste après l'épreuve virulente. Une étude a de plus montré que le traitement de hamsters deux jours après l'infection par le WNV augmentait la mortalité dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle [316]. Enfin, durant un épisode de WNV en Israël, on a observé que le groupe de patients ayant été traité à la ribavirine (37 patients) avait eu un pourcentage de mortalité significativement supérieur (45.4%) aux autres patients non traités ($p < 0.001$) [317].

✓ **Inhibiteur de synthèse des bases pyrimidiques (ex : bréquinar)**

Cette catégorie de molécules s'appuie sur la déplétion du pool de pyrimidines. Le bréquinar est une molécule découverte dans les années 1980 pour ses propriétés immunosuppressives. Elle inhibe la dihydroorotate désydrégénase (DHODH), la 4^{ème} enzyme dans la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines. Cette inhibition de la DHODH diminue la synthèse des ADN et ARN et interfère avec la prolifération des lymphocytes. L'activité antivirale de cette molécule est due à la diminution intracellulaire des pyrimidines (cytidine ou uridine) [318]. Des découvertes récentes montrent que cette diminution des bases pyrimidiques entraîne un stress cellulaire qui implique la stimulation des ISG et induit une résistance cellulaire à l'infection pour les virus à ARN [319]. Le bréquinar inhibe de nombreux *flavivirus in vitro* (DENV, WNV ou YFV) sur cellules humaines [320]. Sa très bonne efficacité *in vitro* n'est hélas pas validée *in vivo* du fait de l'apparition rapide de virus résistants [318].

✓ **Acide mycophénolique**

L'acide mycophénolique est un inhibiteur non nucléosidique de l'IMPDH qui est utilisé en clinique pour éviter le rejet des greffes. Les propriétés immunosuppressives de l'acide mycophénolique sont attribuées à son effet antiprolifératif sur les lymphocytes *in vitro* [321]. Cette molécule inhibe la réplication de nombreux virus à ARN et ADN *in vitro* incluant le WNV [322, 323]. Cependant bien que l'acide mycophénolique bloque efficacement la réplication virale *in vitro*, cette propriété est contrecarrée par son effet immunosuppresseur *in vivo*. En effet une augmentation de la mortalité après infection par le WNV a été observée chez les souris traitées avec différentes concentrations de la molécule [321].

✓ **La chloroquine**

La chloroquine est une molécule ancienne qui est prescrite en traitements préventif et curatif du paludisme. Son activité antivirale *in vitro* a été décrite pour les DENV [324, 325], JEV [326], WNV [325] et Zika [327]. Elle agirait avant tout comme une base faible qui augmenterait le pH des endosomes et empêcherait la modification conformationnelle de la protéine E et l'exposition de son peptide de fusion à la membrane de l'endosome (cf. 1.4.1) [326, 328]. Cette molécule traversant la barrière placentaire ainsi que la BHE [329] et étant peu toxique (prescrite en traitement préventif sur femmes enceintes à risque d'exposition au paludisme), l'exploration de son activité antivirale *in vivo* mérite d'être poursuivie.

Conclusion

Les pays européens sont actuellement confrontés à des émergences ou à une circulation silencieuse d'une large variété de *flavivirus*. On peut supposer que cette situation devienne de plus en plus complexe dans les années à venir du fait de l'intensification du trafic aérien et du commerce des animaux et des marchandises qui favorisent les émergences par l'importation de vecteurs et/ou de réservoirs [131] (annexe 1). Le diagnostic du WNV et des autres *flavivirus* ainsi que les protocoles de surveillance associés devraient clairement être améliorés en Europe et dans le monde. En particulier, il est nécessaire d'augmenter la spécificité et la rapidité des tests sérologiques en laboratoire face à cette menace.

De même à l'heure actuelle, malgré des progrès importants dans la recherche de traitements contre le WNV (cf. 1.6.2.2), aucun traitement spécifique n'est autorisé pour soigner les patients ou animaux infectés. Confrontés aux phénomènes de résistance très souvent décrits lors de l'utilisation d'antiviraux à action directe, plusieurs équipes de recherche se sont tournées vers une nouvelle idée, celle de développer des antiviraux à large spectre ciblant l'hôte. C'est ce type de molécules que nous allons tester contre les WNV et JEV dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

**MANUSCRIT N°1 : *Flaviviruses* in Europe:
Complex Circulation Patterns and Their
Consequences for the Diagnosis and Control
of West Nile Disease**

Review

Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease

Cécile Beck ¹, Miguel Angel Jimenez-Clavero ², Agnès Leblond ^{3,4}, Benoît Durand ⁵, Norbert Nowotny ^{6,7}, Isabelle Leparç-Goffart ⁸, Stéphan Zientara ¹, Elsa Jourdain ⁴ and Sylvie Lecollinet ^{1,*}

¹ UMR1161 Virologie INRA, ANSES, ENVA, EU-RL on equine West Nile disease, Animal Health Laboratory, ANSES, Maisons-Alfort 94704, France; E-Mails: cecile.beck@anses.fr (C.B.); stephan.zientara@anses.fr (S.Z.)

² CISA-INIA, Valdeolmos (Madrid) 28130, Spain; E-Mail: majimenez@inia.es

³ Département Hippique, VetAgroSup, Marcy l'Etoile 69280, France; E-Mail: agnes.leblond@vetagro-sup.fr

⁴ UR346, INRA, Saint Genès Champanelle 63122, France; E-Mail: elsa.jourdain@clermont.inra.fr

⁵ Epidemiology Unit, Animal Health Laboratory, ANSES, Maisons-Alfort 94704, France; E-Mail: benoit.durand@anses.fr

⁶ Viral Zoonoses, Emerging and Vector-Borne Infections Group, Institute of Virology, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna 1210, Austria; E-Mail: norbert.nowotny@vetmeduni.ac.at

⁷ Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine and Health Sciences, Sultan Qaboos University, Muscat 123, Sultanate of Oman

⁸ IRBA, Marseille 13384, France; E-Mail: isabelle.leparcgoffart@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: sylvie.lecollinet@anses.fr; Tel.: +33-143-967-111; Fax: +33-143-967-396.

Received: 19 August 2013; in revised form: 24 October 2013 / Accepted: 29 October 2013 / Published: 12 November 2013

Abstract: In Europe, many flaviviruses are endemic (West Nile, Usutu, tick-borne encephalitis viruses) or occasionally imported (dengue, yellow fever viruses). Due to the temporal and geographical co-circulation of flaviviruses in Europe, flavivirus differentiation by diagnostic tests is crucial in the adaptation of surveillance and control efforts. Serological diagnosis of flavivirus infections is complicated by the antigenic similarities among the

Flavivirus genus. Indeed, most flavivirus antibodies are directed against the highly immunogenic envelope protein, which contains both flavivirus cross-reactive and virus-specific epitopes. Serological assay results should thus be interpreted with care and confirmed by comparative neutralization tests using a panel of viruses known to circulate in Europe. However, antibody cross-reactivity could be advantageous in efforts to control emerging flaviviruses because it ensures partial cross-protection. In contrast, it might also facilitate subsequent diseases, through a phenomenon called antibody-dependent enhancement mainly described for dengue virus infections. Here, we review the serological methods commonly used in WNV diagnosis and surveillance in Europe. By examining past and current epidemiological situations in different European countries, we present the challenges involved in interpreting flavivirus serological tests and setting up appropriate surveillance programs; we also address the consequences of flavivirus circulation and vaccination for host immunity.

Keywords: flaviviruses; West Nile virus; antibodies; cross-reactivity; diagnosis; cross-protection; ADE; natural infection; vaccination; vector-borne diseases

1. Introduction

West Nile virus (WNV) is a widespread re-emerging pathogen that belongs to the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus and is one of the most threatening flaviviruses in Europe (for a recent review see [1]). This arbovirus is transmitted by mosquitoes in a cycle in which different species of birds act as reservoir hosts, amplifying the virus. Spillover from this cycle occasionally occurs and may cause West Nile disease in mammalian hosts. Horses and humans may be particularly affected, which is a matter of great concern to the veterinary and public health authorities of countries with West Nile cases. Although mammals are susceptible to WNV infection, most species are regarded as dead-end hosts; WNV does not efficiently replicate within their cells and they cannot transmit WNV to new vectors [2].

Most WNV infections are asymptomatic in horses and humans or are associated with an influenza-like illness (characterized by moderate to high fever, weakness, and myalgia). Only infrequently, in less than 1% infections in humans and 10% of infections in horses, do acute meningitis, encephalitis, or flaccid paralysis develop (the latter has only been reported in humans); neurological symptoms and lesions are not specific to WNV infections [3]. Consequently, laboratory tests are essential to confirm or exclude WNV infection. Because of the virus' low-level and short-term viremia in humans and horses as well as the late appearance of clinical signs when the viremic phase is over, the primary tools used to diagnose WNV consist of indirect or serological tests that aim to detect WNV antibodies. Rapid and high-throughput assays that do not require the use of infectious virus, such as ELISAs, hemagglutination-inhibition tests (HITs) or immunofluorescence assays (IFAs), are usually preferred (see Section 2.2). However, seropositivity has to be interpreted with care because of the frequent cross-reactions among flaviviruses observed in these tests; results should be systematically confirmed by comparative virus neutralization tests (VNTs) that use a panel of viruses known to circulate in the area

under investigation [4,5]. Accordingly, serological tools have to be adapted to specific epidemiological situations involving WNV.

Since WNV was introduced into New York City in 1999, it has rapidly diffused throughout North America. It has infected tens of thousands of humans (>36,800) and horses (>25,000) according to the Centers for Disease Control and Prevention [6] and resulted in widespread bird mortality, causing dramatic declines in some wild bird species (e.g., American crows, *Corvus brachyrhynchos*) [7–9]. In stark contrast, in Europe, where the disease is re-emerging, WNV has caused only sporadic clinical cases and self-limited outbreaks until 2007, with no or isolated incidents of wild bird mortality [10,11]. Several non-mutually exclusive hypotheses have been proposed to explain the different patterns observed on the different continents. They each address one of the four primary components of the WNV epidemiological cycle: The virus, the host, the vector, and the environment. First, it has been suggested that the intrinsic virulence of WNV strains circulating in America and Europe could differ, with the North American strain being more virulent for birds [11–13]. Second, Palearctic versus Nearctic wild bird species have been hypothesized to differ in their susceptibility to WNV infection, with the former having co-evolved with WNV while the latter were initially naive hosts [14]. Third, mosquitoes found in North America and in Europe may differ in their competence as vectors [15]. Finally, the last hypothesis stresses the importance of past exposure to various flaviviruses; exposure to the wide diversity of flaviviruses circulating in Europe, and more generally in the western Palearctic [11,16], might confer partial or complete cross-protection to WNV (see Section 3 for further discussion). Other ecological factors could also, to some extent, account for these different WNV epidemiological patterns. In particular, biodiversity or species richness could potentially act as protective factors via a “dilution effect” or, conversely, they may facilitate WNV transmission [17–19].

The differences in West Nile virus transmission and clinical impact in Europe versus North America imply that diverse and adapted approaches for identifying and controlling WNV infections should be employed. Even within the Euro-Mediterranean, WNV outbreak frequency and severity decrease from east to west (eCDC [20,21]). As a consequence, intervention measures based on experience gained in distant or even neighbouring transmission areas can be misleading, and a detailed description of the eco-epidemiology of a particular WNV outbreak is needed to provide tailored and balanced public health responses. For instance, surveillance of avian mortality proved very useful in North America (where mass wild bird mortality events usually preceded human and domestic animal cases), but it has not yet been useful in Europe, with the exception of some of the European regions experiencing WNV lineage 2 circulation [22–24]. Passive or clinical surveillance of humans and horses as well as serological surveillance of wild birds or equines have been far more instructive in Europe, and their use should be considered by health authorities [25,26]. Moreover, entomological surveillance effectively predicts WNV activity and outbreaks, even though mosquitoes in Europe have been found to have lower infection rates than mosquitoes in the U.S. [27,28].

Similar reasoning should be applied with respect to WNV diagnostic tools: Their validity in each specific WNV epidemiological situation should be verified to ensure that infections caused by varied WNV strains are detected [29]. This process is particularly important in Europe or Africa, where several genetic lineages circulate in overlapping areas; in contrast, only a single-lineage WNV strain (1a) was introduced into North America [30–35]. Furthermore, diagnostic tools should be specific enough to avoid detecting cross-reactions with closely related flaviviruses that may be circulating in the same areas.

Many flaviviruses belonging to the Japanese Encephalitis serocomplex have a wide distribution range, including West Nile virus (WNV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV) in the Americas, Murray Valley encephalitis virus (MVEV) in Australia, Japanese encephalitis virus (JEV) in southern Asia and Oceania, and Usutu virus (USUV) in Europe and Africa [36]. More specifically, in central and eastern Europe, the high prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) and human TBEV vaccination campaigns [37] frequently result in serological cross-reactions when routine diagnostic tests such as WNV ELISAs or IFAs are conducted [38–41]. The interpretation of serological test results may be even more problematic when investigating infections caused by flaviviruses belonging to the same serocomplex, such as WNV and USUV in Europe, since cross-neutralization will also be observed. In such situations, comparative VNTs that include every flavivirus suspected to circulate within a given area are called for. Therefore, prior knowledge of flavivirus diversity at the local level is essential before rigorous serological surveys can be undertaken. In the first section of this review, we assess current flavivirus diversity and the risk of future flaviviruses being introduced into Europe, which could impact the accuracy of WNV serological diagnoses. In the second section, we outline the challenges involved in interpreting the diverse range of WNV serological tests and setting up appropriate surveillance programs in reservoir or susceptible hosts. In the final section, we address the consequences of past exposure to flaviviruses for WNV immunity. Most studies investigating flavivirus cross-protection or infection facilitation have found that prior infection or vaccination with heterologous flaviviruses should provide partial protection against WNV, with more efficient protection being provided by more closely related viruses.

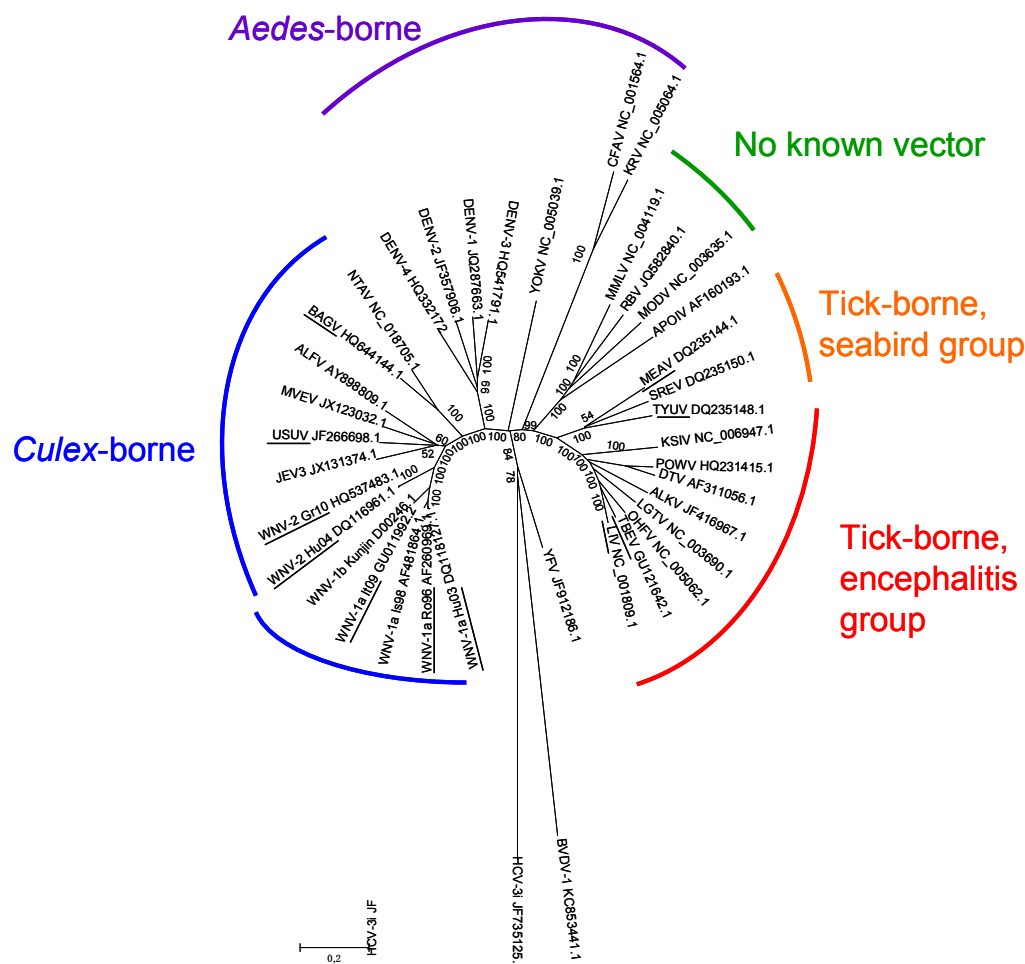
2. Flavivirus Diversity in Europe

The *Flavivirus* genus comprises 53 viruses (ICTV [42]). Many of them are human pathogens of concern, such as the viruses that cause dengue (DENV), yellow fever (YFV), Japanese encephalitis (JEV), West Nile (WNV), or tick-borne encephalitis (TBEV); they are transmitted by mosquitoes (DENV, YFV, JEV, WNV) or ticks (TBEV) [43,44].

Early attempts to define flavivirus relatedness were based on antigenic cross-reactivity in VNTs, HITs, and complement fixation tests (CFTs). Albeit imprecise, serological studies allowed different serocomplexes to be defined, including the JEV (WNV and USUV in Europe), YFV, DENV, and Ntaya virus (Bagaza virus—BAGV—in Europe) serocomplexes [5,45]. Molecular characterization of the flavivirus RNA genome allowed the precise taxonomic classification of flaviviruses and the study of their genetic evolution and dispersal [44,46,47]. Three distinct groups of flaviviruses were identified: tick-borne viruses, mosquito-borne viruses, and viruses with unknown vectors [47]. Mosquito-borne viruses can be further subdivided into *Culex* and *Aedes* clades, which also differ in their vertebrate hosts and pathogenesis (Figure 1). *Culex*-clade viruses have bird reservoirs, are neurotropic, and frequently cause meningo-encephalitis, while *Aedes*-clade viruses have primate reservoirs, are non-neurotropic, and mainly result in hemorrhagic diseases [43,48]. The tick-borne viruses also form two groups: One group circulates among seabirds, while the other, the tick-borne encephalitis group, is primarily associated with rodents. This latter group generally produces encephalitic disease, although Omsk Hemorrhagic Fever virus (OHFV) and Kyasanur Forest Disease virus (KFDV) also cause hemorrhagic diseases in humans. Interestingly, tick-borne flaviviruses seem to evolve at a slower rate than

mosquito-borne flaviviruses, probably as a result of a slower virus replication rate in ticks and longer generation times of their tick hosts [49].

Figure 1. Genetic relatedness of flaviviruses, evaluated using genetic alignments of complete genomic sequences. GenBank accession numbers are indicated on the tree branches of each virus.

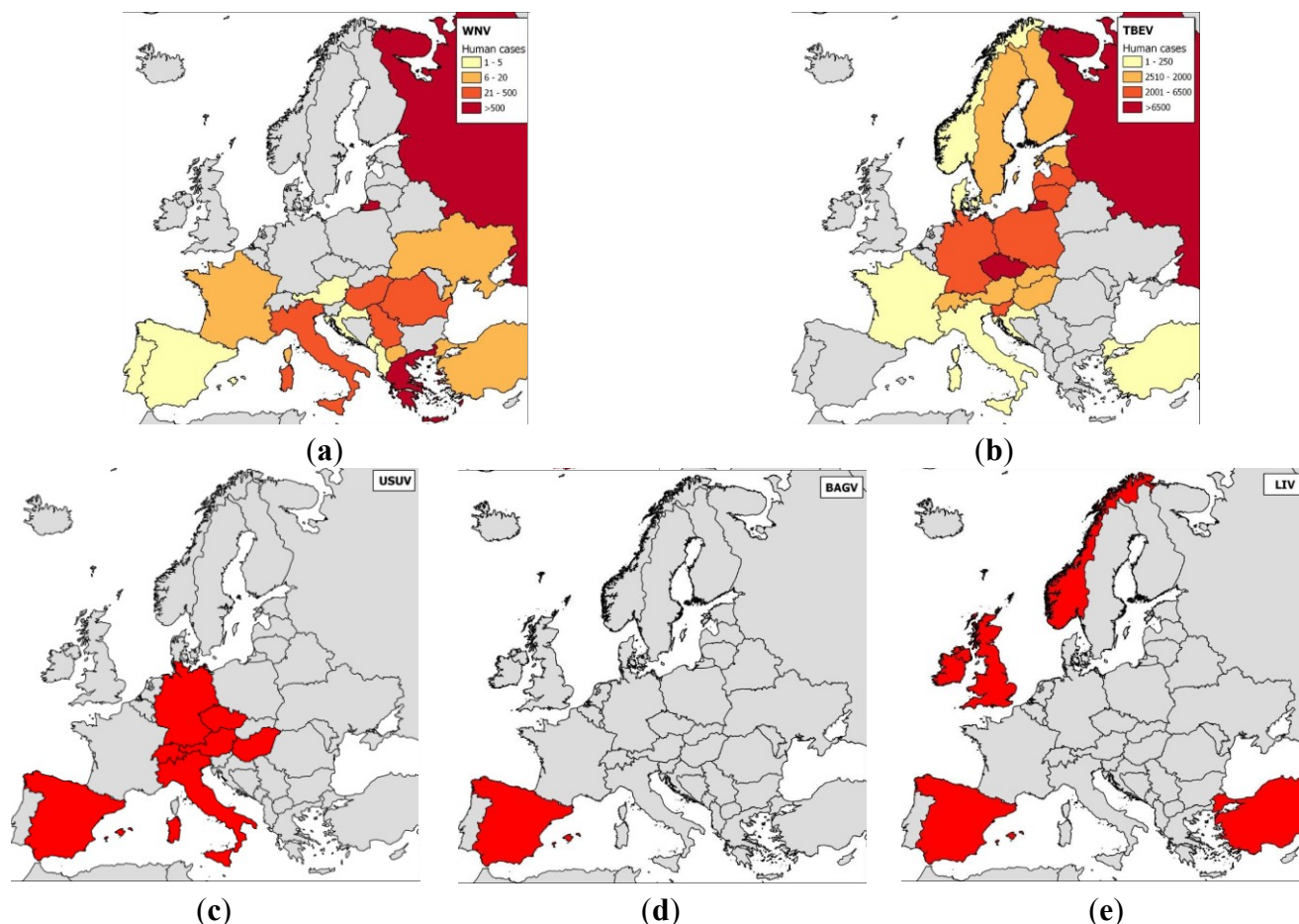


WNV: West Nile virus, JEV: Japanese encephalitis virus, USUV: Usutu virus, MVEV: Murray Valley encephalitis virus, ALFV: Alfuy virus, NTAV: Ntaya virus, DENV: Dengue virus, YOKV: Yokose virus, CFV: Cell Fusing Agent virus, KRV: Kamiti River virus, MMLV: Montana Myotis Leukoencephalitis virus, RBV: Rio Bravo virus, MODV: Modoc virus, APOIV: Apoi virus, MEAV: Meaban virus, SREV: Saumarez Reef virus, TYUV: Tyuleniy virus, KSIV: Karshi virus, POWV: Powassan virus, DTV: Deer Tick virus, ALKV: Alkhurma virus, LGTV: Langat virus, OHFV: Omsk Hemorrhagic Fever virus, TBEV: tick-borne encephalitis virus, LIV: Louping Ill virus, YFV: Yellow Fever virus. 2 outgroups were used, HCV for Hepatitis C virus (*Hepacivirus* genus, *Flaviviridae* family) and BVDV for Bovine Viral Diarrhea virus (*Pestivirus* genus, *Flaviviridae* family). Flaviviruses and WNV strains isolated in Europe are underlined. The phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining with Jukes–Cantor parameter distances (scale bar) in MEGA, version 5.2 [50]. A bootstrapped confidence interval (1000 replicates) and a confidence probability value based on the standard error test were also calculated using MEGA.

Many antigenically-related flaviviruses have been identified, and mosquito-borne flaviviruses have been found on every continent except Antarctica. Similarities in disease symptoms—only two syndromes, encephalitic and hemorrhagic, have been described in humans and animals—make it impossible to

differentiate flavivirus infections clinically and precisely identify circulating flaviviruses. In the next subsection, we will describe flavivirus circulation and introduction risk in Europe (Figure 2).

Figure 2. Maps of the distributions of the main flaviviruses found in Europe.



Notes: (a) WNV—human cases were aggregated across a 10-year period (2003–2012, data obtained from the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), World Organization for Animal Health (OIE), and scientific publications) and the numbers of cases per country are indicated; (b) TBEV—human cases were aggregated across a 10-year period (2000–2009) and the numbers of cases per country are indicated [51,52]; (c) USUV; (d) BAGV; and (e) LIV. For USUV, BAGV, and LIV, countries that reported clinical cases in wild birds (USUV, BAGV) or sheep, goats or horses (LIV) are highlighted in red.

2.1. Epidemiology of Flavivirus Infections in Europe

Tick-borne flaviviruses are among the most medically important arboviruses in Europe. TBEV severely infects more than 10,000 humans every year and is transmitted by *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus*; most cases have occurred in central Europe (Western subtype), Finland, and the European part of Russia (Western and Siberian subtypes) [53] (Figure 2). Tick-borne flaviviruses also comprise the louping-ill virus (LIV) and OHFV. Louping-ill is a long-known disease of sheep [54] that has clear zoonotic potential. LIV is found in Norway, Spain, Ireland, Turkey, and Bulgaria, although it most commonly occurs on British Islands [53]; it is transmitted by *I. ricinus* ticks. OHFV, found in Russia, cycles between rodents (e.g., narrow-headed voles, *Microtus gregalis* or water voles, *Arvicola terrestris*)

and *Dermacentor reticulatus* ticks in western Siberia, causing hemorrhagic diseases in humans and in some rodents (muskrats, *Ondatra zibethicus*) [55].

Several other tick-borne flaviviruses have thus far not been found to cause disease in humans or animals, and their potential pathogenicity in humans and animals is consequently unknown. Meaban virus (MEAV), which is transmitted by soft *Ornithodoros maritimus* ticks among seabirds and was first identified in Brittany, France, is one such flavivirus [56]. Tyuleny virus (TYUV) also belongs to the seabird tick-borne flavivirus group and has been isolated from ticks on the Atlantic coast of France, the Lofoten Islands (Norway), the western U.S. coast, and northern Russia. In contrast to MEAV, TYUV has been implicated in three cases of human illness so far [57].

A wider diversity of tick-borne flaviviruses has been detected in Europe than in North America; the Powassan virus is the major tick-borne flavivirus found to be pathogenic in humans in North America. Mosquito-borne flaviviruses are similarly more diverse in Europe than in North America; specifically, WNV and USUV are widely distributed throughout Europe, and BAGV was identified in Spain [58].

Of all the mosquito-borne flaviviruses, WNV has the most widespread geographical distribution and the largest vector and host range [58]. It was first described in Europe in the 1960s when seropositive animals or virus isolates were discovered in France, Portugal, and Cyprus [59,60]. WNV has historically been considered less pathogenic in humans than DENV or YFV. However, more virulent genotypes have emerged since 1998: Isolates from Israel (1998), Hungary (2003), or North America (1999) belonging to the Israelo-American cluster of WNV lineage 1a are highly pathogenic in birds and mammals [8,31,61], and lineage 2 viruses have caused an increasing number of WNV outbreaks in Europe since 2008 [62,63]. In Europe, WNV has mainly been reported in central and south-eastern Europe, regions in which WNV infections and virulence have recently increased, and the implicated viruses have spread to new areas, including Bulgaria and Greece in 2010, Albania and Macedonia in 2011, and Croatia, Serbia, and Kosovo in 2012. Accordingly, alarming outbreaks were reported in several European countries in 2010; 261 confirmed human cases, including 34 deaths, occurred in Greece, 57 cases and five deaths occurred in Romania, and 480 cases and six deaths occurred in Russia [34,62,64]. Another European country, Italy, has also experienced numerous WNV epidemics caused by genetically divergent isolates; starting in 2008 and 2010, lineage 1 and 2 strains respectively caused outbreaks at locations across the country (e.g., Emilia-Romania in the northeast, Tuscany, Sardinia, and Lazio in the center, and Sicily and Molise in the south) [27,65].

USUV is a flavivirus that originated in Africa and is closely related to WNV. It is transmitted by *Culex* mosquitoes and was most probably introduced into Europe by migrant birds; retrospectively, it was first identified in cases of wild bird die-offs in 1996 in Tuscany, Italy [66]. In contrast to WNV, it rarely causes severe neurological symptoms in humans, but virulent strains have caused considerable bird mortality, especially in blackbirds (*Turdus merula*) in central Europe, starting in Austria in 2001 [67,68]. USUV is known to circulate in Hungary, Switzerland, Italy, Spain, the Czech Republic and Germany [69–75], and USUV neutralizing antibodies were recently found in animals in France and Croatia [76,77].

BAGV is identical to Israel turkey meningoencephalitis virus (ITMV), which was first described in Israel in 1960 based on samples taken from neurologically afflicted turkeys. It has more recently been

found in infected partridges and pheasants in southern Spain [78]. Anti-BAGV antibodies were recently found in the sera of encephalitic patients in India, underscoring the virus' zoonotic potential [79].

Far more flaviviruses have been identified in recent years in Europe. For instance, flaviviruses that exclusively infect insects were discovered in Italy and Spain [80,81], a JEV or a JEV-like virus was found in *Culex pipiens* in northern Italy [82], and Lammi virus, a new flavivirus phylogenetically related to *Aedes*-borne viruses, was identified in Finland [83]. The main concern with the large and expanding diversity of flaviviruses in Europe is that more and more regions are reporting co-circulation of different flaviviruses; for instance, WNV and USUV co-circulate in northeastern Italy [84] and BAGV and WNV co-circulate in southern Spain [85]. Future introductions of tick-borne and mosquito-borne flaviviruses should be anticipated, and the expanding range of flavivirus vectors should be taken into account. Several risk-assessment studies have examined potential introduction routes and scenarios using information on reservoir hosts or infected vectors [86–90]. Among all the flavivirus vectors, *Aedes albopictus*, which vectors DENV and Zika virus, provides a striking example of the successful invasion of new territories [91,92]; it was responsible for autochthonous DENV infections in France and Croatia in 2010 [93,94].

2.2. Vaccination Programs in Europe

In Europe, a few human vaccines against flaviviruses are available, specifically those against TBEV, JEV, and YFV (see Table 1); it is noteworthy that no human vaccine against WNV has yet been developed [37]. WNV can induce severe neurological symptoms in older or immunosuppressed patients, which renders vaccine development more challenging since the safe and efficient introduction of vaccinal antigens into weakened immune systems requires innovative strategies [95]. Because extensive reviews on WNV vaccines on the market and in development have been published recently [4,96], this review will focus on the vaccination programs against flaviviruses currently in place in Europe and the regional differences they demonstrate. The objective is to highlight expected sources of variation when serologically screening humans or animals for WNV. Indeed, up to now, no diagnostic tool has been able to distinguish between naturally infected and vaccinated people or animals, and thus vaccination history should be carefully considered by clinicians and diagnosticians when interpreting the serological results of flavivirus screening tests.

In the case of WNV, only veterinary vaccines are currently used in Europe and have proven to be very effective in protecting horses from meningoencephalitis in North America [97]. While four vaccines are currently available in the U.S. (two inactivated, one DNA, and one canarypox recombinant, see Table 1), only one of the inactivated vaccines (EQUIP[®] WNV, formerly Duvaxyn[®] WNV, Fort Dodge Animal Health/Pfizer) and the canarypox recombinant vaccine (PROTEQ WEST NILE[®], Merial/Sanofi Aventis) have been commercialized in Europe (since 2009 and 2011, respectively). Immunization schedules involve administering two doses of vaccine 3 to 6 weeks apart and annual boosters before the WNV transmission season (occurring in August–October in Europe for mammalian hosts). The emergence and pathogenicity of lineage 2 WNV strains in Europe has put into question the ability of existing WNV vaccines, which were developed from North American lineage 1 isolates, to provide protection against European WNV isolates. Both inactivated and canarypox vaccines have been shown to protect against virulent lineage 2 strains in immunochallenged mice and horses,

respectively [98,99]. It should be noted, however, that since WNV outbreaks in horses in Europe have been limited and unpredictable, the two WNV vaccines have been used sparingly in European countries, predominantly in Italy and in Hungary (S. Lecollinet, pers comm.).

Outside of Europe, WNV vaccination programs have been implemented to protect highly susceptible domestic bird species, e.g., geese (inactivated vaccine available in Israel [100]) and endangered bird species (DNA vaccine in California condors (*Gymnogyps californianus*) [101] or inactivated and canarypox recombinant vaccines commercialized for horses used in scrub-jays (*Aphelocoma insularis*) [102]. DNA vaccines have been also used to experimentally reduce WNV viremia in bird reservoir hosts, such as crows (*Corvus brachyrhynchos* and *ossifragus*) [103,104] and American robins (*Turdus migratorius*) [105], in the lab. The latter species is considered to play a key role in virus amplification in the U.S. Nonetheless, to our knowledge, birds have never been vaccinated against WNV, nor against other flaviviruses, in Europe.

In humans, YFV and JEV vaccines are recommended for European travellers visiting areas in which the viruses are endemic, e.g., tropical and subtropical regions of Africa and South America or Southeast Asia, respectively. Vaccination against YFV is still based on the highly effective and relatively safe 17D live-attenuated vaccines initially developed in 1937 by Max Theiler [37,106]; protection lasts for at least 10 years. Inactivated and live-attenuated vaccines are also available for the immunoprophylaxis of Japanese encephalitis (Table 1). Inactivated vaccines were originally derived from infected primary cells (mouse primary cell cultures), but the IXIARO[®] vaccine, based on the formalin-inactivated attenuated SA14-14-2 JEV strain grown in Vero cells, has demonstrated excellent safety and immunogenicity profiles; it is now the only JEV vaccine licensed in Europe, the U.S., or Australia [107,108]. In the case of TBEV, the epidemiological situation is different. TBEV circulates endemically in Europe and causes more than 10,000 severe cases requiring hospitalisation every year. TBEV vaccination of people with a high risk of exposure should therefore be encouraged.

Table 1. Types of flavivirus vaccines approved for use in target species (humans and horses) in Europe or elsewhere in the world if not available in Europe.

Virus	Vaccine form	Antigen
JEV	Inactivated vaccine	Whole virus
	Ixiaro [®] —licensed in Europe, JE-VAX [®] —commercialization stopped	
	Attenuated JEV vaccine (strain SA14-14-2)	Whole virus
	Available only in China and South Korea	
	Chimeric vaccine combining the YFV non structural (NS) proteins and the JEV prM-E	Precursor
Human vaccine	Chimeri Vax-JE [®]	membrane-Envelope (prM-E)
	Available only in Australia and Thailand	
	Inactivated vaccine	
TBEV	Ticovac [®] or Encepur [®] or FSME-Immune [®] —licensed in Europe	Whole virus
	TBE Moscow vaccine [®] and EnceVir [®] —licensed in Russia strain from Brazil); attenuated by passage through embryonated eggs	
	Stamaril [®] or YF-VAX [®] —licensed in Europe and the rest of the world	
YFV	Live-attenuated vaccine (Rockefeller 17D strain or 17DD strain from Brazil); attenuated by passage through embryonated eggs	Whole virus
	Stamaril [®] or YF-VAX [®] —licensed in Europe and the rest of the world	

Table 1. Cont.

Virus	Vaccine form	Antigen
JEV	Inactivated vaccine	Whole virus
	Nisseiken [®]	
	Available only in Japan	
West Nile-Innovator [®] (U.S.) or Vetera [®] WNV (U.S.) or EQUIP [®] WNV (Europe)	Inactivated vaccine + adjuvant	Whole virus
Horse vaccine	Chimeric recombinant canarypox virus	prM-E
	Recombitek [®] Equine WNV (U.S.), Proteq West Nile [®] (Europe)	
	Chimeric vaccine combining YFV NS proteins and WNV prM-E	
WNV	PreveNile [®]	prM-E
	Available only in the U.S., recalled in 2010	
	DNA vaccine + adjuvant	
	West Nile-Innovator [®] DNA	prM-E
	Available only in the U.S.	

TBE can be effectively prevented in the field using purified inactivated whole virus vaccines that are produced in Europe and Russia from cell cultures (such as FSME-IMMUN[®] or Encepur[®], manufactured in Austria and Germany, respectively) and that are administered over the course of a comprehensive vaccination program that comprises multiple boosters. Their use varies widely in areas in which the virus is endemic, with high vaccination coverage in Austria (88%) and in the Sverdlovsk region of Russia, where a mass immunization program was initiated in 1996 [37,109].

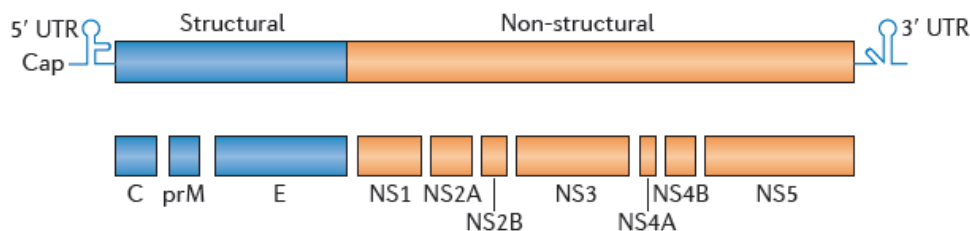
In general, Europe has experienced complex and varied situations with regards to the natural occurrence of flaviviruses and flavivirus vaccination programs, which complicates the use of WNV serological diagnostic tools.

3. Serological Cross-Reactions between West Nile and Related Flaviviruses

Flaviviruses are antigenically related, as originally shown by HITs [110], ELISAs, or VNTs [45]. Although broad serological cross-reactions in general and cross-neutralizations in particular are observed and allowed defining serocomplexes, their extent and duration are strongly dependent on amino acid similarity in a few viral proteins [5,111].

3.1. Viral Determinants of Serological Reactions

Flaviviruses consist of enveloped and spherical particles surrounding a ssRNA+ genome of about 11 kb (Figure 3). The flavivirus genome comprises a single open reading frame that codes for three structural proteins, the envelope protein (E), the precursor membrane (prM), the capsid (C), and at least seven nonstructural proteins (NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B and 5).

Figure 3. Organisation of the flavivirus genome.

The immunodominant antigens of the viral particle are the E, the prM, and NS1 proteins, and most serological tools rely on the detection of anti-E and/or anti-NS1 antibodies. The major neutralizing determinants are present in the E protein [112]. Upon folding, the E protein has three structural domains, DI, DII, and DIII, which are separated by short flexible hinges and organized as antiparallel homodimers in mature virions. As a result of this conformation, antibodies can more readily access the outer or lateral surfaces but have a harder time reaching the inner surfaces [113]. The center of DI connects with both DII, which is an elongated finger-like domain that contains a highly conserved hydrophobic fusion loop and is involved in endosomal membrane fusion, and DIII, which is an immunoglobulin-like domain that mediates virus attachment to host cells [114,115].

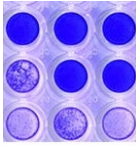
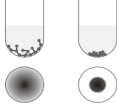
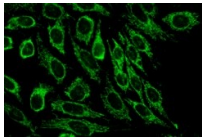
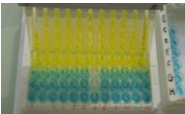
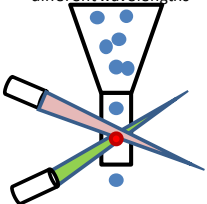
DI and DIII contain virus-specific epitopes, as evidenced in a study of monoclonal antibodies that found that certain consensus epitopes are common to WNV strains but are distinct in other flaviviruses [116]. The epitopes recognized by broadly cross-reactive antibodies have been mapped to the fusion peptide loop located at the tip of DII, a region that is highly conserved among all flaviviruses [117,118]. DIII is also recognized by strongly neutralizing antibodies, and WNV resistance to antibody-mediated neutralization was correlated with mutations in DIII epitopes [116,119]. However, the titer of antibodies against DIII does not necessarily correlate with the clinical outcome in human patients [120]. Conversely, the fusion loop of DII, which is cryptic in mature virions, does not contribute to flavivirus neutralization [120,121]. Nevertheless it has been shown in rodent models that protection against WNV can be afforded by poorly neutralizing anti-DII antibodies [120,122], presumably because their Fc portions interact with complement factors and with Fc receptors on monocytes and macrophages [122,123].

The NS1 protein also participates in protective immunity against flaviviruses. It is unique in that it is the only glycoprotein that is secreted by flavivirus-infected cells and is also exposed at the surface of infected cells [124,125]. Protective immunity is believed to result when anti-NS1 antibodies bind to NS1 proteins associated with the cell surface, which facilitates the phagocytosis by activated Fc- γ receptors and clearance of infected cells [116,126].

3.2. WNV Serological Diagnostic Tools

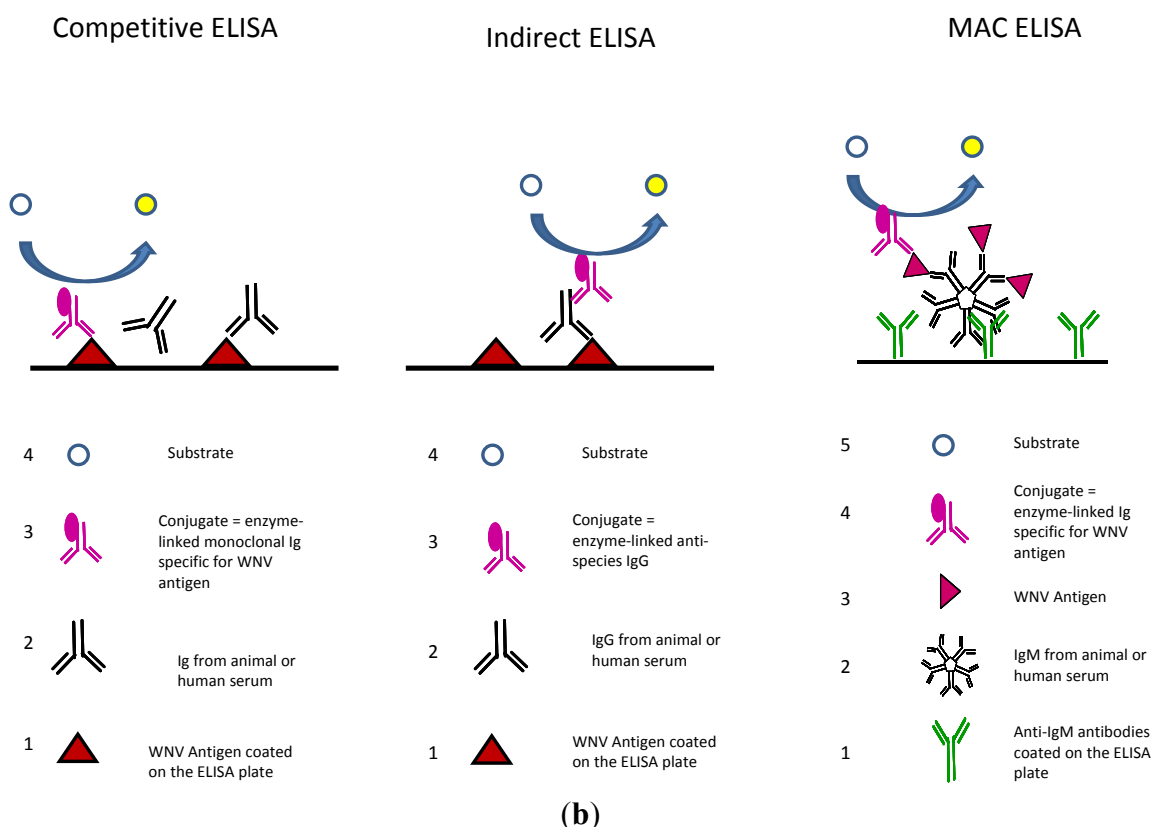
Many diverse serological tools are available to diagnosis or screen for WNV antibodies [127]. The most commonly used are VNTs (PRNTs or micro-VNTs), IFAs, and ELISAs. The principles underlying these methods as well as their advantages and drawbacks are summarized in Figure 4(a).

Figure 4. (a) Main serological tests used to diagnosis WNV (b) Illustrations of the three different ELISA methods: Competitive, indirect IgG, and MAC (the numbers indicate step order).

	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  Hemagglutination inhibition: - + 	Whole virus Fluorescence of virus-infected cells in the presence of antibodies in the serum 	Whole virus, viral cell lysate or recombinant proteins (prM-E, NS1, E-DIII...) Colorimetric reaction intensity correlates with the amount of antibodies present in each well 	Recombinant proteins (prM-E, E-DIII...) Fluorescence intensity and bead color coding are measured by 2 lasers that excite the beads at different wavelengths 
Interpretation					
Advantages	- Gold standard - Highly specific - Not species specific	- Inexpensive - Screening method (a few hours) - Not species specific - BSL-3 facility not required once the antigen has been prepared	- 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	- 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	- Multiplexing capacity - Rapid (1 day) - Small sample volumes are needed
Drawbacks	- 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	- 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	- Less specific than VNT: cross reactions within the JEV serocomplex and with other flavivirus serocomplexes (particularly for IgG IFA)	- Less specific than VNT: cross-reactions within the JEV serocomplex and with other flavivirus serocomplexes (particularly for ELISA IgG)	- 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

(a)

Figure 4. Cont.



3.2.1. PRNT/Micro-VNT

The gold standard WNV serological test is still the plaque reduction neutralization test, which is performed according to standard protocols with a threshold plaque reduction level of 90% (PRNT90) [128,129]. In this test, the ability of antibodies to reduce lysis plaque number in cell cultures is visually quantified; a sample is considered seropositive if the threshold level (relative to the control) is attained. The micro-virus neutralization test (micro-VNT) is a modification of the PRNT and allows a larger number of samples to be screened using cell microplates.

Overall, VNTs are time consuming and require that infectious virus be handled in Biosafety Level 3 (BSL-3) facilities or that a chimeric flavivirus such as the YFV/WNV recombinant virus (ChimeriVax[®] WN) be handled in BSL-2 facilities. They have a higher level of specificity but are less sensitive than ELISAs [130], and their sensitivity may depend on the WNV strain involved [131].

3.2.2. Hemagglutination Inhibition Tests (HITs) and Complement Fixation Tests (CFTs)

HITs are still used in some laboratories, whereas CFTs are hardly ever performed because it is difficult to maintain the satisfactory quality controls they require [68]. HITs exploit the ability of the E protein to aggregate avian erythrocytes in the absence of anti-E neutralizing antibodies. Test results are affected by the presence of non-specific inhibitors [132]. HITs are less sensitive than ELISAs and present the same drawbacks, e.g., a high level of antibody cross-reactivity [130,133].

3.2.3. Immunofluorescence Assays

IFAs use slides coated with flavivirus-infected cells. Serum samples are deposited on the slides, and the attachment of antibodies is revealed using fluorophore-conjugated immunoglobulins that demonstrate specificity to anti-species IgGs or IgMs. This method is fast and easy to perform and may be used to differentiate between IgM and IgG antibody responses. However, it is not adapted for screening purposes. IFA slides coated with WNV, JEV, YFV, and DENV are commercially available for the diagnosis of human infections [39]. BSL-3 facilities are not required because inactivated virus is bound to the slides. When dealing with antibodies against viruses within the JEV serocomplex, IFAs demonstrate greater specificity in detecting IgMs than do ELISAs; in contrast, IFAs show the same level of specificity as competitive and IgG indirect ELISAs when detecting IgGs [39,134].

3.2.4. ELISA

ELISAs are preferred screening tools because of their rapidity, sensitivity, reproducibility, and affordability. Three different assays are commonly used: The competitive ELISA, the indirect IgG ELISA, and the IgM antibody-capture (MAC) ELISA (Figure 4(b)). Ready-to-use diagnostic kits for veterinary and human purposes are commercially available.

The MAC-ELISA is suitable for detecting acute infections (8–60 days post-infection) in humans and horses; however, its usefulness in determining acute infections is questionable in humans, in whom WNV IgMs have been reported occasionally to persist for over a year [4]. This test is a highly valuable tool because IgM antibodies are hard to detect using VNTs or HITs [133,135] and exhibit less cross-reactivity than IgG antibodies [136,137].

Indirect IgG ELISAs require the use of adapted anti-species conjugated antibodies [4,138]. Because of the wide variety of WNV hosts, veterinary diagnostic laboratories are gradually replacing indirect IgG tests with competitive (or blocking) ELISAs, which allow the testing of samples from virtually all animal species [139]. This versatility relies on the ability of WNV antibodies present in the sample to compete for antigenic binding sites with WNV-specific monoclonal antibodies. Competitive ELISAs are the most sensitive of all the developed serological technologies, but they are most appropriate for screening purposes because of their lower level of specificity.

The sensitivity and specificity of ELISAs are strongly influenced by the nature of the bound antigen. Attempts have been made to improve ELISA specificity using a recombinant version of the DIII of the E protein [140,141] or by substituting NS1 [142] for the whole virus or prM-E antigens. E-DIII ELISAs are able to differentiate between infections caused by flaviviruses belonging to JEV or TBEV serocomplexes [140] as well as between those caused by WNV and other flaviviruses belonging to the JEV serocomplex, such as JEV, MVEV, and SLEV [141]. NS1 ELISAs can differentiate between infections caused by WNV and those caused by JEV or SLEV in animals and do not react with sera originating from animals vaccinated with most DNA or recombinant WNV vaccines (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*—DIVA—strategies) [96,142,143].

3.2.5. Microsphere Immunoassays

Microsphere immunoassays are potentially useful tools because of their multiplexing capacity; they couple different flavivirus antigens to fluorescent and differentiable beads [144]. Nevertheless, cross-reactivity within the JEV serocomplex among antibodies targeting the E antigen occurs as frequently in microsphere immunoassays as in ELISAs, and specificity thus needs to be improved.

In conclusion, the specificity of many serological tests is still an issue of major concern. High-throughput screening tests that perform at high level of specificity are crucial, and recent improvements have been made in this field [96]. The improved selection of relevant epitopes from a wider range of monoclonal antibodies that target different flaviviruses will surely help determine the precise antigenic sites that differ among these flaviviruses and will thus ultimately lead to the development of more specific diagnostic tests [145].

3.3. Misinterpretation in the Diagnosis and Surveillance

Serological cross-reactivity may lead to the misinterpretation of diagnostic test results obtained from suspected clinical cases and samples collected during WNV epidemiological serosurveys. Awareness of possible cross-reactions is essential given that the aim of such investigations is to correctly identify the viruses responsible for the observed serological reactions. The nature and prevalence of cross-reactions differ depending on the target species and geographical location. Overall, the risk of cross-reactions exists wherever multiple flaviviruses co-circulate, including in Europe.

3.3.1. Difficulties for Accurate Diagnosis

The serological diagnosis of WNV infection is complicated by the fact that the patients or animals may have previously been exposed to or vaccinated against cross-reacting viruses. In this context, it is essential to use tests that are both sensitive enough to detect WNV infection and specific enough to distinguish an acute WNV infection from one caused by a closely related virus or remnants of prior WNV exposure. Here, we report the results of field and experimental studies that have compared diverse serological methods with the objective of optimizing the specificity of the serological diagnosis of WNV infection.

Use of ELISAs

ELISAs are the most commonly used diagnostic assays because of their simplicity and relatively low cost; they also require few specialized apparatus and facilities. When WNV first emerged on the North American continent in 1999, samples of serum and cerebrospinal fluid from the first eight patients hospitalized with viral encephalitis and meningitis tested positive for anti-SLEV antibodies based on IgM-capture and indirect IgG ELISAs; SLEV is a common flavivirus that is an enzootic of North America [146]. However, doubt remained as to whether SLEV was the etiologic agent because the clinical manifestations were not those typically associated with SLEV infection, polymerase chain reactions using SLEV-specific primers yielded negative results, and serological testing using a SLEV-specific PRNT revealed only low levels of neutralizing antibodies [146,147]. WNV was later identified as the cross-reactive etiologic agent [148].

Similar misinterpretations of serological results may occur in Europe because those being tested may have been exposed to co-circulating or newly emerging flaviviruses or have encountered flaviviruses while traveling. For example, although successive experimental infections in horses have suggested that WNV-specific competitive ELISAs using anti-NS1 MAb 3.1112G as a conjugate are highly specific for WNV [149], high rates of false-positives were obtained for human sera from patients with confirmed DENV infections [150]. This serological method therefore cannot be used to accurately diagnose WNV infections in humans in areas where other flaviviruses, such as DENV, are endemic. Similarly, during the 2010 WNV outbreak in Greece, commercially-available ELISA kits were used to test for IgMs and IgGs against WNV, DENV, and TBEV in sera and cerebrospinal fluid sampled from patients suffering from encephalitis or meningitis. A high degree of cross-reactivity was observed between WNV and DENV IgMs, although the WNV-specific antibodies clearly demonstrated a stronger serological response [151]. In this study, none of the patients were vaccinated against JEV, YFV, or TBEV. Knowing patient vaccine history is important when interpreting serological results because vaccination may interfere with the accurate diagnosis of acute WNV infection in humans and horses. For instance, Shirafuji *et al.* [152] showed, using WNV and JEV MAC-ELISAs, that horses experimentally infected with WNV tested negative for WNV IgM antibodies if they had previously been vaccinated against JEV, whereas WNV IgM antibodies were detected in the non-vaccinated group. In addition to vaccination records, the travel history of each patient needs to be considered because WNV serodiagnosis should take into account the possibility of prior exposure to naturally circulating flaviviruses [39].

Other methods, such as IFAs that detect IgMs or ELISAs that use virus-specific epitopes such as rEDIII, may prove to have greater specificity than above-mentioned ELISAs. However, studies consistently discourage basing a flavivirus serodiagnosis on single assay and only searching for a single virus [39]. Furthermore, if multiple flavivirus infections or vaccination against other flaviviruses are likely, then repetitive sampling is of great importance, as the etiological virus could be misdiagnosed if only a single sample is tested [149]. Even though it is difficult to do in the field, physicians and veterinarians are strongly encouraged to collect both acute and convalescent sera, spaced about 2–3 weeks apart, in order to pick up on seroconversions and identify false negatives that result from delayed IgG and IgM responses in individuals with acute WNV infections. Overall, this level of complexity in flavivirus diagnosis likely leads to an underestimation of the incidence of acute WNV infections worldwide.

Use of Virus Neutralization Tests

As mentioned earlier, VNTs have a high degree of specificity for target flaviviruses, but cross-neutralization by antibodies against viruses within the same serocomplex is still observed. As a result, a thorough comparison of the end point titers obtained using other flaviviruses known to be endemic in the area should be performed [45,153]. Virus identification thus relies on finding the virus associated with the highest neutralization titers, provided that said titers are at least fourfold higher than those associated with the second-ranked virus; however, difficulties may nonetheless arise if two consecutive flavivirus infections take place [154].

As a consequence, diagnostically differentiating among viruses may be hard in areas in which flaviviruses are hyperendemic [155]. In particular, it has been experimentally shown that horses previously vaccinated against JEV had higher neutralizing antibody titers against both JEV and WNV

after a WNV challenge and that their levels of JEV-neutralizing titers were higher than or equal to their levels of WNV-neutralizing titers [152].

3.3.2. Challenges for WNV Surveillance Programs

The use of tests with high levels of specificity is even more important in WNV serological surveillance because the expected prevalence in the target population is lower and therefore the risk of obtaining false positives is higher. Another technical constraint is the necessity to rapidly and simultaneously screen large numbers of samples; this need makes ELISAs the method of choice since they are inexpensive and safe to perform under minimal biocontainment conditions. However, confirmation of sample seropositivity using VNTs is required to specifically identify the virus(es) responsible for the observed serological reactions. Because PRNT90 lacks sensitivity in weakly exposed populations, some authors have suggested that PRNT50 should be used in serological surveys; however, this latter test is not reliable enough to obtain robust conclusions [131,156,157].

In humans, serosurveys most often rely on sera collected from healthy blood donors whose vaccination and travel histories are unknown even though such factors may strongly affect the results of the serological tests used to detect WNV-specific antibodies. For example, in North Tyrol, initial ELISA results suggested that WNV seroprevalence was 46.2%; however, comparative neutralization tests revealed the existence of cross-reactions with anti-TBEV antibodies or other vaccine-associated flaviviral antibodies, which generated false positives. Accounting for these false positives, WNV seroprevalence was found to be 0.5% instead [158]. In particular, it has been shown that people vaccinated against YFV are more likely to neutralize WNV than those not vaccinated against YFV [38].

Estimating the likelihood of encountering cross-reactions is particularly important in studies that use animal sentinels such as horses or captive birds to rapidly detect WNV circulation [26,156,159,160]. Depending on the geographical location, serological diagnostic algorithms may help differentiate WNV from other, co-occurring flaviviruses [154].

The results of serosurveys of free-ranging birds are particularly complex to interpret because some species are long-distance migrants that may encounter WNV and other flaviviruses at a large variety of exposure sites [87,161]. However, sedentary bird species in Europe may also be exposed to a wide diversity of flaviviruses [16,67,78]. Parallel titration for antibodies against several flaviviruses using VNTs is therefore essential in identifying exposure to potentially emerging flaviviruses and is even more crucial in assessing the continued transmission of introduced flaviviruses in Europe [68,76,85,132,162–164]. Similar constraints exist in serosurveys of wild ungulates because the diversity of the flaviviruses that may circulate in these species is poorly known [165].

Determining the age of seropositive hosts is of the utmost importance in WNV serosurveys, even if age can only be estimated, as is the case for wild animals. Younger animals should be excluded from immunological analyses because the presence of maternal antibodies in their systems could lead to a misinterpretation of the results. Maternal antibodies against WNV have been shown to remain detectable in the serum of horses for up to 120 days [166] and of birds for up to 9 days in passerines [167] and 42 days in domestic chicken [168]. If young animals that are old enough to have cleared maternal antibodies are seropositive, it suggests that recent transmission has occurred within a group or population, and the results may thus help identify the time period during which the virus was circulating [76,132].

Furthermore, enzootic or epizootic circulation patterns can also be inferred by analyzing seroprevalence across different age classes; enzootic transmission should be associated with increased seroprevalence rates in older individuals [19,169].

As previously mentioned, the level of serological cross-reactivity frequently observed among flaviviruses can lead to diagnostic misinterpretation, but it could also have a beneficial effect by ensuring partial or complete cross-protection against serial flavivirus infections. On the other hand, it could also facilitate subsequent flavivirus infections via a mechanism called antibody-dependent enhancement (ADE), which has mainly been described for the dengue flavivirus but is possibly applicable to other flaviviruses.

4. Antibody-Dependent Cross-Protection or Enhancement among Flaviviruses

Few flavivirus vaccines are currently available for human use, and two in particular are lacking: those against the widespread DEN and WN viruses. It is therefore of utmost interest to evaluate the capacity of flavivirus vaccines to protect against heterologous flaviviruses. Cross-protection can most easily be assessed using vaccination trials that employ appropriate experimental conditions: experiments in which animal models have been chosen, appropriately controlled, and immunologically challenged after initial vaccination or infection with heterologous flaviviruses. Furthermore, using VNTs, the neutralizing capacities of sera obtained from vaccinated target species can be analysed and may also provide the scientific and medical community with valuable information.

4.1. Evaluation of Cross-Protection in Animal Models

Several animal models have been used to assess the level of heterologous protection against flaviviruses; these models include two epidemiologically important bird species, house finches (*Haemorrhous mexicanus*) and red-winged black birds (*Agelaius phoeniceus*), as well as four mammal species, Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), Swiss mice (*Mus musculus*), bonnet macaques (*Macaca radiata*) and pigs (*Sus domesticus*). The major results of studies addressing this topic are summarized in Table 2.

These animal models illustrate that prior immunization with heterologous flaviviruses and a challenge with a virulent strain generally induce immune booster effects, marked by an increase in neutralizing antibodies, a reduction or absence of the viremic phase after challenge, and subsequent complete or partial clinical protection (evaluated only when the challenge flavivirus was pathogenic in the animal species). This protective effect was readily observed for flaviviruses belonging to the same serocomplex.

Table 2. Assessment of the heterologous protection afforded by prior flavivirus infection or vaccination in animal models.

	Species (sample size)	Infection or Vaccination	Challenge	Heterologous protection	Publication
Birds	House finches (8)	SLEV Kern217 virulent strain	WNV NY99 virulent strain	Complete clinical protection (0/8 death vs. 3/4 deaths in control group), but insufficient virological protection (viremia, mean of 4.6 (2.7–6.4) log ₁₀ PFU/mL considered sufficient to infect susceptible mosquitoes)	[170]
	House finches (8)	WNV NY99 virulent strain	SLEV Kern217 virulent strain	Sterilizing immunity: absence of viremia (0/8 vs. 4/4 in control group)	[170]
	Red-winged blackbirds (8)	WNV NY99 virulent strain	JEV virulent Indian strain	Nearly complete virological protection (1/16 viremic birds vs. 16/16 controls)	[171]
	Red-winged blackbirds (8)		(genotype III) JEV virulent Vietnamese strain (genotype I)		
Mammals	Pigs (2)	MVEV virulent OR2 strain	JEV virulent Nakayama strain	Sterilizing immunity: absence of viremia (0/2 vs. 1/1 in control group)	[155]
	Pigs (2)	WNV mildly virulent KUN HU6774 strain	JEV virulent Nakayama strain	Sterilizing immunity: absence of viremia (0/2 vs. 1/1 in control group)	
	Bonnet macaques (3)	Formalin-inactivated JEV strain (733913)	WNV virulent 68856 strain	Complete clinical protection (0/3 death vs. 2/3 deaths in control group)	[172]
	Bonnet macaques (5)	Formalin-inactivated WNV strain (68856)	JEV virulent 733913 strain	Partial clinical protection (1/5 death vs. 1/1 death in control group)	
	Hamsters (30)	JEV SA14-2-8 vaccine strain	WNV virulent NY99 strain	Complete clinical protection (0/30 death vs. 14/30 deaths in control group). Viremia lowered by about 3 log	[173]
	Hamsters (32)	SLEV virulent Be Ar 23379 strain	WNV virulent NY99 strain	Complete clinical protection (0/32 death vs. 14/30 deaths in control group). Viremia lowered by about 4 log	
	Hamsters (30)	YF 17D vaccine strain	WNV virulent NY99 strain	Partial clinical protection (4/30 deaths vs. 14/30 deaths in control group). Viremia slightly lowered	
	Hamsters (50)	DENV-2 New Guinea C strain	WNV virulent strain	Partial clinical protection (8/50 deaths vs. 50/50 deaths in control group).	
	Swiss mice (29)	DENV-2 New Guinea C strain	JEV virulent Peking strain	Complete clinical protection (0/29 deaths vs. 38/60 deaths in control group). Sterilizing immunity: absence of viremia.	[175]
	Swiss mice (45)	DENV-2 New Guinea C strain	SLEV virulent Pinellus P 15 strain	Partial clinical protection (17/45 deaths vs. 80/90 deaths in control group).	

4.2. Evaluation of Cross-Protection in the Field

Credible data on heterologous protection in the field have mainly been obtained by studying the *in vitro* neutralization capacity of human sera sampled from vaccinated individuals. Mansfield *et al.* [38] used PRNTs to investigate flavivirus cross-reactivity in sera from a human cohort with a history of vaccinations against TBEV, JEV, and YFV. The PRNTs indicated that 64% (16/25), 89% (25/28), and 35% (9/26) of the samples tested contained TBEV, JEV, and YFV neutralizing antibodies, respectively. Neutralization of LIV, DENV-2, and WNV occurred in 88% (22/25), 38% (10/26), and 53% (15/28) of cases, respectively; in contrast, no significant neutralization of MVEV was observed. Vaccination history modified WNV cross-neutralization efficacy: individuals that had received the three vaccinations had an increased chance of being WNV-neutralizing-antibody positive than individuals vaccinated against TBEV and JEV alone.

It was clear that, in humans, vaccination against TBEV and JEV could elicit an antibody response capable of limited WNV neutralization. Although this study did not control for variables such as the age of the subjects or the time between YFV vaccination and blood sampling, the results suggested that the additional vaccination against YFV enhanced the ability of sera to neutralize WNV [38]. This finding differs from that of a previous study that concluded that JEV vaccination was more effective than YFV vaccination at eliciting WNV cross-protection through cross-reactive antibody responses [176]. Current vaccines against YFV are live-attenuated rather than inactivated and are thus likely to be more immunogenic, stimulating a broader spectrum of responses and inducing a strong humoral and cell-mediated immune response. Interestingly, a recently published preclinical assessment of JE-ADVAX®, a new candidate JEV vaccine that consists of an inactivated JEV strain and a delta inulin adjuvant, suggested that the vaccine was capable of inducing robust cross-protective immunity against a virulent WNV strain used to challenge a murine model [177]. This study and others testing the antigenicity of inactivated and adjuvanted or non-adjuvanted JEV vaccines (JE-VAX®) compared to that of live-attenuated JEV vaccines (the SA-14-14-2 strain used in China) stress the importance of adjuvant formulation in the induction of high-quality heterologous immunity by inactivated flavivirus vaccines [123,178].

Most individuals vaccinated against TBEV demonstrated a LIV neutralizing response. There is currently no human vaccine available for tick-borne flaviviruses, apart from TBEV, but the results presented by Mansfield *et al.* [38] suggest that vaccination against TBEV may offer partial protection against LIV infection in humans. Moreover, a TBEV vaccine based upon the European prototype Neudoerfl strain was recently shown to induce cross-reactive antibodies in humans, both against other TBEV subtypes as well as against more distantly related flaviviruses, such as OHFV [179].

Cross-reactivity among antibodies against flaviviruses could significantly contribute to the development of effective broad-spectrum human vaccines against WNV and other existing or emerging flaviviruses. ChimeriVax technology has utilized this cross-reactivity to its advantage in the development of vaccine candidates [178,180]. Ultimately, chimeric vaccines that assemble components from different individual flaviviruses would be of great help in countries dealing with different flaviviruses.

The results of all of the studies presented in Sections 3.1 and 3.2 concur in finding that at least partial immunity to heterologous flaviviruses is afforded by available or candidate vaccines. Nevertheless,

since the extent and duration of cross-neutralization and cross-protection are strongly dependent on the degree of amino acid similarity among flaviviruses, it is likely that vaccination against more distantly related flaviviruses will not be as efficient in inducing protection [37]. The following question remains to be addressed: In the case of non-optimal cross-reactions, could vaccination or infection result in ADE-mediated disease exacerbation, as frequently described for DENV?

4.3. ADE Risk

In some instances, the presence of cross-reacting antibodies acquired during a primary infection could increase the infectivity and exacerbate the disease outcome of a second, antigenically-related virus. This phenomenon, called ADE, has been observed *in vitro*, and is still the subject of debate for a few viruses, including *Flavivirus* species such as DENV. The most severe form of the disease, dengue hemorrhagic fever or shock syndrome (DHF/DSS), mainly occurs after two or more consecutive infections with different DENV serotypes (DENV strains are classified into four serotypes, 1–4) [181–183] and may be mediated by the interaction of IgG-virus immunocomplexes with Fc- γ receptor-bearing cells, such as monocytes/macrophages, dendritic cells, and endothelial cells, which subsequently become infected [182]. Whether this phenomenon also occurs as a result of consecutive infections with other flaviviruses is still a matter of speculation. On the one hand, experimental studies have shown that the ADE of WNV infections can be induced *in vitro* using rabbit hyperimmune antisera developed against a wide range of flaviviruses, including members of both the JEV and TBEV serocomplexes, whereas the ADE of TBEV infections is only elicited *in vitro* by members of its own serocomplex [184]. On the other hand, evidence of the ADE of flavivirus infections in nature is still lacking. However, obtaining evidence of ADE is not straightforward given that the distribution of many flaviviruses is either geographically [36] and/or ecologically [16] restricted. Nevertheless, as flaviviruses emerge in areas outside of their traditional geographical ranges, the co-circulation of different flaviviruses within the same area is becoming more common. For instance, co-circulation has already been observed in areas of central and eastern Europe, where the recently emerged WNV strain co-occurs with endemic TBEV. A recent report describing an unusually severe TBEV case in a patient in Hungary previously exposed to WNV suggested that the case's severity could result from ADE [185].

As previously mentioned, human vaccines against flaviviruses (JEV, YFV, TBEV) could ensure partial cross-protection against heterologous flaviviruses within the same serocomplex. At the same time, there is limited experimental evidence of ADE subsequent to vaccination and virus challenge. In mice, antibodies elicited by inactivated-JEV vaccines could enhance pathogenesis via ADE when mice were challenged with a heterotypic flavivirus such as MVEV [178]. Consequently, the risk that vaccination will facilitate a subsequent flavivirus infection, although likely to be low, deserves further consideration, and appropriate studies should be carried out to address ADE occurrence *in vitro* and *in vivo* [123].

5. Conclusions

European countries are currently facing clinical outbreaks or silent circulation of a wide diversity of flaviviruses, and it is expected that circumstances will become even more complex in the coming years as human travel continues to intensify, the trade of animals and goods facilitate virus emergence through

the importation of infected vectors and/or reservoir hosts [88,186], and heretofore unknown flaviviruses that already established in Europe are discovered. WNV diagnosis and surveillance protocols and schemes clearly need to be improved in Europe and across the globe. The specificity of serological laboratory tests should be enhanced and adapted to specific epidemiological patterns. Moreover, serological surveys should be accompanied by complementary analyses, such as mosquito or animal sentinel surveys aimed at collecting infected samples and identifying the molecular diversity of circulating flaviviruses. Recent developments in surveillance systems have been driven by improved cost/efficiency ratios and consist of implementing risk-based surveillance systems [187,188] in limited geographic areas where flaviviruses are likely to occur.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Anne-Sophie Martel's precious contribution to this collaborative work and we thank Jessica Pearce-Duvet for her excellent editing services. This research was supported by the European Commission grants, the HEALTH.2010.2.3-3-3 261391 Euro West Nile project and the EU-RL on equine diseases, and by the ANR (11 BSV7 003 EVEMATA grant).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Colpitts, T.M.; Conway, M.J.; Montgomery, R.R.; Fikrig, E. West Nile Virus: Biology, transmission, and human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 635–648.
2. Dauphin, G.; Zientara, S.; Zeller, H.; Murgue, B. West Nile: Worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *27*, 343–355.
3. Porter, R.S.; Leblond, A.; Lecollinet, S.; Tritz, P.; Cantile, C.; Kutasi, O.; Zientara, S.; Pradier, S.; van Galen, G.; Speybroek, N.; Saegerman, C. Clinical diagnosis of West Nile Fever in Equids by classification and regression tree (CART) analysis and comparative study of clinical appearance in three European countries. *Transbound. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 197–205.
4. Dauphin, G.; Zientara, S. West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* **2007**, *25*, 5563–5576.
5. de Madrid, A.T.; Porterfield, J.S. The flaviviruses (group B arboviruses): A cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.* **1974**, *23*, 91–96.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Available online: <http://www.cdc.gov/westnile/index.html> (accessed on 4 November 2013).
7. Kilpatrick, A.M. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* **2011**, *334*, 323–327.
8. Murray, K.O.; Mertens, E.; Despres, P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet. Res.* **2010**, *41*, 67–81.
9. LaDeau, S.L.; Kilpatrick, A.M.; Marra, P.P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* **2007**, *447*, 710–713.

10. Blitvich, B.J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim. Health Res. Rev.* **2008**, *9*, 71–86.
11. Brault, A.C. Changing patterns of West Nile virus transmission: Altered vector competence and host susceptibility. *Vet. Res.* **2009**, *40*, doi:10.1051/vetres/2009026.
12. Dridi, M.; Vangeluwe, D.; Lecollinet, S.; van den Berg, T.; Lambrecht, B. Experimental infection of Carrion crows (*Corvus corone*) with two European West Nile virus (WNV) strains. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 160–166.
13. Brault, A.C.; Langevin, S.A.; Bowen, R.A.; Panella, N.A.; Biggerstaff, B.J.; Miller, B.R.; Komar, N. Differential virulence of West Nile strains for American crows. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 2161–2168.
14. Reiter, P. West Nile virus in Europe: Understanding the present to gauge the future. *Euro. Surveill.* **2010**, *15*, 19508:1–19508:7.
15. Fonseca, D.M.; Keyghobadi, N.; Malcolm, C.A.; Mehmet, C.; Schaffner, F.; Mogi, M.; Fleischer, R.C.; Wilkerson, R.C. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* **2004**, *303*, 1535–1538.
16. Gould, E.A. Implications for Northern Europe of the emergence of West Nile virus in the USA. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *131*, 583–589.
17. Swaddle, J.P.; Calos, S.E. Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: Observation of the dilution effect. *PloS One* **2008**, *3*, doi:10.1371/journal.pone.0002488.
18. Ezenwa, V.O.; Godsey, M.S.; King, R.J.; Gupitill, S.C. Avian diversity and West Nile virus: Testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proc. Biol. Sci.* **2006**, *273*, 109–117.
19. Durand, B.; Dauphin, G.; Zeller, H.; Labie, J.; Schuffenecker, I.; Murri, S.; Moutou, F.; Zientara, S. Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet. Rec.* **2005**, *157*, 711–713.
20. West Nile Fever. Available online: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/Pages/index.aspx (accessed on 4 November 2013).
21. Pradier, S.; Lecollinet, S.; Leblond, A. West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev. Sci. Tech.* **2012**, *31*, 829–844.
22. Lopez, G.; Jimenez-Clavero, M.A.; Vazquez, A.; Soriguer, R.; Gomez-Tejedor, C.; Tenorio, A.; Figuerola, J. Incidence of West Nile virus in birds arriving in wildlife rehabilitation centers in southern Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 285–290.
23. Eidson, M.; Komar, N.; Sorhage, F.; Nelson, R.; Talbot, T.; Mostashari, F.; McLean, R. Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 615–620.
24. Wodak, E.; Richter, S.; Bago, Z.; Revilla-Fernandez, S.; Weissenböck, H.; Nowotny, N.; Winter, P. 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.* **2011**, *149*, 358–366.
25. Chevalier, V.; Lecollinet, S.; Durand, B. West Nile virus in Europe: A comparison of surveillance system designs in a changing epidemiological context. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1085–1091.

26. Angelini, P.; Tamba, M.; Finarelli, A.C.; Bellini, R.; Albieri, A.; Bonilauri, P.; Cavrini, F.; Dottori, M.; Gaibani, P.; Martini, E.; *et al.* West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: The integrated surveillance system 2009. *Euro. Surveill.* **2010**, *15*, 19547:1–19547:5.
27. Calzolari, M.; Monaco, F.; Montarsi, F.; Bonilauri, P.; Ravagnan, S.; Bellini, R.; Cattoli, G.; Cordioli, P.; Cazzin, S.; Pinoni, C.; *et al.* New incursions of West Nile virus lineage 2 in Italy in 2013: The value of the entomological surveillance as early warning system. *Vet. Ital.* **2013**, *2013*, doi:10.12834/VetIt.1308.04.
28. Chaskopoulou, A.; Dovas, C.I.; Chaintoutis, S.C.; Kashefi, J.; Koehler, P.; Papanastassopoulou, M. Detection and early warning of West Nile Virus circulation in central Macedonia, Greece, using sentinel chickens and mosquitoes. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 723–732.
29. Niedrig, M.; Linke, S.; Zeller, H.; Drosten, C. First international proficiency study on West Nile virus molecular detection. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1851–1854.
30. Vazquez, A.; Sanchez-Seco, M.P.; Ruiz, S.; Molero, F.; Hernandez, L.; Moreno, J.; Magallanes, A.; Tejedor, C.G.; Tenorio, A. Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 549–552.
31. Bakonyi, T.; Ivanics, E.; Erdélyi, K.; Ursu, K.; Ferenczi, E.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile Virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 618–623.
32. Bakonyi, T.; Hubalek, Z.; Rudolf, I.; Nowotny, N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 225–231.
33. Lvov, D.K.; Butenko, A.M.; Gromashevsky, V.L.; Larichev, V.P.; Gaidamovich, S.Y.; Vyshemirsky, O.I.; Zhukov, A.N.; Lazorenko, V.V.; Salko, V.N.; Kovtunov, A.I.; *et al.* Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, *6*, 373–376.
34. Sirbu, A.; Celanu, C.S.; Panculescu-Gatej, R.I.; Vazquez, A.; Tenorio, A.; Rebreanu, R.; Niedrig, M.; Nicolescu, G.; Pistol, A. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro. Surveill.* **2011**, *16*, 19762:1–19762:5.
35. May, F.J.; Davis, C.T.; Tesh, R.B.; Barrett, A.D.T. Phylogeography of West Nile virus: From the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2964–2974.
36. Mackenzie, J.S.; Gubler, D.J.; Petersen, L.R. Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* **2004**, *10*, S98–S109.
37. Heinz, F.X.; Stiasny, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* **2012**, *30*, 4301–4306.
38. Mansfield, K.L.; Horton, D.L.; Johnson, N.; Li, L.; Barrett, A.D.T.; Smith, D.J.; Galbraith, S.E.; Solomon, T.; Fooks, A.R. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2821–2829.
39. Koraka, P.; Zeller, H.; Niedrig, M.; Osterhaus, A.D.M.E.; Groen, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 1209–1215.
40. Rushton, J.O.; Lecollinet, S.; Hubalek, Z.; Svobodova, P.; Lussy, H.; Nowotny, N. Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 635–637.

41. Ziegler, U.; Angenvoort, J.; Klaus, C.; Nagel-Kohl, U.; Sauerwald, C.; Thalheim, S.; Horner, S.; Braun, B.; Kenklies, S.; Tyczka, J.; *et al.* Use of competition ELISA for monitoring of West Nile virus infections in horses in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 3112–3120.
42. ICTV 2012 Master Species List (MSL). Available online: <http://www.ictvonline.org/> (accessed on 5 November 2013).
43. Gaunt, M.W.; Sall, A.A.; de Lamballerie, X.; Falconar, A.K.I.; Dzhivanian, T.I.; Gould, E.A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 1867–1876.
44. Kuno, G.; Chang, G.-J.J.; Tsuchiya, K.R.; Karabatsos, N.; Cropp, C.B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* **1998**, *72*, 73–83.
45. Calisher, C.H.; Karabatsos, N.; Dalrymple, J.M.; Shope, R.E.; Porterfield, J.S.; Westaway, E.G.; Brandt, W.E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* **1989**, *70*, 37–43.
46. Gould, E.A.; Moss, S.R.; Turner, S.L. Evolution and Dispersal of Encephalitic Flaviviruses. In *Emergence and Control of Zoonotic Viral Encephalitis, Les Pensières, France 6–8 April 2003*; Springer-Verlag Wien: Berlin, Germany, 2004; pp. 65–84.
47. Cook, S.; Moureau, G.; Kitchen, A.; Gould, E.A.; de Lamballerie, X.; Holmes, E.C.; Harbach, R.E. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 223–234.
48. Solomon, T.; Dung, N.M.; Vaughn, D.W.; Kneen, R.; Thao, L.T.T.; Raengsakulrach, B.; Loan, H.T.; Day, N.P.J.; Farrar, J.; Myint, K.S.A.; *et al.* Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* **2000**, *355*, 1053–1059.
49. Gould, E.A.; Zanotto, P.A.; Holmes, E.C. The genetic evolution of flaviviruses. In *Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases*; Saluzzo, J.F., Dodet, B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1997; pp. 51–63.
50. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 2731–2739.
51. Ergunay, K.; Saygan, M.B.; Aydogan, S.; Litzba, N.; Sener, B.; Lederer, S.; Niedrig, M.; Hascelik, G.; Us, D. Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases of tick-borne encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health* **2011**, *58*, 220–227.
52. Suss, J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—An overview. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2011**, *2*, 2–15.
53. Dobler, G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 221–228.
54. M’Fadzean, J. Louping-ill in sheep. *J. Comp. Pathol. Ther.* **1894**, *7*, 207–209.
55. Lvov, D.K. Omsk Hemorrhagic Fever. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, Vol. III*; Monath, T.P., Ed; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, USA, 1988; pp. 205–216.
56. Chastel, C.; Main, A.J.; Guiguen, C.; le Lay, G.; Quillien, M.C.; Monnat, J.Y.; Beaucournu, J.C. The isolation of Meaban virus, a new *Flavivirus* from the seabird tick *Ornithodoros (Alectorobius) maritimus* in France. *Arch. Virol.* **1985**, *83*, 129–140.

57. Hubalek, Z.; Halouzka, J. Arthropod-Borne Viruses of Vertebrates in Europe. Institute of Landscape Ecology of the Academy of Sciences of the Czech Republic: Prague, Czech Republic, 1996.
58. Weissenböck, H.; Hubalek, Z.; Bakonyi, T.; Nowotny, N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 271–280.
59. Filipe, A.R.; Pinto, M.R. Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1969**, *18*, 423–426.
60. Joubert, L.; Oudar, J.; Hannoun, C.; Beytout, D.; Corniou, B.; Guillon, J.C.; Panthier, R. Epidemiology of the West Nile virus: Study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **1970**, *118*, 239–247.
61. Malkinson, M.; Banet, C.; Weisman, Y.; Pokamunski, S.; King, R.; Drouet, M.T.; Deubel, V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 392–397.
62. Papa, A.; Danis, K.; Baka, A.; Bakas, A.; Dougas, G.; Lytras, T.; Theocharopoulos, G.; Chrysagis, D.; Vassiliadou, E.; Kamaria, F.; *et al.* Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July–August 2010. *Euro. Surveill.* **2010**, *15*, 20–29.
63. Bakonyi, T.; Ferenczi, E.; Erdelyi, K.; Kutasi, O.; Csorgo, T.; Seidel, B.; Weissenböck, H.; Brugger, K.; Ban, E.; Nowotny, N. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 61–70.
64. Onishchenko, G.G.; Lipnitskii, A.V.; Alekseev, V.V.; Antonov, V.A.; Kriuchkova, T.P.; Krutogolovova, T.A. Epidemiologic situation of West Nile fever in Russia in 2010. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **2011**, *3*, 115–120.
65. Calistri, P.; Monaco, F.; Savini, G.; Guercio, A.; Purpari, G.; Vicari, D.; Cascio, S.; Lelli, R. Further spread of West Nile virus in Italy. *Vet. Ital.* **2010**, *46*, 471–474.
66. Weissenböck, H.; Bakonyi, T.; Rossi, G.; Mani, P.; Nowotny, N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 274–277.
67. Weissenböck, H.; Kolodziejek, J.; Url, A.; Lussy, H.; Rebel-Bauder, B.; Nowotny, N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 652–656.
68. Meister, T.; Lussy, H.; Bakonyi, T.; Sikutova, S.; Rudolf, I.; Vogl, W.; Winkler, H.; Frey, H.; Hubalek, Z.; Nowotny, N.; *et al.* Serological evidence of continuing high *Usutu virus* (*Flaviviridae*) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet. Microbiol.* **2008**, *127*, 237–248.
69. Becker, N.; Jost, H.; Ziegler, U.; Eiden, M.; Hoper, D.; Emmerich, P.; Fichet-Calvet, E.; Ehichioya, D.U.; Czajka, C.; Gabriel, M.; *et al.* Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PloS One* **2012**, *7*, e32604. doi:10.1371/journal.pone.0032604.
70. Busquets, N.; Alba, A.; Allepuz, A.; Aranda, C.; Nunez, J.I. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae), Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 861–863.
71. Höfle, U.; Gamino, V.; Fernández-de-Mera, I.G.; Mangold, A.J.; Ortiz, J.-A.; de la Fuente, J. Usutu virus in migratory song thrushes, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1173–1175.

72. Hubalek, Z.; Rudolf, I.; Capek, M.; Bakonyi, T.; Betasova, L.; Nowotny, N. Usutu virus in Blackbirds (*Turdus merula*), Czech Republic, 2011–2012. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *2012*, doi:10.1111/tbed.12025.
73. Bakonyi, T.; Erdelyi, K.; Ursu, K.; Ferenczi, E.; Csorgo, T.; Lussy, H.; Chvala, S.; Bukovsky, C.; Meister, T.; Weissenböck, H.; *et al.* Emergence of Usutu virus in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3870–3874.
74. Manarolla, G.; Bakonyi, T.; Gallazzi, D.; Crosta, L.; Weissenböck, H.; Dorrestein, G.M.; Nowotny, N. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet. Microbiol.* **2010**, *141*, 159–163.
75. Steinmetz, H.W.; Bakonyi, T.; Weissenböck, H.; Hatt, J.-M.; Eulenberger, U.; Robert, N.; Hoop, R.; Nowotny, N. Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland—Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet. Microbiol.* **2011**, *148*, 207–212.
76. Vittecoq, M.; Lecollinet, S.; Jourdain, E.; Thomas, F.; Blanchon, T.; Arnal, A.; Lowenski, S.; Gauthier-Clerc, M. Recent circulation of West Nile virus and potentially other closely related flaviviruses in Southern France. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 610–613.
77. Barbic, L.; Vilibic-Cavlek, T.; Listes, E.; Stevanovic, V.; Gjenero-Margan, I.; Ljubin-Sternak, S.; Pem-Novosel, I.; Listes, I.; Mlinaric-Galinovic, G.; Di Gennaro, A.; *et al.* Demonstration of Usutu virus antibodies in Horses, Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 772–774.
78. Agüero, M.; Fernandez-Pinero, J.; Buitrago, D.; Sanchez, A.; Elizalde, M.; San Miguel, E.; Villalba, R.; Llorente, F.; Jimenez-Clavero, M.A. Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1498–1501.
79. Bondre, V.P.; Sapkal, G.N.; Yergolkar, P.N.; Fulmali, P.V.; Sankararaman, V.; Ayachit, V.M.; Mishra, A.C.; Gore, M.M. Genetic characterization of Bagaza virus (BAGV) isolated in India and evidence of anti-BAGV antibodies in sera collected from encephalitis patients. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2644–2649.
80. Cerutti, F.; Giacobini, M.; Mosca, A.; Grasso, I.; Rambozzi, L.; Rossi, L.; Bertolotti, L. Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasites Vectors* **2012**, *5*, 99. doi:10.1186/1756-3305-5-99.
81. Sanchez-Seco, M.-P.; Vazquez, A.; Collao, X.; Hernandez, L.; Aranda, C.; Ruiz, S.; Escosa, R.; Marques, E.; Bustillo, M.-A.; Molero, F.; *et al.* Surveillance of arboviruses in Spanish wetlands: Detection of new flavi- and phleboviruses. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 203–206.
82. Ravanini, P.; Huhtamo, E.; Ilaria, V.; Crobu, M.G.; Nicosia, A.M.; Servino, L.; Rivasi, F.; Allegrini, S.; Miglio, U.; Magri, A.; *et al.* Japanese encephalitis virus RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy. *Euro. Surveill.* **2012**, *17*, 20221:1–20221:4.
83. Huhtamo, E.; Putkuri, N.; Kurkela, S.; Manni, T.; Vaheri, A.; Vapalahti, O.; Uzcategui, N.Y. Characterization of a novel flavivirus from mosquitoes in northern Europe that is related to mosquito-borne flaviviruses of the tropics. *J. Virol.* **2009**, *83*, 9532–9540.
84. Calzolari, M.; Bonilauri, P.; Bellini, R.; Albieri, A.; Defilippo, F.; Maioli, G.; Galletti, G.; Gelati, A.; Barbieri, I.; Tamba, M.; *et al.* Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PloS One* **2010**, *5*, e14324. doi:10.1371/journal.pone.0014324.

85. Llorente, F.; Pérez-Ramírez, E.; Fernández-Pinero, J.; Soriguer, R.; Figuerola, J.; Jiménez-Clavero, M.A. Flaviviruses in game birds, Southern Spain, 2011–2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1023–1025.
86. Brown, E.B.E.; Adkin, A.; Fooks, A.R.; Stephenson, B.; Medlock, J.M.; Snary, E.L. Assessing the risks of West Nile virus-infected mosquitoes from transatlantic aircraft: Implications for disease emergence in the United Kingdom. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 310–320.
87. Jourdain, E.; Toussaint, Y.; Leblond, A.; Bicout, D.J.; Sabatier, P.; Gauthier-Clerc, M. Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2007**, *7*, 15–33.
88. Weaver, S.C.; Reisen, W.K. Present and future arboviral threats. *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 328–345.
89. Kilpatrick, A.M.; Daszak, P.; Goodman, S.J.; Rogg, H.; Kramer, L.D.; Cedenio, V.; Cunningham, A.A. Predicting pathogen introduction: West Nile virus spread to Galapagos. *Conserv. Biol.* **2006**, *20*, 1224–1231.
90. Douglas, K.O.; Kilpatrick, A.M.; Levett, P.N.; Lavoie, M.C. A quantitative risk assessment of West Nile virus introduction into Barbados. *West Indian Med. J.* **2007**, *56*, 394–397.
91. Caminade, C.; Medlock, J.M.; Ducheyne, E.; McIntyre, K.M.; Leach, S.; Baylis, M.; Morse, A.P. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: Recent trends and future scenarios. *J. R. Soc. Interface/R. Soc.* **2012**, *9*, 2708–2717.
92. Schaffner, F.; Medlock, J.M.; van Bortel, W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19*, 685–692.
93. Gjenero-Margan, I.; Aleraj, B.; Krajcar, D.; Lesnikar, V.; Klobucar, A.; Pem-Novosel, I.; Kurecic-Filipovic, S.; Komparak, S.; Martic, R.; Duricic, S.; *et al.* Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro. Surveill.* **2011**, *16*, 19805:1–19805:4.
94. La Ruche, G.; Souares, Y.; Armengaud, A.; Peloux-Petiot, F.; Delaunay, P.; Despres, P.; Lenglet, A.; Jourdain, F.; Leparc-Goffart, I.; Charlet, F.; *et al.* First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro. Surveill.* **2010**, *15*, 19676:1–19676:5.
95. Ulbert, S. West Nile virus: The complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology* **2011**, *54*, 171–184.
96. De Filette, M.; Ulbert, S.; Diamond, M.; Sanders, N.N. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 16. doi:10.1186/1297-9716-43-16.
97. Epp, T.; Waldner, C.; Townsend, H.G.G. A case-control study of factors associated with development of clinical disease due to West Nile virus, Saskatchewan 2003. *Equine Vet. J.* **2007**, *39*, 498–503.
98. Minke, J.M.; Siger, L.; Cupillard, L.; Powers, B.; Bakonyi, T.; Boyum, S.; Nowotny, N.; Bowen, R. Protection provided by a recombinant ALVAC[®]-WNV vaccine expressing the prM/E genes of a lineage 1 strain of WNV against a virulent challenge with a lineage 2 strain. *Vaccine* **2011**, *29*, 4608–4612.
99. Venter, M.; van Vuren, P.J.; Mentoer, J.; Paweska, J.; Williams, J. Inactivated West Nile Virus (WNV) vaccine, Duvaxyn WNV, protects against a highly neuroinvasive lineage 2 WNV strain in mice. *Vaccine* **2013**, *31*, 3856–3862.

100. Samina, I.; Khinich, Y.; Simanov, M.; Malkinson, M. An inactivated West Nile virus vaccine for domestic geese—efficacy study and a summary of 4 years of field application. *Vaccine* **2005**, *23*, 4955–4958.
101. Chang, G.-J.J.; Davis, B.S.; Stringfield, C.; Lutz, C. Prospective immunization of the endangered California condors (*Gymnogyps californianus*) protects this species from lethal West Nile virus infection. *Vaccine* **2007**, *25*, 2325–2330.
102. Boyce, W.M.; Vickers, W.; Morrison, S.A.; Sillett, T.S.; Caldwell, L.; Wheeler, S.S.; Barker, C.M.; Cummings, R.; Reisen, W.K. Surveillance for West Nile virus and vaccination of free-ranging island scrub-jays (*Aphelocoma insularis*) on Santa Cruz Island, California. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1063–1068.
103. Bunning, M.L.; Fox, P.E.; Bowen, R.A.; Komar, N.; Chang, G.-J.J.; Speaker, T.J.; Stephens, M.R.; Nemeth, N.; Panella, N.A.; Langevin, S.A.; *et al.* DNA vaccination of the American crow (*Corvus brachyrhynchos*) provides partial protection against lethal challenge with West Nile virus. *Avian Dis.* **2007**, *51*, 573–577.
104. Turell, M.J.; Bunning, M.; Ludwig, G.V.; Ortman, B.; Chang, J.; Speaker, T.; Spielman, A.; McLean, R.; Komar, N.; Gates, R.; *et al.* DNA vaccine for West Nile virus infection in fish crows (*Corvus ossifragus*). *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 1077–1081.
105. Kilpatrick, A.M.; Dupuis, A.P.; Chang, G.-J.J.; Kramer, L.D. DNA vaccination of American robins (*Turdus migratorius*) against West Nile virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 377–380.
106. Barrett, A.D.T.; Teuwen, D.E. Yellow fever vaccine—How does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr. Opin. Immunol.* **2009**, *21*, 308–313.
107. Tauber, E.; Kollaritsch, H.; von Sonnenburg, F.; Lademann, M.; Jilma, B.; Firbas, C.; Jelinek, T.; Beckett, C.; Knobloch, J.; McBride, W.J.H.; *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial of the safety and tolerability of IC51, an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 493–499.
108. Tauber, E.; Kollaritsch, H.; Korinek, M.; Rendi-Wagner, P.; Jilma, B.; Firbas, C.; Schranz, S.; Jong, E.; Klingler, A.; Dewasthaly, S.; *et al.* Safety and immunogenicity of a Vero-cell-derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine: A non-inferiority, phase III, randomised controlled trial. *Lancet* **2007**, *370*, 1847–1853.
109. Heinz, F.X.; Holzmann, H.; Essl, A.; Kundi, M. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* **2007**, *25*, 7559–7567.
110. Clarke, D.H.; Casals, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1958**, *7*, 561–573.
111. Luca, V. *The Structural Basis of Flaviviridae Interaction with Antibodies and Receptors*; Washington University: Saint Louis, MO, USA, 2011.
112. Sanchez, M.D.; Pierson, T.C.; McAllister, D.; Hanna, S.L.; Puffer, B.A.; Valentine, L.E.; Murtadha, M.M.; Hoxie, J.A.; Doms, R.W. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* **2005**, *336*, 70–82.
113. Seligman, S.J.; Bucher, D.J. The importance of being outer: Consequences of the distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein E. *Trends Microbiol.* **2003**, *11*, 108–110.

114. Pierson, T.C.; Diamond, M.S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev. Mol. Med.* **2008**, *10*, [doi:org/10.1017/S1462399408000665](https://doi.org/10.1017/S1462399408000665).
115. Bressanelli, S.; Stiasny, K.; Allison, S.L.; Stura, E.A.; Duquerroy, S.; Lescar, J.; Heinz, F.X.; Rey, F.A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* **2004**, *23*, 728–738.
116. Diamond, M.S.; Pierson, T.C.; Fremont, D.H. The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol. Rev.* **2008**, *225*, 212–225.
117. Crill, W.D.; Chang, G.-J.J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J. Virol.* **2004**, *78*, 13975–13986.
118. Nybakken, G.E.; Oliphant, T.; Johnson, S.; Burke, S.; Diamond, M.S.; Fremont, D.H. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* **2005**, *437*, 764–769.
119. Beasley, D.W.C.; Barrett, A.D.T. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J. Virol.* **2002**, *76*, 13097–13100.
120. Oliphant, T.; Nybakken, G.E.; Austin, S.K.; Xu, Q.; Bramson, J.; Loeb, M.; Throsby, M.; Fremont, D.H.; Pierson, T.C.; Diamond, M.S. Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J. Virol.* **2007**, *81*, 11828–11839.
121. Stiasny, K.; Kiermayr, S.; Holzmann, H.; Heinz, F.X. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *J. Virol.* **2006**, *80*, 9557–9568.
122. Vogt, M.R.; Dowd, K.A.; Engle, M.; Tesh, R.B.; Johnson, S.; Pierson, T.C.; Diamond, M.S. Poorly neutralizing cross-reactive antibodies against the fusion loop of West Nile virus envelope protein protect in vivo via Fcγ receptor and complement-dependent effector mechanisms. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11567–11580.
123. Lobigs, M.; Diamond, M.S. Feasibility of cross-protective vaccination against flaviviruses of the Japanese encephalitis serocomplex. *Expert Rev. Vaccines* **2012**, *11*, 177–187.
124. Post, P.R.; Carvalho, R.; Galler, R. Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Virus Res.* **1991**, *18*, 291–302.
125. Flamand, M.; Megret, F.; Mathieu, M.; Lepault, J.; Rey, F.A.; Deubel, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J. Virol.* **1999**, *73*, 6104–6110.
126. Chung, K.M.; Thompson, B.S.; Fremont, D.H.; Diamond, M.S. Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc-γ receptor-mediated phagocytosis and clearance of West Nile Virus-infected cells. *J. Virol.* **2007**, *81*, 9551–9555.
127. Hirota, J.; Shimizu, S.; Shibahara, T. Application of West Nile virus diagnostic techniques. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2013**, *11*, 793–803.
128. Lindsey, H.S.; Calisher, C.H.; Mathews, J.H. Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology. *J. Clin. Microbiol.* **1976**, *4*, 503–510.
129. OIE West Nile Fever. In *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*; 6th ed.; Office International des Epizooties: Paris, France, 2008, pp. 377–385.
130. Weingartl, H.M.; Drebot, M.A.; Hubalek, Z.; Halouzka, J.; Andonova, M.; Dibbernardo, A.; Cottam-Birt, C.; Larence, J.; Marszal, P. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Can. J. Vet. Res.-Rev. Can. Rech. Veterinaire* **2003**, *67*, 128–132.

131. Buckley, A.; Dawson, A.; Moss, S.R.; Hlinsley, S.A.; Bellamy, P.E.; Gould, E.A. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2807–2817.
132. Hubalek, Z.; Wegner, E.; Halouzka, J.; Tryjanowski, P.; Jerzak, L.; Sikutova, S.; Rudolf, I.; Kruszewicz, A.G.; Jaworski, Z.; Wlodarczyk, R. Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral. Immunol.* **2008**, *21*, 247–254.
133. Hobson-Peters, J. Approaches for the development of rapid serological assays for surveillance and diagnosis of infections caused by zoonotic flaviviruses of the Japanese encephalitis virus serocomplex. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, doi:10.1155/2012/379738.
134. Niedrig, M.; Sonnenberg, K.; Steinhagen, K.; Paweska, J.T. Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *J. Virol. Methods* **2007**, *139*, 103–105.
135. Martin, D.A.; Muth, D.A.; Brown, T.; Johnson, A.J.; Karabatsos, N.; Roehrig, J.T. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 1823–1826.
136. Tardei, G.; Ruta, S.; Chitu, V.; Rossi, C.; Tsai, T.F.; Cernescu, C. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 2232–2239.
137. Niedrig, M.; Donoso-Mantke, O.; Altmann, D.; Zeller, H. First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection. *BMC Infect. Dis.* **2007**, *7*, doi:10.1186/1471-2334-7-72.
138. Alonso-Padilla, J.; Jimenez de Oya, N.; Blazquez, A.-B.; Loza-Rubio, E.; Escribano, J.M.; Saiz, J.-C.; Escribano-Romero, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of West Nile virus infection based on a recombinant envelope protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J. Virol. Methods* **2010**, *166*, 37–41.
139. Sotelo, E.; Llorente, F.; Rebollo, B.; Camunas, A.; Venteo, A.; Gallardo, C.; Lubisi, A.; Rodriguez, M.J.; Sanz, A.J.; Figuerola, J.; *et al.* Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus. *J. Virol. Methods* **2011**, *174*, 35–41.
140. Holbrook, M.R.; Shope, R.E.; Barrett, A.D.T. 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.* **2004**, *42*, 4101–4110.
141. Beasley, D.W.C.; Holbrook, M.R.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Coffey, L.; Carrara, A.-S.; Phillippi-Falkenstein, K.; Bohm, R.P., Jr.; Ratterree, M.S.; Lillibridge, K.M.; Ludwig, G.V.; *et al.* Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 2759–2765.
142. Kitai, Y.; Shoda, M.; Kondo, T.; Konishi, E. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate west nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera. *Clin. Vaccine Immunol.* **2007**, *14*, 1024–1031.

143. Blitvich, B.J.; Marlenee, N.L.; Hall, R.A.; Calisher, C.H.; Bowen, R.A.; Roehrig, J.T.; Komar, N.; Langevin, S.A.; Beaty, B.J. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west nile virus in multiple avian species. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 1041–1047.
144. Houser, B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch. Physiol. Biochem.* **2012**, *118*, 192–196.
145. Lelli, D.; Moreno, A.; Brocchi, E.; Sozzi, E.; Capucci, L.; Canelli, E.; Barbieri, I.; Zeller, H.; Cordioli, P. West Nile virus: Characterization and diagnostic applications of monoclonal antibodies. *Virol. J.* **2012**, *9*, doi:10.1186/1743-422X-9-81.
146. Nash, D.; Mostashari, F.; Fine, A.; Miller, J.; O'Leary, D.; Murray, K.; Huang, A.; Rosenberg, A.; Greenberg, A.; Sherman, M.; *et al.* The outbreak of West Nile virus infection in the New York city area in 1999. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1807–1814.
147. Shieh, W.J.; Guarner, J.; Layton, M.; Fine, A.; Miller, J.; Nash, D.; Campbell, G.L.; Roehrig, J.T.; Gubler, D.J.; Zaki, S.R. The role of pathology in an investigation of an outbreak of West Nile encephalitis in New York, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, *6*, 370–372.
148. Lanciotti, R.S.; Roehrig, J.T.; Deubel, V.; Smith, J.; Parker, M.; Steele, K.; Crise, B.; Volpe, K.E.; Crabtree, M.B.; Scherret, J.H.; *et al.* Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* **1999**, *286*, 2333–2337.
149. Ledermann, J.P.; Lorono-Pino, M.A.; Ellis, C.; Saxton-Shaw, K.D.; Blitvich, B.J.; Beaty, B.J.; Bowen, R.A.; Powers, A.M. Evaluation of widely used diagnostic tests to detect West Nile virus infections in horses previously infected with St. Louis encephalitis virus or dengue virus type 2. *Clin. Vaccine Immunol.* **2011**, *18*, 580–587.
150. Lorono-Pino, M.A.; Farfan-Ale, J.A.; Blitvich, B.J.; Beebe, J.L.; Jarman, R.G.; Beaty, B.J. Evaluation of an epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of West Nile virus infections in humans. *Clin. Vaccine Immunol.* **2009**, *16*, 749–755.
151. Papa, A.; Karabaxoglou, D.; Kansouzidou, A. Acute West Nile virus neuroinvasive infections: cross-reactivity with dengue virus and tick-borne encephalitis virus. *J. Med. Virol.* **2011**, *83*, 1861–1865.
152. Shirafuji, H.; Kanehira, K.; Kamio, T.; Kubo, M.; Shibahara, T.; Konishi, M.; Murakami, K.; Nakamura, Y.; Yamanaka, T.; Kondo, T.; *et al.* Antibody responses induced by experimental West Nile Virus infection with or without previous immunization with inactivated Japanese encephalitis vaccine in horses. *J. Vet. Med. Sci.* **2009**, *71*, 969–974.
153. Hirota, J.; Nishi, H.; Matsuda, H.; Tsunemitsu, H.; Shimizu, S. Cross-reactivity of Japanese encephalitis virus-vaccinated horse sera in serodiagnosis of West Nile virus. *J. Vet. Med. Sci.* **2010**, *72*, 369–372.
154. Yeh, J.-Y.; Lee, J.-H.; Park, J.-Y.; Seo, H.-J.; Moon, J.-S.; Cho, I.-S.; Kim, H.-P.; Yang, Y.-J.; Ahn, K.-M.; Kyung, S.-G.; *et al.* A diagnostic algorithm to serologically differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus infections and its validation in field surveillance of poultry and horses. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 372–379.
155. Williams, D.T.; Daniels, P.W.; Lunt, R.A.; Wang, L.-F.; Newberry, K.M.; MacKenzie, J.S. Experimental infections of pigs with Japanese encephalitis virus and closely related Australian flaviviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *65*, 379–387.

156. Buckley, A.; Dawson, A.; Gould, E.A. Detection of seroconversion to West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus in UK sentinel chickens. *Viol. J.* **2006**, *3*, doi:10.1186/1743-422X-3-71.
157. Rabel, P.O.; Planitzer, C.B.; Farcet, M.R.; Orlinger, K.K.; Ilk, R.; Barrett, P.N.; Kreill, T.R. Increasing West Nile virus antibody titres in central European plasma donors from 2006 to 2010. *Euro. Surveill.* **2011**, *16*, 19812:1–19812:5.
158. Sonnleitner, S.T.; Simeoni, J.; Baumgartner, R.; Zelger, R.; Prader, A.; Piccolini, G.; Nowotny, N.; Walder, G. The spreading of flaviviruses over the continental divide: A challenge for serologic diagnostics. *J. Med. Microbiol. Diagn.* **2013**, *3*, doi:10.4172/2161-0703.S3-002.
159. Jourdain, E.; Schuffenecker, I.; Korimbocus, J.; Reynard, S.; Murri, S.; Kayser, Y.; Gauthier-Clerc, M.; Sabatier, P.; Zeller, H.G. West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2007**, *7*, 448–452.
160. Alba, A.; Allepuz, A.; Napp, S.; Soler, M.; Selga, I.; Aranda, C.; Casal, J.; Pages, N.; Hayes, E.B.; Busquets, N. Ecological Surveillance for West Nile in Catalonia (Spain), Learning from a Five-Year Period of Follow-up. *Zoonoses Public Health* **2013**, *2013*, doi:10.1111/zph.12048.
161. Lopez, G.; Jimenez-Clavero, M.A.; Tejedor, C.G.; Soriguer, R.; Figuerola, J. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2008**, *8*, 615–621.
162. Figuerola, J.; Soriguer, R.; Rojo, G.; Tejedor, C.G.; Jimenez-Clavero, M.A. Seroconversion in wild birds and local circulation of west nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 1915–1917.
163. Jourdain, E.; Olsen, B.; Lundkvist, A.; Hubálek, Z.; Šikutová, S.; Waldenström, J.; Karlsson, M.; Wahlström, M.; Jozan, M.; Falk, K.I. Surveillance for West Nile virus in wild birds from Northern Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 77–79.
164. Valiakos, G.; Touloudi, A.; Athanasiou, L.V.; Giannakopoulos, A.; Iacovakis, C.; Birtsas, P.; Spyrou, V.; Dalabiras, Z.; Petrovska, L.; Billinis, C. Serological and molecular investigation into the role of wild birds in the epidemiology of West Nile virus in Greece. *Viol. J.* **2012**, *9*, doi:10.1186/1743-422X-9-266.
165. Boadella, M.; Diez-Delgado, I.; Gutierrez-Guzman, A.V.; Hofle, U.; Gortazar, C. Do wild ungulates allow improved monitoring of flavivirus circulation in Spain? *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 490–495.
166. Turner, J.L.; Waggoner, J.W.; Rose, S.S.; Arns, M.J.; Hankins, K.G.; Tuttle, J. West Nile Virus antibody titers and total immunoglobulin G concentrations in Foals from Mares Vaccinated in Late Gestation. *J. Equine Vet. Sci.* **2008**, *28*, 17–21.
167. Nemeth, N.M.; Oesterle, P.T.; Bowen, R.A. Passive immunity to West Nile virus provides limited protection in a common passerine species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *79*, 283–290.
168. Nemeth, N.M.; Bowen, R.A. Dynamics of passive immunity to West Nile virus in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 310–317.
169. Ahmadnejad, F.; Otarod, V.; Fallah, M.H.; Lowenski, S.; Sedighi-Moghaddam, R.; Zavareh, A.; Durand, B.; Lecollinet, S.; Sabatier, P. Spread of West Nile virus in Iran: A cross-sectional serosurvey in equines, 2008–2009. *Epidemiol. Infect.* **2011**, *139*, 1587–1593.
170. Fang, Y.; Reisen, W.K. Previous infection with West Nile or St. Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 480–485.

171. Nemeth, N.M.; Bosco-Lauth, A.M.; Bowen, R.A. Cross-protection between West Nile and Japanese encephalitis viruses in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Avian Dis.* **2009**, *53*, 421–425.
172. Goverdhan, M.K.; Kulkarni, A.B.; Gupta, A.K.; Tupe, C.D.; Rodrigues, J.J. Two-way cross-protection between West Nile and Japanese encephalitis viruses in bonnet macaques. *Acta. Virol.* **1992**, *36*, 277–283.
173. Tesh, R.B.; da Rosa, A.; Guzman, H.; Araujo, T.P.; Xiao, S.Y. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 245–251.
174. Price, W.H.; Thind, I.S. The mechanism of cross-protection afforded by dengue virus against West Nile virus in hamsters. *J. Hyg.* **1972**, *70*, 611–617.
175. Tarr, G.C.; Hammon, W.M. Cross-protection between group B arboviruses: Resistance in mice to Japanese B encephalitis and St. Louis encephalitis viruses induced by dengue virus immunization. *Infect. Immun.* **1974**, *9*, 909–915.
176. Yamshchikov, G.; Borisevich, V.; Kwok, C.W.; Nistler, R.; Kohlmeier, J.; Seregin, A.; Chaporgina, E.; Benedict, S.; Yamshchikov, V. The suitability of yellow fever and Japanese encephalitis vaccines for immunization against West Nile virus. *Vaccine* **2005**, *23*, 4785–4792.
177. Petrovsky, N.; Larena, M.; Siddharthan, V.; Prow, N.A.; Hall, R.A.; Lobigs, M.; Morrey, J. An inactivated cell-culture Japanese encephalitis vaccine (JE-ADVAX) formulated with delta inulin adjuvant provides robust heterologous protection against West Nile encephalitis via cross-protective memory B cells and neutralizing antibody. *J. Virol.* **2013**, *87*, 10324–10333.
178. Lobigs, M.; Larena, M.; Alsharifi, M.; Lee, E.; Pavy, M. Live chimeric and inactivated Japanese encephalitis virus vaccines differ in their cross-protective values against Murray Valley encephalitis virus. *J. Virol.* **2009**, *83*, 2436–2445.
179. Orlinger, K.K.; Hofmeister, Y.; Fritz, R.; Holzer, G.W.; Falkner, F.G.; Unger, B.; Loew-Baselli, A.; Poellabauer, E.-M.; Ehrlich, H.J.; Barrett, P.N.; Kreil, T.R. A tick-borne encephalitis virus vaccine based on the European prototype strain induces broadly reactive cross-neutralizing antibodies in humans. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 1556–1564.
180. Arroyo, J.; Miller, C.; Catalan, J.; Myers, G.A.; Ratterree, M.S.; Trent, D.W.; Monath, T.P. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: Preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12497–12507.
181. Porterfield, J.S. Immunological enhancement and the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *J. Hyg.* **1982**, *89*, 355–364.
182. Halstead, S.B. Immune enhancement of viral infection. *Prog. Allergy* **1982**, *31*, 301–364.
183. Guzman, M.G.; Vazquez, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses* **2010**, *2*, 2649–2662.
184. Phillpotts, R.J.; Stephenson, J.R.; Porterfield, J.S. Antibody-dependent enhancement of tick-borne encephalitis virus infectivity. *J. Gen. Virol.* **1985**, *66*, 1831–1837.
185. Ferenczi, E.; Ban, E.; Abraham, A.; Kaposi, T.; Petranyi, G.; Berencsi, G.; Vaheri, A. Severe tick-borne encephalitis in a patient previously infected by West Nile virus. *Scand. J. Infect. Dis.* **2008**, *40*, 759–761.

186. Vittecoq, M.; Thomas, F.; Jourdain, E.; Moutou, F.; Renaud, F.; Gauthier-Clerc, M. Risks of emerging infectious diseases: Evolving threats in a changing area, the mediterranean basin. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *2012*, doi: 10.1111/tbed.12012.
187. Cameron, A.R. The consequences of risk-based surveillance: Developing output-based standards for surveillance to demonstrate freedom from disease. *Prev. Vet. Med.* **2012**, *105*, 280–286.
188. Reist, M.; Jemmi, T.; Stark, K.D.C. Policy-driven development of cost-effective, risk-based surveillance strategies. *Prev. Vet. Med.* **2012**, *105*, 176–184.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

2. OBJECTIFS

Les principaux objectifs de ce travail sont de contribuer à l'amélioration du diagnostic sérologique et du traitement des *flavivirus* neurotropes en médecine vétérinaire. Ces objectifs sont divisés en 2 actions de recherche majeures :

Dans le premier volet de ces travaux, nous avons confirmé lors d'un essai interlaboratoire d'aptitude (EILA) européen, que le diagnostic sérologique rapide du WNV souffre d'un manque de spécificité et ne permet pas d'identifier les *flavivirus* responsables des infections chez le cheval.

Nous nous sommes donc employés à développer un test sérologique différentiel permettant le diagnostic rapide et simultané de plusieurs *flavivirus* neurotropes chez le cheval (WNV, JEV et TBEV). Cette méthode multi-analytique utilise comme support un mélange de microsphères magnétiques couplées à des antigènes viraux recombinants, pour le titrage simultané d'anticorps sériques spécifiques. C'est une méthode qui a le triple intérêt d'être rapide, multiplexée et de n'utiliser qu'une très petite quantité de sérum.

Ayant obtenu des résultats très satisfaisants sur sérums équins, nous avons dans un second temps adapté cette méthode multiplexe au diagnostic du LIV chez les ovins.

Enfin notre dernier objectif dans cette première partie a été de mettre en place un test DIVA qui permettrait de distinguer les chevaux vaccinés des chevaux infectés par le WNV.

Dans le second volet de cette thèse, nous avons cherché à évaluer *in vitro* l'activité antivirale d'une molécule à large spectre sur deux *flavivirus* d'intérêt pour la filière équine, le WNV et le JEV.

En effet, le traitement des infections virales est un problème majeur en santé publique et vétérinaire car l'arsenal thérapeutique pour lutter contre les infections virales est extrêmement limité et le traitement est avant tout symptomatique.

La découverte du composé sr1057 comme « candidat antiviral » est le fruit d'un programme de recherche collaboratif à l'Institut Pasteur (IP) qui vise à identifier de petites molécules antivirales à large spectre, c'est-à-dire actives contre un large éventail de virus. L'IP a développé dans ce but une stratégie originale qui s'appuie sur deux virus recombinants, celui de la rougeole (rMV2/Luc) et du chikungunya (CHIKV/Ren) exprimant la luciférase de luciole (firefly luciferase) ou la luciférase Renilla respectivement comme rapporteur de la réplication virale. Une molécule sera considérée active si elle est capable d'inhiber à la fois ces deux virus à ARN de polarité différente (positif pour le CHIKV et négatif pour la rougeole).

Suite au criblage de la chimiothèque du Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie (CERMN, Caen), le composé sr1057 a été sélectionné car il est actif contre les virus de la rougeole et du CHIKV. Sa concentration inhibitrice 50 (IC_{50}), qui correspond ici à la concentration de la molécule inhibant 50% de l'activité de la luciférase, est de 4 μ g/ml et n'a pas d'effet cytotoxique majeur *in vitro* [330]. Ce composé présentant donc un fort potentiel de développement comme antiviral à large spectre, il a été notre molécule de premier choix pour les essais sur le WNV et le JEV.

L'ensemble de ce travail a été financé par deux projets de recherche soutenus pour le premier par l'Institut Français du cheval et de l'équitation (IFCE) (2013-2014) et pour le second par la fondation Hippolia et les Fonds Eperon (2015-2016).

3. TRAVAIL EXPERIMENTAL

3.1 Projet de thèse et résultats

3.1.1. Nouvelles stratégies diagnostiques pour les *flavivirus* neurotropes en médecine vétérinaire

3.1.1.1. *Outils de diagnostic sérologique classique simplexe pour le diagnostic du WNV chez les chevaux*

3.1.1.1.1. Présentation du manuscrit N°2

Le manuscrit N°2 présente les résultats des deux EILA européens pour le diagnostic du WNV par méthode sérologique. Ils ont été organisés en 2010 et 2013 par le Laboratoire de référence de l'Union Européenne (LRUE) pour les maladies équine. 21 participants en 2010 et 35 en 2013 comprenant les laboratoires nationaux de référence (LNR) mais aussi d'autres laboratoires de l'UE ou du bassin méditerranéen ont participé à ces 2 EILA.

Cet article a pour but de présenter le niveau de performance de ce réseau de laboratoires pour le diagnostic sérologique du WNV mais aussi de comparer les différentes méthodes utilisées en termes de sensibilité et de spécificité dont la visualisation ou non de réactions sérologiques croisées entre *flavivirus*.

Manuscrit N°2 : Améliorer les outils de diagnostic sérologique en Europe pour le diagnostic sérologique du WNV chez les chevaux

Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe

Cécile Beck¹, Steeve Lowenski¹, Benoit Durand¹, Edouard Guitton², Céline Bahuon¹,
Stéphan Zientara¹ and Sylvie Lecollinet¹

¹Université Paris Est, UMR 1161 Virology, ANSES, INRA, ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, EURL on Equine Diseases, 94700 Maisons-Alfort, France
E-mail: cecile.beck@anses.fr; steeve.lowenski@anses.fr; benoit.durand@anses.fr; celine.bahuon@anses.fr; stephan.zientara@anses.fr; sylvie.lecollinet@anses.fr

²INRA UE 1277, Plate-forme d'Infectiologie Expérimentale, 37380 Nouzilly, France
E-mail: edouard.guitton@tours.inra.fr

Abstract

West Nile Fever (WNF) is a zoonotic disease caused by a mosquito-borne flavivirus that can cause a severe neurological condition in 1-10% of infected horses. WN virus (WNV) has been regularly reported to be circulating in the Mediterranean basin, Eastern and Central Europe since 1998. By its clinical sensitivity to the disease, the horse is a useful sentinel of infection. Because of the virus' low-level, short-term viraemia in horses and the late appearance of clinical signs when the viraemic phase is over, the primary tools used to diagnose WNV are indirect or serological tests geared to detecting WNV antibodies.

Two inter-laboratory proficiency tests (ILPTs) were held in 2010 and 2013 to evaluate serological diagnostic tools suited to WNV for the European network of National Reference Laboratories (NRLs) for equine diseases. These ILPTs were designed to evaluate the laboratories' performance in detecting WNV infection through serology and determine the sensitivity, specificity and robustness of the methods used in Europe.

The detection of WNV immunoglobulin G (IgG) antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) is widely used and well established in Europe, with 17 NRLs in 2010 and 21 NRLs in 2013 using IgG WNV assays. Thanks to the development of new commercial IgM capture kits, WNV IgM capture ELISAs were rapidly implemented in reference laboratories between 2010 (4 NRLs only) and 2013 (13 NRLs). The use of kits allowed the quick standardisation of WNV IgG and IgM detection assays in NRLs with more than 95% (20/21) and 100% (13/13) of satisfactory results respectively in 2013. Conversely, in-house virus neutralisation tests (VNTs) were only implemented in 33.3% (7/21) of NRLs and their low sensitivity was evidenced in 42.9% (3/7) of NRLs during the 2 ILPTs.

A comparison of serological diagnostic methods highlighted the higher sensitivity of IgG ELISAs compared to WNV VNTs. They also revealed that the low specificity of one of the IgG ELISA kits meant that it could detect animals infected with flaviviruses close to WNV but belonging to the Japanese encephalitis virus (JEV) serocomplex (i.e. Usutu virus (USUV) and JEV) in addition to flaviviruses belonging to another serocomplex (i.e. tick-borne encephalitis virus (TBEV)). The second kit distinguished WNV from TBEV but not from viruses in the JEV serocomplex. In contrast, these ILPTs indicated that VNT and IgM ELISA assays were highly specific and did not detect antibodies against related flaviviruses. Finally, the ILPT demonstrated early detection of WNV infection by IgM ELISA kits as early as 8 days post-infection (dpi) for all the WNV IgM capture kits used.

The ILPTs held in 2010 and 2013 emphasised a substantial improvement in the analytical performance of WNV antibody (Ab) detection tools over the years within the European NRL network and demonstrated the excellent performance of WNV analytical assays and processes in 2013.

The serological cross-reactions among related flaviviruses through IgG detection associated with the VNT's low sensitivity, long duration and need for Biosafety Level 3 (BSL-3) facilities are major concerns related to indirect WNV diagnosis. They argue in favour of the need for and development of new, specific serological diagnostic assays that could be easily transferred to partner laboratories.

Key words: Flavivirus, serological diagnosis, horse, ILPT, West Nile

1. Introduction

West Nile fever (WNF) is a zoonotic disease caused by West Nile virus (WNV). It can cause a severe neuro-invasive disease (WNND for WN neuro-invasive disease) in 1-10% of infected horses. WNF cases in horses have to be reported to international organisations (the World Organisation for Animal Health (OIE) and the European Commission for European countries). The virus is primarily transmitted by mosquitoes of the *Culex* genus and is amplified by wild bird reservoirs. WNV circulation has been regularly reported in the Mediterranean basin, as well as in Eastern and Central Europe since 1998. WNV outbreaks have increased dramatically since 2010 in Europe [1]. The endemic circulation of WNV in several European countries (Romania, Italy and Spain) and regions (the Balkans) argue for reinforced surveillance of this disease [2].

WNV surveillance varies among European countries, ranging from clinical surveillance of horses or humans to active surveillance of birds or other infected species through regular serological screening and/or active WNV detection in trapped mosquitoes [3]. Due to its

clinical sensitivity to WNV infection, the horse is a sentinel whatever the surveillance system used. Veterinary cases of WNV can be diagnosed before human cases in Europe [4, 5]. In such a context, the improved detection of WNV infection in this species would be extremely helpful. In the case of WNND, WNV diagnosis is hampered by the short duration and low level of WNV viraemia. Consequently, serological diagnostic tests are preferred to confirm WNV infection in horses. The evidence of IgM antibodies in serum or cerebrospinal fluid (CSF) or the increase in Immunoglobulin G (IgG) titres in 2 serial samples obtained 2-3 weeks apart is sufficient to confirm WNV infection in horses. Many different serological tools are available to diagnose or screen for WNV antibodies [6]. The most commonly used are virus neutralisation tests (VNTs), including the plaque reduction neutralisation test (PRNT) or micro-virus neutralisation test (micro-VNT), immunofluorescence assays (IFAs), and enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs). While rapid tests such as ELISAs and IFAs are preferred because of their sensitivity, reproducibility and affordability, WNV VNTs are still gold standard tests and offer high diagnostic specificity.

Nonetheless, seropositive tests should be interpreted with care due to frequent cross-reactions among flaviviruses, especially in rapid serological tests. Indeed, WNV belongs to the *Flavivirus* genus and there are many related flaviviruses such as the mosquito-borne Usutu (USUV) and Bagaza viruses (BAGV), as well as the tick-borne encephalitis viruses (TBEVs), Louping ill virus (LIV) or Meaban virus also widely reported in Europe [6-10]. Infection by such flaviviruses has been shown to induce antibodies that generate positive results in rapid serological diagnostic tests.

Recently, USUV—a flavivirus that originated in Africa—has been isolated in Austria, Belgium, the Czech Republic, Hungary, Italy, Germany, Greece, Poland, Switzerland and Spain. It has also emerged in France and the Netherlands in 2015 and 2016 respectively [8, 11-15]. BAGV—also termed Israel turkey meningoencephalitis virus (ITMV)—was first isolated in 1960 in Israeli turkeys with neurological symptoms, and has more recently emerged in Europe and more specifically in Spain in 2010, where it was found in partridges and pheasants [7].

TBEV and LIV are pathogens borne by *Ixodes* ticks. TBEV has been responsible for major encephalitis outbreaks in humans in Northern Europe [16, 17]. LIV is a zoonotic pathogen causing encephalitis mainly in sheep and cattle, and is concentrated in Ireland and the United Kingdom [6, 18].

The risk of the emergence of new flaviviruses in Europe such as the Japanese encephalitis virus (JEV) or Zika viruses should not be neglected. JEV genomic RNA was detected in dead birds in Tuscany around 1997-2000 and in mosquitoes in Northern Italy in 2010 [19, 20].

Such a circulation of varied flaviviruses in Europe and the large cross-reactivity of rapid WNV serological tools should be considered when performing serological WNV assays on horses. All positive serological results using rapid assays should be confirmed by a more specific VNT with the viruses known to circulate in the area.

WNV surveillance in animals is supported by a network of cooperating laboratories in Europe. In 2008, the European Commission appointed ANSES as the European Reference Laboratory (EURL) for equine diseases with the remit of harmonising and improving the diagnosis of equine diseases in Europe. Two inter-laboratory proficiency tests (ILPTs) were performed in 2010 and 2013 by the network of European laboratories. This study was designed to acquire insights into the performance of serological methods and protocols applied in Europe to detect WNV (OIE manual, chapter 2.1.20) [21] and to evaluate the homogeneity of results among National Reference Laboratories (NRLs) in European and Mediterranean countries.

2. Material and methods

2.1. Participating laboratories

Seventeen European Union NRLs participated in the ILPTs on WNV serology in 2010 and 21 participated in 2013. Participants also included reference laboratories from Morocco (in 2010 and 2013), Bosnia and Herzegovina (2013), other European participants (French, German, Irish, Italian or Spanish laboratories involved in WNV surveillance) as well as participants producing commercial WNV ELISA kits (1 in 2010 and 3 in 2013). In all, 21 and 35 participants were included in the 2010 and 2013 ILPTs respectively. A number code was assigned to each participating laboratory to ensure a blind analysis of the ILPT results (Table 1 and Figure 1).

2.2. Panel description

The panel of samples consisted of 16 and 15 sera in 2010 and 2013 respectively, with a minimum of 100 µl of horse serum per sample. Horse sera with or without antibodies directed against WNV or other flaviviruses were deliberately chosen. Samples were heat-inactivated at 56°C for 30 minutes, aliquoted and stored at -20°C until shipment to avoid degradation of the antibodies. The homogeneity of the serum preparation was confirmed on 5 panels by ELISA tests prior to shipment. Panels were randomly coded and shipped in dry ice to

participants (Table 2). Participants were given 4 weeks to send back their results and were asked to store the samples either at -20°C or 4°C and to avoid repetitive thawing/freezing cycles. The stability of the panels at the end of the ILPT period was tested on one panel stored at 4°C throughout the ILPT period.

2010 sera panel

Positive sera consisted of field sera and sera from vaccinated horses. Field sera were obtained during WNV outbreaks in Qatar 2005 (lineage 1 WNV strain) and in Hungary in 2008 (lineage 2 WNV strain), as well as from serosurveys (Southern France, 2008) [22, 23]. Moreover, sera from horses vaccinated with recombinant Canarypox vector including prM and E WNV genes (Recombitek® Equine West Nile Virus, Merial) and sampled 28, 35 or 49 days after the start of the primary and booster vaccination protocol (dpv) were included.

2013 sera panel

The panel was composed of horse sera from experimental infections with different flaviviruses (WNV lineage 1 and WNV lineage 2, USUV, JEV and TBEV). The sera from experimental infections were obtained from 5 Welsh mares infected subcutaneously with 10⁷ pfu of either WNV lineage 1 (WNV1, IS-98-ST1 strain) or lineage 2 (WNV2, Austria 2008 strain), JEV (Nakayama strain), TBEV (Hypr strain) or USUV (Italy 2012 strain) and collected 8, 21 and 35 days post-infection (dpi) as described in [24].

The composition of the panels in 2010 and 2013 are described in Table 2. Positive and negative sera, duplicates of positive sera to analyse the repeatability of the method plus serial dilutions of a positive serum to evaluate the dose-effect relationship were systematically included. In the 2013 panel, the kinetics of anti-WNV antibody responses with undiluted samples from a horse infected with WNV lineage 1 and sampled on days 8, 21 and 35 post-infection was also evaluated.

The analytical performances of participants were analysed according to the following criteria. Firstly, laboratories should have satisfactory sensitivity; the positive WNV IgG and IgM samples should be identified as positive. Secondly, the negative sera should be found to be negative. For the sera containing cross-reactive antibodies to heterologous flaviviruses (TBEV, USUV, JEV), different results were anticipated depending on ELISA performance (specificity), but negative results were expected by VNT. Thirdly, satisfactory repeatability on 2 pairs of sera and coherent dose-effect curves on a serially diluted serum were expected.

2.3. Serological methods

The participants were asked to test the samples with the diagnostic methods they routinely applied in their laboratories. They could use OIE- or EURL-recommended methods, commercial kits according to the manufacturer's instructions or in-house methods.

The OIE gold standard serological assay is the PRNT with a threshold plaque reduction level of 90% (PRNT₉₀) [21]. The micro-VNT is a modification of the PRNT and allows a larger number of samples to be screened using cell microplates [25].

Different ready-to-use diagnostic ELISA kits for veterinary purposes were commercially available. Two commercial competition kits—the ID screen® WN competition kit (ID Vet) and the Ingezim® WN Compaq kit (Ingenasa)—had been developed before 2010 and could be used to detect anti-E antibodies in multiple species. Both ELISA kits use plates pre-coated with WNV recombinant antigens and measure the competition between antibodies present in the animal serum tested and a monoclonal anti-E antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP). These competitive ELISA kits detect virtually every Ig isotype, but are mainly used to detect IgG and are classified herein among the IgG detection tools.

IgMs are specifically detected by IgM Antibody Capture ELISAs (MAC-ELISA). Equine anti-WNV IgMs present in horse sera bind to anti-horse IgM antiserum coated on ELISA plates. This binding is revealed by the addition of a positive antigen (recombinant WNV antigen), a monoclonal antibody directed against WNV antigen and conjugated to HRP and a chromogenic substrate.

While the IDEXX® IgM WNV Ab kit was available prior to 2010, the Ingezim® WNV IgM and ID screen® WNV IgM capture kits were marketed after 2010, so were only used during the 2013 ILPT.

2.4. Statistical analyses

A statistical analysis on joint 2010 and 2013 results was carried out on the kits used in both ILPTs, to analyse the effect of the country and/or the effect of the batch on the result. A linear mixed model was used. The sample results divided by negative control (%S/N) was the dependent variable (on a log-scale). The country and the batch number were treated as fixed effects, the serum number being treated as a random effect. Log-likelihood tests were used to analyse the effect of the country and of the batch on the %S/N. This analysis was performed separately on results obtained for the detection of the anti-E antibodies (ID screen® WN competition kit was the only kit used in both EQAs) and on results obtained for IgM detection (IDEXX® IgM WNV Ab kit being the only test used in both EQAs). Statistical analyses were conducted using R (R-Core Team, 2015) [26].

3. Results

✓ Overall NRL network results

The number of European NRLs participating in these WNV ILPTs increased from 17 in 2010 to 21 in 2013. With such a condensed network of laboratories dedicated to WNV detection in animals, European countries should rapidly evidence WNV outbreaks. All the participants used commercial competition kits to detect anti-WNV antibodies in both ILPTs. Only 6% of NRLs (1/17) in 2010 and 5% (1/21) in 2013 used an in-house IgG indirect ELISA (with inactivated virions) in addition to the commercial competition kit.

Following the commercialisation of horse WNV MAC-ELISAs, the number of NRLs detecting anti-WNV IgM antibodies clearly increased between 2010 (18% (3/17) NRLs) and 2013 (70% (13/21)). An in-house IgM ELISA was used by only one NRL in 2010. In contrast, the WNV VNT—which requires the handling of infectious WNV in BSL-3 facilities—was not implemented in new NRLs between 2010 (8/17) and 2013 (7/21) (Figure 1).

ELISAs are the preferred screening tools because of their rapidity, high throughput and sensitivity. Moreover, competitive ELISA kits in veterinary laboratories offer the possibility of testing sera from various animal species. During the 2010 and 2013 WNV ILPTs, the ID screen® WN competition kit was used most often (95% (20/21) of participants in 2013), while the the Ingezim® WN Compaq kit was used by only one NRL (1/21). Different batches of the ID screen® WN competition kits were available. These two kits detect antibodies against the WNV Envelope (E) glycoprotein that are induced after natural infection or vaccination (the WNV E structural antigen is expressed by all WNV vaccines marketed for horses) [24]. Nevertheless, depending on the WNV conjugate used in the kit (anti E-domain III in the Ingezim® WN Compaq kit or anti-E antibodies directed against less specific domains in the ID screen® WN competition kits), cross-reactions following infections with other flaviviruses were observed to a greater or lesser extent (see “results according to the method”).

The sensitivity of IgG detection methods was evaluated with samples containing high levels (2010-S2 and S5, 2013-S3, S4, S5 and S6 1/6) or low levels of WNV-IgG (2010-S3 1/40 or 2010-S3-1/80 and S6 and S7, 2013-S6 1/24 and 1/48) (Table 2).

Two participants in 2010 and only one participant in 2013 encountered sensitivity issues with commercial kits (Figures 2 and 3). The in-house indirect IgG ELISA clearly lacked sensitivity in 2010, producing 4 false negatives, but an improvement in its sensitivity was observed in 2013 with only one positive sample generating a doubtful result (data not shown).

The specificity of IgG methods was evaluated on negative horse sera. In 2010, no cross-reactive antibodies to heterologous flaviviruses were present in the panel. The specificity was 100% with 6 negative horse sera found negative by all the participants.

In 2013, samples with antibodies against TBEV, USUV and JEV were added to the panel.

Due to the fact that the monoclonal antibody used in some commercial kits recognises flaviviruses other than WNV, the test specificity was first evaluated on horse sera negative for anti-flavivirus antibodies. The specificity was 100% with 3 negative horse sera found negative by all the participants using either commercial or in-house ELISAs (Figure 3).

Test repeatability and coherent dose-effect curves were successfully achieved by every NRL in 2010 and 2013, with the exception of a single participant in 2010 who obtained differing results on 2010-S2 duplicate samples.

Taken together, the NRL network obtained very good qualitative results, with 14/17 (82.3%) NRLs in 2010, and 20/21 (95.2%) in 2013 achieving satisfactory sensitivity, specificity and repeatability results. The statistical analysis on joint 2010 and 2013 results was carried out on the only kit used for these 2 IL^{PT}s (i.e. ID screen® WN competition kit), to analyse the effect of the country and/or the effect of the batch on the result. The %S/N values (on a log scale) varied significantly according to the NRL ($p < 0.0001$) as well as to kit batch ($p < 0.0001$) (Figure 4 and 5). Both effects were observed when considering 2010 data (country: $p = 0.0001$, batch: $p < 0.0001$), whereas the batch effect was not evidenced when considering data from 2013 (country: $p < 0.0001$, batch: $p = 1$). Indeed, in 2010, the batch 215 was clearly less sensitive than the batch 145 with for example sample S6-duplicate found mostly positive with the batch 145 and mostly negative with the batch 215. Conversely, in 2013, the distributions of %S/N results obtained using batches 334 and 460 appeared similar (Figure 4).

MAC-ELISAs were used to detect immune response associated with acute and recent viral infection. The secretion of anti-WNV IgM can generally be detected as early as 2 to 8 days after the onset of nervous clinical signs.

Three NRLs in 2010 and 5 in 2013 used the IDEXX® IgM WNV Ab kit, while 8 other NRLs used the ID screen® WNV IgM capture in 2013; only 1 participant in 2010 used an in-house MAC-ELISA.

Sensitivity was assessed against 2 IgM-positive horse sera in 2010 (S6-duplicate samples generated during a recent WNV infection) and 6 IgM-positive sera in 2013 produced by experimental infection.

Specificity was evaluated on the same samples as for the IgG ELISA tests (4 negatives in 2010 and 3 negatives in 2013, plus 3 sera produced after experimental infection with JEV, USUV and TBEV in 2013).

The NRL network achieved 100% specificity and 100% sensitivity in 2010 and 2013 with commercial and in-house MAC ELISAs.

A statistical analysis on 2010 and 2013 results from the IDEXX® IgM WNV Ab kit (the only test used during both the 2010 and 2013 ILPTs) did not show a country or batch effect.

VNT is the gold standard serological tool recommended by the OIE Terrestrial Code. This method offers higher specificity but appears less sensitive than ELISAs and is usually used as a confirmation and a titration method for WNV-specific neutralising antibodies (from serum or cerebro-spinal fluid, CSF) [27].

In all, 8 NRLs in 2010 and 7 NRLs in 2013 used either the PRNT90 or micro-VNT on Vero cells with various WNV isolates (depending on NRLs, strains generally belonging to lineage 1—Eg101, Is98, NY99 or NY99—plus the lineage 2 Aus08 strain were used) (Figure 1).

Apart from the EURL, no other NRL used USUV, TBEV or JEV isolates to evidence antibodies against related flaviviruses.

All the participants achieved specific results with no false positives for true negative sera or for sera from horses infected with related flaviviruses. A lack of sensitivity was underlined in 3/8 NRLs in 2010 and in 2/7 NRLs in 2013, with 2 participants missing at least two positive samples in 2010 (S6 in duplicate) and 2013.

These WNV ILPTs were also used to evaluate the characteristics and performance of the different serological assays used by participating laboratories in terms of early detection of anti-WNV antibodies, sensitivity and specificity (observation of cross-reactive reactions with sera from horses infected with related flaviviruses).

Because fewer commercial kits for the detection of anti-WNV IgG and IgM were used in 2010 than in 2013, the results generated by competitive ELISAs, MAC ELISAs and VNTs were compared only for the 2013 ILPT. The results of 35 participants (21 NRLs and 9 other EU laboratories, 3 kit manufacturers and 2 Mediterranean and Balkan reference laboratories) are analysed hereafter (Table 1).

✓ Results according to the method

Early detection of anti-WNV antibodies

The early detection efficacy of MAC ELISAs (detection of IgM only), VNT and competitive ELISAs was evaluated.

Twenty-four results were obtained for the detection of WNV IgM antibodies (16 with the ID screen WN IgM capture kit, 7 with the IDEXX IgM Ab capture kit and one with the Ingezim West Nile IgM kit). Animals recently infected by WNV were all correctly detected as early as

8 dpi for the WNV lineage 1-infected pony (2013-S2-8 dpi), whatever the commercial method used (Figure 6).

By comparison, WNV VNT allowed the early identification of WNV-infected horses (2013-S2-8 dpi sample) only by 3/9 NRLs (Figure 6).

Twenty-eight results were considered for the commercially available competitive ELISA kits (26 participants using the ID screen® WN competition kit and 2 the Ingezim® WN Compaq kit).

The kinetics of antibody response after WNV infection were studied on undiluted samples from a WNV lineage 1-infected horse, sampled on 8 (2013-S2_8 dpi), 21 (2013-S3_21 dpi) and 35 (2013-S4_dpi) dpi. Antibody detection was effective as early as 8 dpi with the Ingezim® WN compaq kit (2/2 assays and 2 different batches). This kit appeared to detect recently-infected animals more efficiently than the ID screen® WNV competition kit which evaluated sample 2013_S2_8 dpi as negative in 23/26 assays and doubtful in 3/26 assays. However, on 21 dpi, WNV antibodies were detected whatever the kit used (Figure 6).

Analytical sensitivity of the methods

The competitive ELISA kits were found to have a high analytical sensitivity. Samples containing low levels of anti-WNV IgG like 2013_ S6 (1/48) were still found to be positive by the 2 commercial ID Screen and Ingezim WN competition kits. Analytical sensitivity was equivalent with both commercial kits.

As regards MAC ELISA, the Ingezim® WN IgM kit seemed to offer a higher analytical sensitivity. Indeed, the duplicate 2013-S5 sample corresponding to a serum sampled on 35 dpi from the WNV lineage 1-infected pony and diluted to 1/6 was found positive with the Ingezim® WN IgM kit (one assay) and negative with IDEXX® IgM WNV Ab (7 assays) and ID screen® WNV IgM capture (16 assays). Moreover, the 2013-S6 serum sampled on 35 dpi from the WNV lineage 2-infected pony and diluted to 1/24 and 1/48 was twice found positive with the Ingezim® WN IgM kit (2/2 assays), doubtful for 10/14 assays with IDEXX® IgM WNV Ab and negative with ID screen® WNV IgM capture (32/32 assays).

VNT results varied depending on the country performing the assay, with 3/9 countries not detecting low positive samples (2013-S6 (1/24) and 2013-S6 (1/48)).

Cross-reactivity of WNV serological assays

During the 2013 ILPT, the Ingezim® WN Compaq kit appeared to be more specific than the ID screen® WNV competition kit and failed to detect TBEV-positive sera. Serum from a

TBEV-infected pony (2013-S9) was not detected with the Ingezim® Compaq kit (2/2 assays) and generated positive cross-reactions (25/26 assays) with the ID screen® WNV competition kit. These results should be confirmed by further studies with the Ingezim® WN Compaq kit on TBEV-positive sera.

Nevertheless, when considering horses infected with flaviviruses belonging to the same serocomplex as WNV i.e. USUV (2013-S7_USU) and JEV (2013-S8_JEV), horses were found positive or doubtful by 100% (28/28) of the participants whatever the ELISA kit used (Figure 6).

Interestingly, an in-house anti-NS1 IgG assay carried out in the 2013 ILPT (1 assay) appeared to be more specific than anti-E competitive kits, detecting WNV- and JEV-positive sera only. The best specificity was achieved with 2 in-house indirect or competitive ELISAs (participant numbers 24 and 20 respectively) with no cross-reactivity revealed for related flaviviruses (2 assays).

WNV PRNT or micro-VNT more specifically detected WNV antibodies. No cross-neutralisation was observed in particular on sera from horses infected with viruses belonging to the JEV serocomplex such as USUV or JEV (Figure 6).

MAC-ELISAs were more specific than IgG indirect or competitive ELISAs, and generated negative results for all the sera sampled from horses recently infected with related flaviviruses (2013-S7 USUV; 2013-S8 JEV and 2013-S9 TBEV) (Figure 6).

Distinction between vaccinated and infected horses

This analysis could be carried out only on the 2010 ILPT panel consisting of field sera and sera from horses vaccinated with the Recombitek® Equine West Nile Vaccine produced by Merial. The duplicate sera produced by the vaccinated horse, 2010-S2 (1/20), were systematically found positive with the 2 kits (Figure 2). Negative results were obtained for these same samples (2010-S2) with an in-house ELISA targeting specific NS1 epitopes, suggesting that the Recombitek® Equine West Nile Vaccine elicited anti-E but not anti-NS1 antibody responses (data not shown). On the other hand, naturally-infected horses were found positive whatever the target antibody (anti-E or NS1 ELISAs).

4. Discussion

The NRL network guarantees WNV surveillance and warning of the emergence or re-emergence of the disease. The number of laboratories has increased between the two ILTPs and indeed has been continuously increasing since 2008. Hungary, Latvia and Bulgaria were

integrated as new NRL participants in addition to the 2013 network in an ILPT held in late 2016. A comparison of the two ILPTs organised in 2010 and 2013 demonstrated an improvement in the performances of WNV analytical assays and processes in 2013. Indeed, even if effect of the country in 2010 and 2013 on the result were statistically underlined for IgG detection, the qualitative results given by the NRLs didn't suffer of this quantitative variation. Moreover, at least 13 NRLs are able to diagnose acute WNV infection thanks to the recent IgM kits available on the market, and many of them (Greece, Austria, Italy, Croatia and France) were involved in the detection of recent WNV outbreaks (Figure 1 and below) [28]. In 2013, the WNV NRL network had gathered together most of the EU countries facing WNV outbreaks (Figure 7a) and EU countries with the highest equine population (Romania, Benelux countries, the United Kingdom, Germany and France) (Figure 7b). Other European and international initiatives (H2020 MediLabSecure project, IAEA and FAO training initiatives) have fostered enhanced, more widespread WNV surveillance in other European countries and regions (such as the Balkans and the Mediterranean).

Competitive ELISA kits are widely used to detect IgG antibodies against WNV. They are well established in Europe, with 17 NRLs and 21 NRLs using competitive WNV kits in 2010 and 2013 respectively. Thanks to the development of a new commercial MAC ELISA, ELISAs ensuring the early detection of infected horses have been rapidly implemented in reference laboratories between 2010 (4 NRLs using MAC ELISA kits) and 2013 (13 NRLs using MAC ELISA kits). The use of kits has allowed rapid standardisation of the 2 methods in NRLs, with more than 95% (20/21) and 100% (13/13) of relevant results in competitive and MAC ELISAs respectively in 2013.

An improvement in the sensitivity of competitive ELISA kits used by the NRL network was evidenced between the 2 ILPTs, with fewer false negative results generated during the 2013 ILPT. The specificity of competitive and MAC ELISAs on sera negative to flavivirus antibodies was 100% for the 2 ILPTs.

In European laboratories seeking to detect human WNV cases, only a few perform the WNV VNT [29]. An identical profile was observed in veterinary laboratories where a low but stable number of NRLs performed VNTs. The need for a BSL-3 facility and technique constraints can account for such an observation. Moreover, NRL results underlined the difficulties in standardising WNV VNTs, with a lack of sensitivity in 3/8 NRLs in 2010 and again in 3/7 NRLs in 2013.

Indirect or competitive WNV ELISAs are commonly used for screening purposes because of their reputed higher sensitivity [6]. The analytical sensitivity of these methods was evaluated

in our ILPT with different WNV-positive sera originating from lineage 1 or 2 WNV-infected ponies and containing different levels of antibodies. Their sensitivity was shown in most cases to be higher than that of VNT, depending on the method [24] implemented by the NRL and the VNT's own analytical sensitivity. Nevertheless, the false positives generated through cross-reactions with antibodies directed against heterologous flaviviruses confound the interpretation of these tests. Specificity issues and the detection of infections caused by close flaviviruses have been systematically described in international quality control assessments for the human serological detection of WNV or Dengue virus (DENV) infections [29-31]. For example, high WNV IgG false positives were reported for samples containing anti-DENV antibodies [29]. The findings of the ILPT organised in 2013 are similar to those of a WNV ILPT on human sera, which showed that an infection by closely related flaviviruses belonging to the JEV serocomplex (i.e. USUV and JEV) systematically generated false positive reactions with the 2 commercially available competitive ELISAs, while kit specificity was more variable for flaviviruses belonging to another serocomplex (i.e. TBEV). Interestingly, some ELISA protocols using alternative antigens (NS1) or revelation systems proved to offer higher specificity than commercial ELISA kits. Indirect or competitive ELISAs are useful for the rapid screening of animal samples, keeping in mind that positive results are not indicative of WNV infection. In the event of positive results, the diagnosis of an acute WNV infection in horses should be confirmed by IgM detection in serum or cerebrospinal fluid.

MAC ELISAs are used to detect acute infections in humans and horses. Nevertheless, their usefulness in determining acute infections in humans is questionable because IgM response is sometimes detectable up to 1 year after initial virus exposure in plasma/serum [32]. In horses, IgM antibodies are short-lived [33]. In equids, WNV IgM antibodies are secreted as early as 8 dpi [27] and can be detected up to 70-90 dpi with currently developed IgM ELISAs [33]. With 42% of participants generating negative results on a WNV lineage 1 serum sampled at 35 dpi (2013_S4_35 dpi), the window during which anti-WNV IgM antibodies were detected in the serum by MAC-ELISA seemed more limited than described in the literature. However, precaution should be taken when interpreting these data because the samples originated from experimental infections associated with asymptomatic or very mild infection. Moreover, the variable sensitivity of MAC ELISA commercial kits can also account for such a result, since the Ingezim® WN IgM kit generated a positive result on 35 dpi for the WNV lineage 1 sample (2013-S4_35dpi) as well as for the lineage 2 sample diluted to 1/48 (S6_1/48).

Finally MAC ELISAs appeared to be more specific than indirect IgG or competitive ELISAs [34]. Samples from USUV-, TBEV- and JEV-infected ponies were found by MAC ELISA to be negative on 35 dpi, while clearly positive by competitive ELISA kits (Figure 6). IgM antibodies against related flaviviruses also remained undetected in non-diluted sera sampled on 8 dpi and 21 dpi (data not shown). The short duration of anti-flavivirus IgM response in horses, associated with the high specificity of MAC ELISAs indicate that MAC ELISAs can be used to confirm recent WNV infection in horses [34]. Nevertheless, the production of IgM following primary vaccine administrations is questionable. Indeed, some papers in the literature consider IgM reactivity towards an inactivated vaccine as minimal [35] while others support low but detectable IgM antibody production [36]. Vaccination history should always be considered prior to the interpretation of MAC ELISAs.

VNT is the gold standard serological tool for confirming WNV diagnosis [21]. In the WNV 2013 ILPT, WNV VNTs demonstrated variable sensitivity depending on the laboratory, but a high level of specificity with no false positives obtained with sera from horses infected with related flaviviruses. Nevertheless, cross-neutralisation by antibodies directed against viruses within the same serocomplex can still be observed in the field [37] despite no such evidence during the ILPT. Taking into account these conclusions, a decisional algorithm for serological flavivirus diagnosis is proposed in Figure 8.

All these remarks plead in favour of the development and implementation of new technologies to provide alternatives to classical methods for serological flavivirus diagnosis [38]. Many efforts have been made to develop ELISAs with enhanced specificity by using monoclonal antibodies targeting specific epitopes on NS1 or the E glycoprotein of flaviviruses [39, 40]. The ELISA targeting epitopes on NS1 appeared more specific for related flaviviruses in ILPT 2013, as also evidenced in the studies by Kitai et al. for differentiating JEV from WNV infection [41]. Moreover, this ELISA was able to distinguish infected horses from horses vaccinated with recombinant prM-E WNV vaccines (not containing the NS1 antigen) [42, 43]. Such a DIVA test could be useful in areas where horses have a high vaccination coverage.

The WNV E glycoprotein is folded into three structural domains: DI, DII and DIII. While DII is highly conserved among flaviviruses, DI and DIII contain virus-specific epitopes [44, 45]. Recombinant envelope proteins bearing mutations in the conserved DII part [46] or domain III of the E glycoprotein [47] have been used as specific antigens in ELISAs [40, 48, 49]. The development of multiplex serological tools is also another promising approach. Microsphere-based immunoassays using domain III antigens [24] or protein microarrays with recombinant

490 NS1 proteins of flaviviruses [36] have been shown to offer advantageous alternatives to
491 VNTs because they can test different flaviviruses in parallel.

492

493 **Conflict of interest**

494 No authors have any conflict of interest to disclose

495 **Acknowledgements**

496 This study was supported by the EU Commission through DG Santé funding (EURL on
497 equine diseases).The authors would like to thank all the European NRLs and external
498 laboratories for their participation. We are very grateful to Merial for providing the
499 Recombitek® equine WNV vaccine and Philippe Despres (Pasteur Institute), Paolo Cordioli
500 (IZSLER institute), Miguel Angel Jimenez-Clavero (CISA INIA Institute) and Norbert Nowotny
501 (University of Veterinary Medicine, Vienna) for providing flavivirus strains used to conduct
502 experimental infections in horses.

2010 ILPT

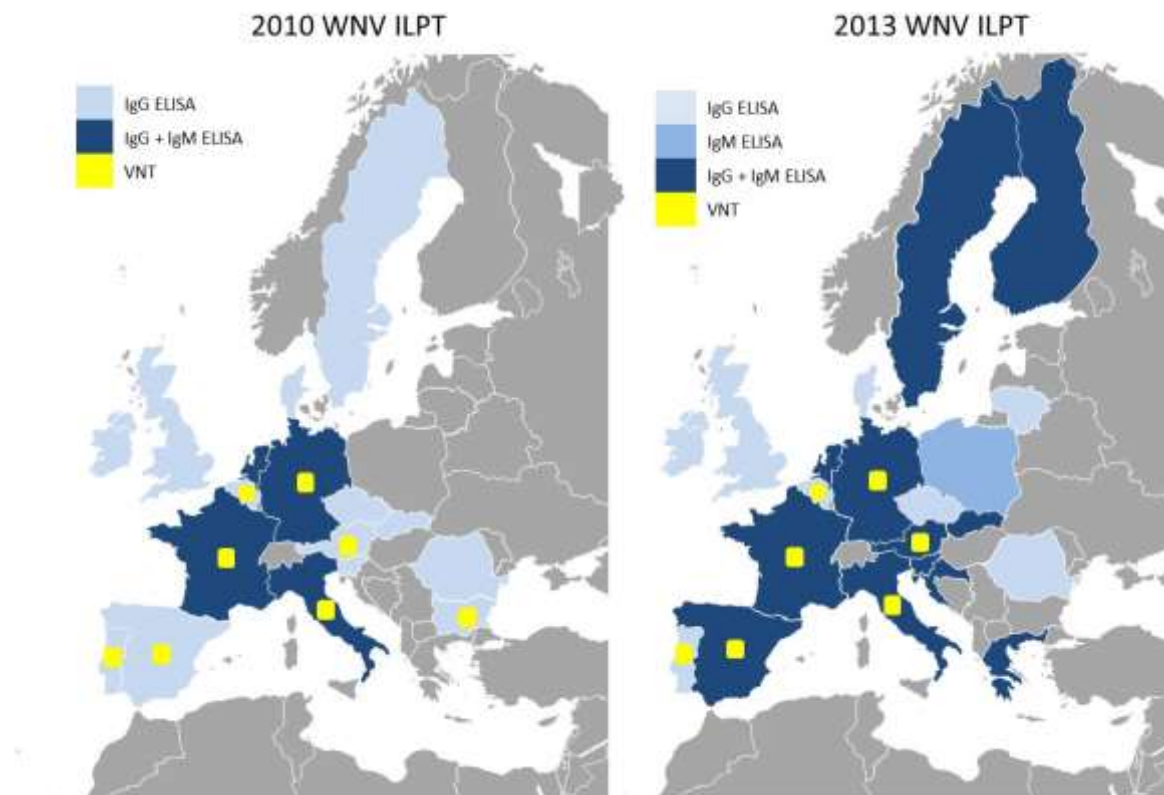
2013 ILPT

	Number of participants	IgG ELISA kit	In-house IgG ELISA	IgM ELISA kit	In-house IgM ELISA	WNV VNT	Number of participants	IgG ELISA kit	In-house IgG ELISA	IgM ELISA kit	In-house IgM ELISA	WNV VNT
NRLs	17	19*	1	3	1	8	21	21	1	13	0	7
other EU laboratories	2	1	1	1	1	0	9	4	2	7	1	1
Kit manufacturers	1	0	1	0	0	0	3	4	0	2	0	1
Mediterranean and Balkan reference laboratories	1	1	0	0	0	0	2	1	0	2	0	0
Total	21	21	3	4	2	8	35	28	3	24	1	9

*some participants used more than one kit

Table 1: Number of participants and serological methods used by participating laboratories during the 2010 and 2013 WNV ILPTs

512



513

514 Figure 1: NRLs having participated in the 2010 and 2013 WNV ILPTs and serological diagnostic assays used. Diagnostic assays implemented
515 in 2010 and 2013 by European NRLs are shown in pale blue (IgG ELISA alone), medium blue (IgM ELISA alone) or dark blue (IgG and IgM
516 ELISAs) and in yellow (WNV VNT).

517

518

	2010-Serum	Dilution	Repetition	Virus or antigen	Origin	Infection or dpv
Negative serum	S1	NA	4	NA	Commercial horse serum (GIBCO)	no
Duplicate	S2	1/20	2	Recombitek® equine WNV	Experimental vaccination	35 dpv
Serial 2-fold dilutions	S3	1/40	1	Recombitek® equine WNV	Experimental vaccination	28 dpv
	S3	1/80	1	Recombitek® equine WNV	Experimental vaccination	28 dpv
	S3	1/160	1	Recombitek® equine WNV	Experimental vaccination	28 dpv
	S3	1/320	1	Recombitek® equine WNV	Experimental vaccination	28 dpv
	S3	1/640	1	Recombitek® equine WNV	Experimental vaccination	28 dpv
	S4	1/80	1	Recombitek® equine WNV	Experimental vaccination	49 dpv
	S5	1/20	1	WNV-lineage2	Hungary (2008)	Natural Infection
Duplicate	S6	1/40	2	WNV-lineage 1	Qatar (2005)	Natural Infection
	S7	1/10	1	WNV –lineage1	Southern France (2008)	Natural Infection

519

520 Table 2: description of the 2010 and 2013 ILPT panels. dpv = days post-vaccination, dpi = days post-infection

	2013-Serum	Dilution	Repetition	Virus	Origin	Infection (dpi)
Negative serum	S1	NA	1	NA	Commercial horse serum (GIBCO)	no
Kinetics of WNV lineage 1 antibody response	S2	NA	1	WNV-lineage1	Israel 1998	Exp. Inf. (8 dpi)
	S3	NA	1	WNV-lineage1	Israel 1998	Exp. Inf (21 dpi)
	S4	NA	1	WNV-lineage1	Israel 1998	Exp. Inf. (35 dpi)
Duplicate	S5	1/6	2	WNV-lineage1	Israel 1998	Exp. Inf. (35 dpi)
Serial dilutions	S6	1/6	1	WNV-lineage 2	Austria 2008	Exp. Inf. (35 dpi)
	S6	1/24	1	WNV-lineage 2	Austria 2008	Exp.inf. (35 dpi)
	S6	1/48	1	WNV- lineage 2	Austria 2008	Exp. Inf. (35 dpi)
	S6	1/384	2	WNV- lineage 2	Austria 2008	Exp. inf. (35 dpi)
	S6	1/536	1	WNV-lineage 2	Austria 2008	Exp.inf. (35 dpi)
	S7	NA	1	USUV	Italy 2012	Exp. inf. (35 dpi)
	S8	1/3	1	JEV- Genotype 3	Nakayama strain	Exp. inf. (35 dpi)
Related flavivirus	S9	1/2.6	1	TBEV	Hypr strain	Exp. Inf. (35 dpi)

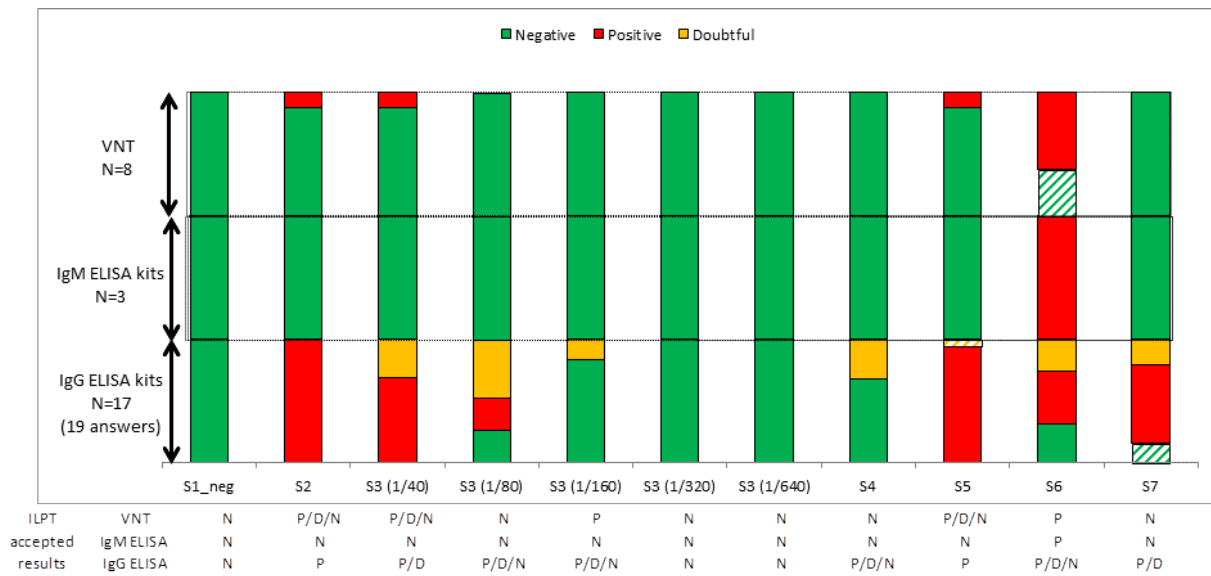


Figure 2: Percentage of NRLs having generated positive (red), doubtful (orange) and negative (green) results during the 2010 WNV ILPT. The striped results are unsatisfactory. The above table summarises the accepted ILPT results with P (positive), D (doubtful) and N (negative)

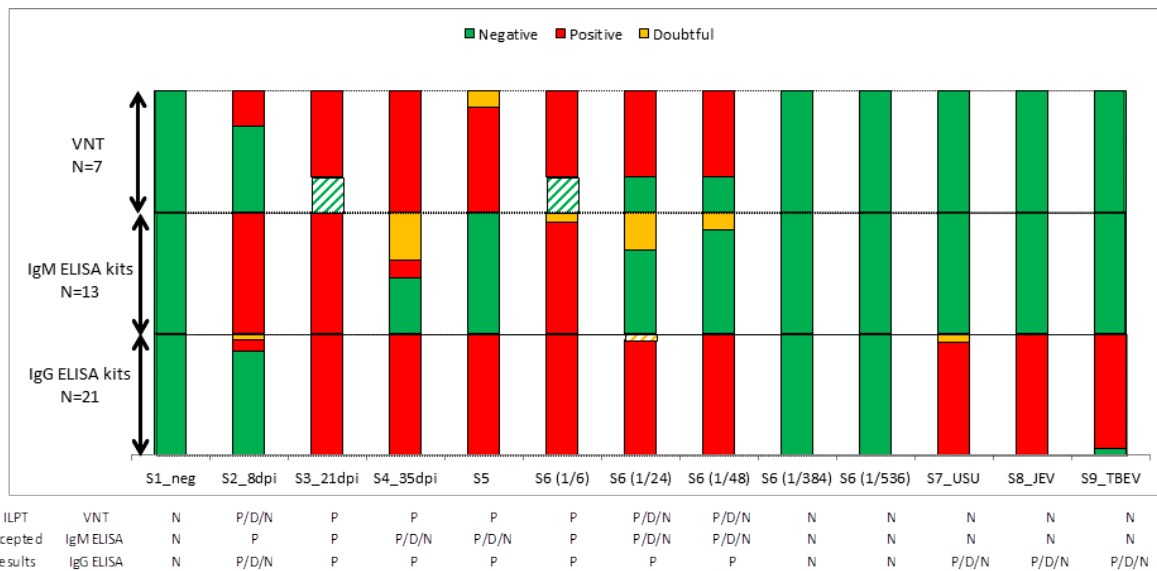


Figure 3: Percentage of NRLs having generated positive (red), doubtful (orange) and negative results (green) during the 2013 WNV ILPT. The striped results are unsatisfactory. The above table summarises the accepted ILPT results with P (positive), D (doubtful) and N (negative)

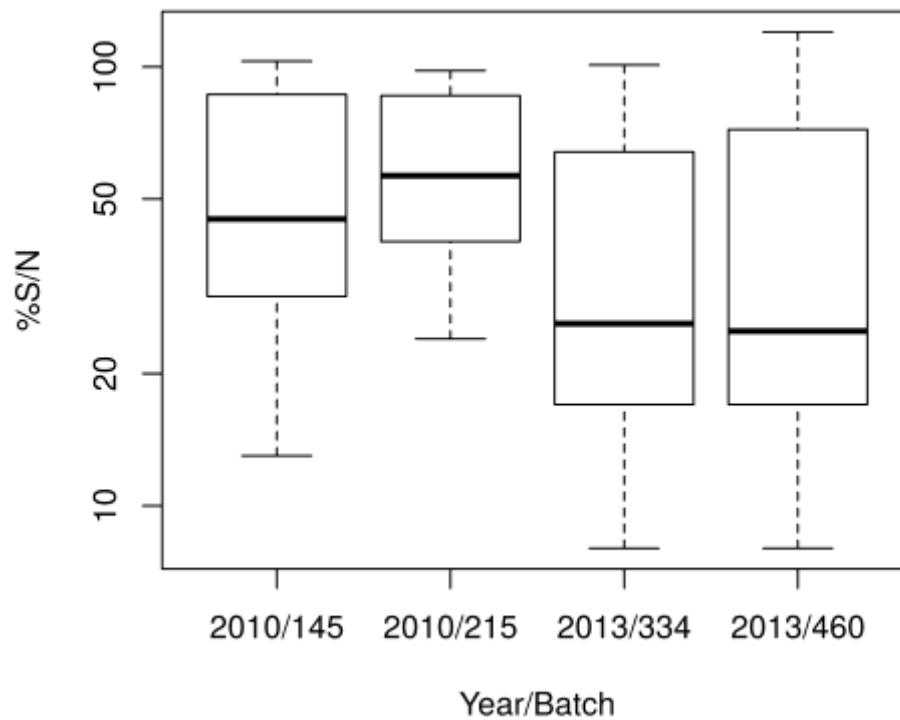
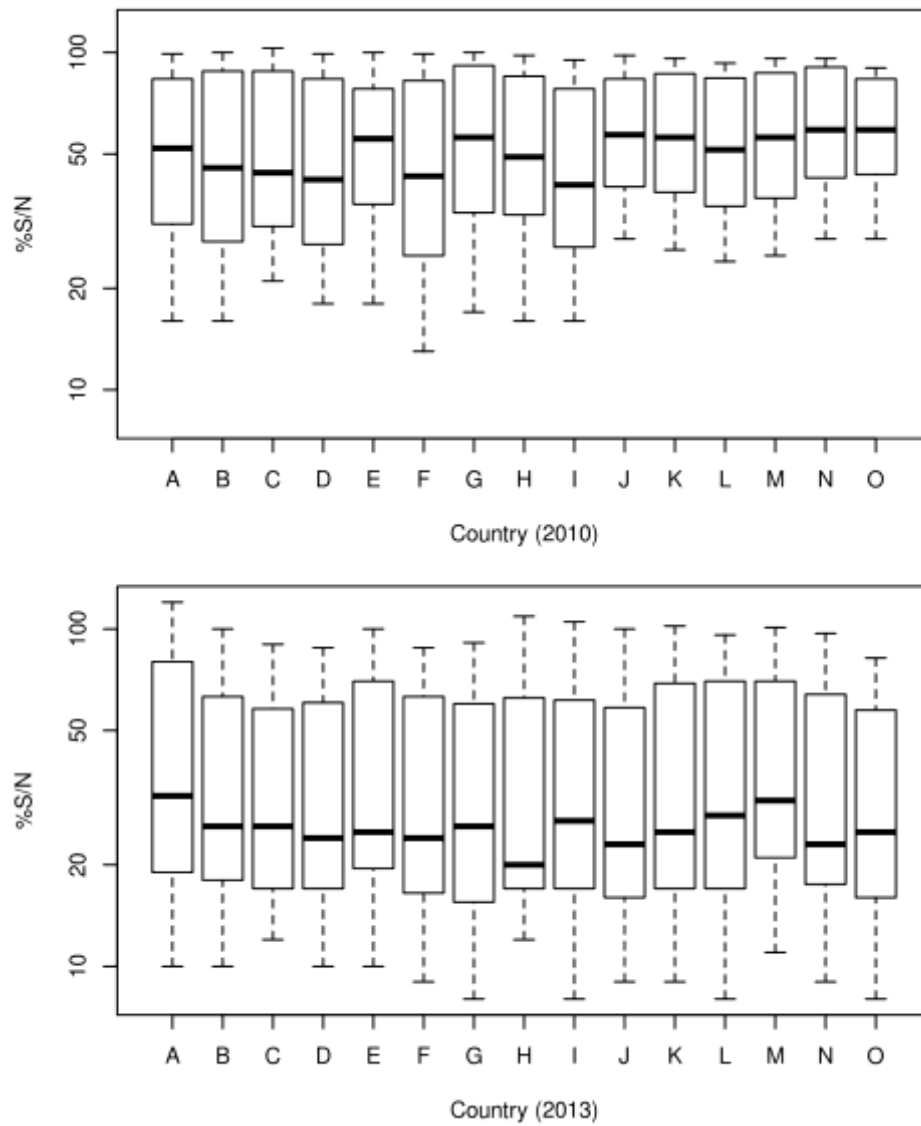


Figure 4: Box plot representing the distribution of %S/N obtained with the ID screen® WNV competition kit by NRLs during the 2010 and 2013 ILPTs according to the year and batch. Assays were performed and %S/N was calculated according to the manufacturer's instructions (the threshold value for considering a serum as positive by the competitive ELISA was %S/N < 40%).



547

548 Figure 5: Box plot representing %S/N obtained with the ID screen® WNV competition kit by
 549 each NRL during the 2010 and 2013 IPLTs. Each NRL is represented by the same letter in
 550 2010 and 2013.

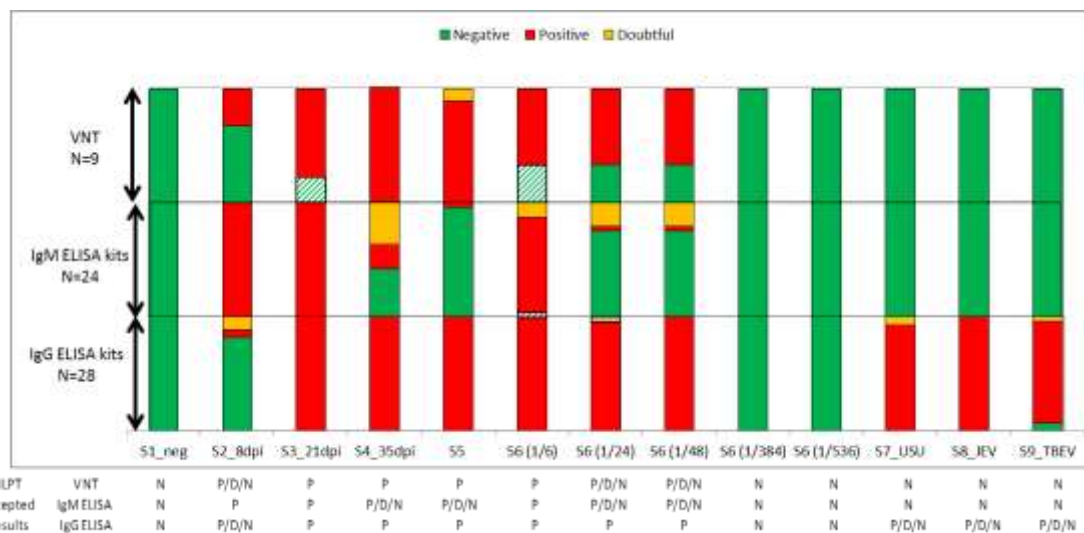


Figure 6: Percentage of ILPT participants having generated positive (red), doubtful (orange) and negative (green) results during the 2013 WNV ILPT. The striped results are unsatisfactory. The above table summarises the accepted ILPT results with P (positive), D (doubtful) and N (negative)

a.

h.

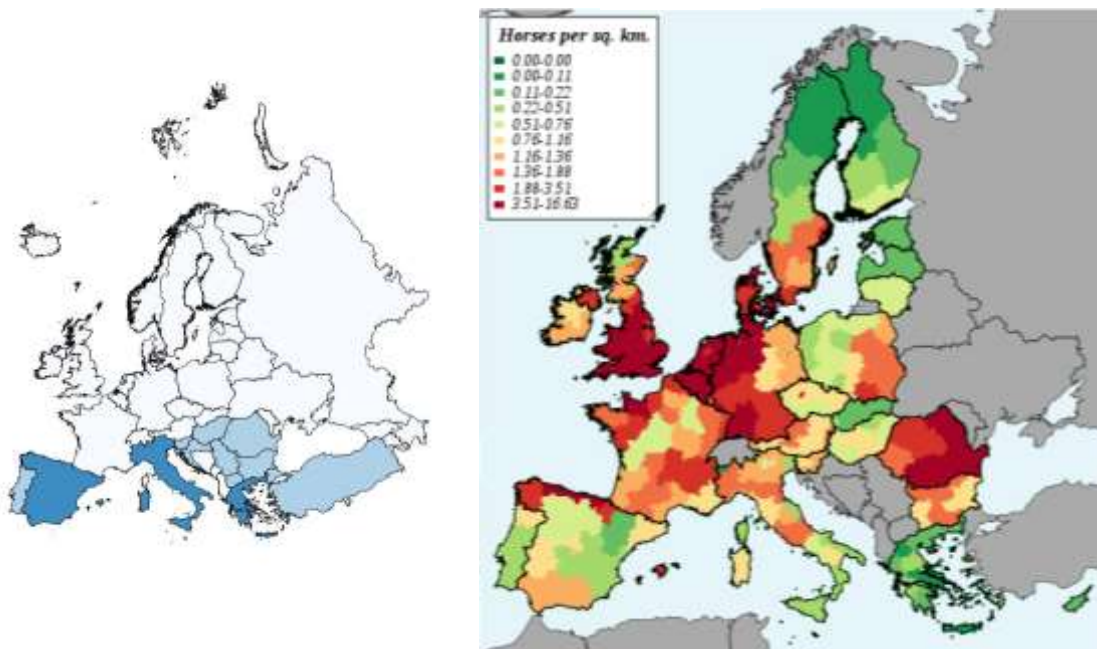
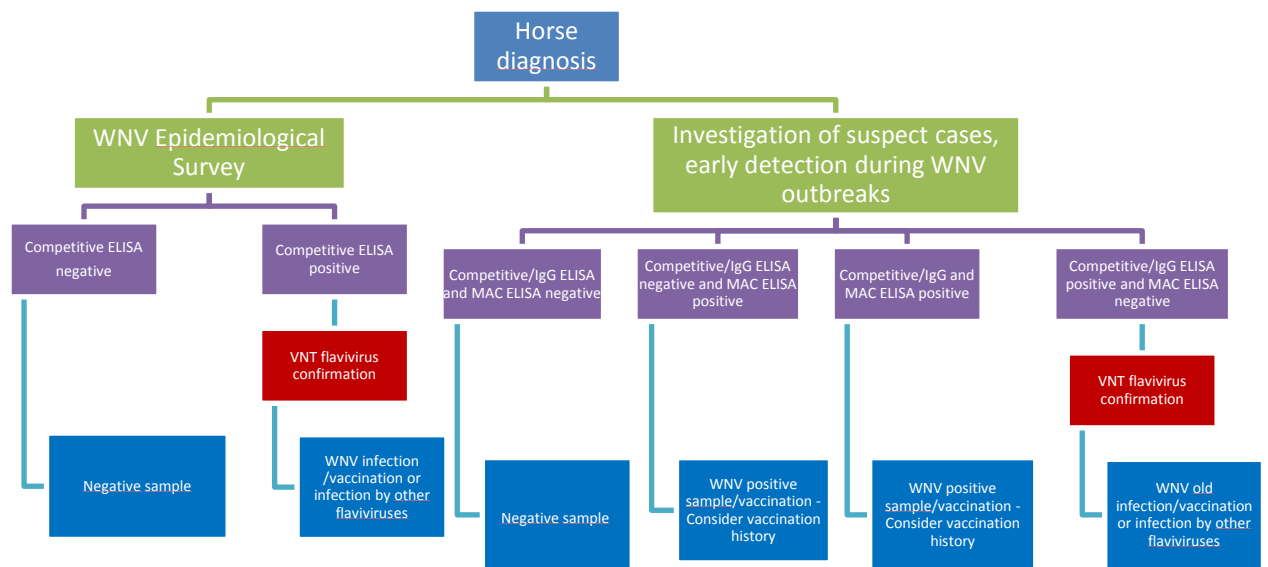


Figure 7: (a) Number of equine WNV outbreaks reported in EU member states from 2010-2015 and (b) Equine population in EU member states as evaluated in Durand et al, 2013 [50]



563

564 Figure 8: Decisional algorithm for flavivirus serological diagnosis

- 566 1. Hernandez-Triana, L.M., et al., *Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on*
567 *the introduction and spread of a mosquito-borne disease*. Front Public Health, 2014. **2**: p.
568 271.
- 569 2. eCDC, *West Nile fever maps. Latest data update 5 November 2015*. 2015.
- 570 3. Chevalier, V., S. Lecollinet, and B. Durand, *West Nile virus in Europe: a comparison of*
571 *surveillance system designs in a changing epidemiological context*. Vector Borne Zoonotic
572 Dis, 2011. **11**(8): p. 1085-91.
- 573 4. *Global Infectious Disease Surveillance and Detection: Assessing the Challenges-Finding*
574 *Solutions, Workshop Summary*. 2007, Washington DC: National Academy of Sciences.
- 575 5. Dauphin, G., et al., *West Nile: worldwide current situation in animals and humans*. Comp
576 Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 343-55.
- 577 6. Beck, C., et al., *Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences*
578 *for the diagnosis and control of West Nile disease*. Int J Environ Res Public Health, 2013.
579 **10**(11): p. 6049-83.
- 580 7. Agüero, M., et al., *Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010*. Emerg Infect Dis,
581 2011. **17**(8): p. 1498-501.
- 582 8. Weissenböck, H., et al., *Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the*
583 *Japanese encephalitis virus group, central Europe*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(7): p. 652-6.
- 584 9. Süss, J., *Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe*
585 *and Asia-an overview*. Ticks Tick Borne Dis, 2011. **2**(1): p. 2-15.
- 586 10. Ytrehus, B., et al., *Tick-borne encephalitis virus and louping-ill virus may co-circulate in*
587 *Southern Norway*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2013. **13**(10): p. 762-8.
- 588 11. Savini, G., et al., *Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection?* Vet Microbiol, 2011.
589 **151**(3-4): p. 264-74.
- 590 12. Bakonyi, T., et al., *Emergence of Usutu virus in Hungary*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(12): p.
591 3870-4.
- 592 13. Ashraf, U., et al., *Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe*. Viruses, 2015. **7**(1): p. 219-38.
- 593 14. Lecollinet, S., et al., *Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France,*
594 *2015*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(12): p. 2225.
- 595 15. Rijks, J., et al., *Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016*. Euro
596 Surveill, 2016. **21**(45).
- 597 16. Gritsun, T.S., V.A. Lashkevich, and E.A. Gould, *Tick-borne encephalitis*. Antiviral Res, 2003.
598 **57**(1-2): p. 129-46.
- 599 17. Heinz, F.X., et al., *Emergence of tick-borne encephalitis in new endemic areas in Austria: 42*
600 *years of surveillance*. Euro Surveill, 2015. **20**(13): p. 9-16.
- 601 18. Jeffries, C.L., et al., *Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain*. J Gen
602 Virol, 2014. **95**(Pt 5): p. 1005-14.
- 603 19. Platonov, A., et al., *Does the Japanese encephalitis virus (JEV) represent a threat for human*
604 *health in Europe? Detection of JEV RNA sequences in birds collected in Italy*. Euro Surveill,
605 2012. **17**(32).
- 606 20. Ravanini, P., et al., *Japanese encephalitis virus RNA detected in Culex pipiens mosquitoes in*
607 *Italy*. Euro Surveill, 2012. **17**(28).
- 608 21. OIE, *West Nile fever*, in *OIE Terrestrial Manual*. 2008. p. 377-385.
- 609 22. Bakonyi, T., et al., *Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central*
610 *Europe, 2008/2009*. Vet Microbiol, 2013. **165**(1-2): p. 61-70.
- 611 23. Pradier, S., et al., *Importance of wetlands management for West Nile Virus circulation risk,*
612 *Camargue, Southern France*. Int J Environ Res Public Health, 2014. **11**(8): p. 7740-54.
- 613 24. Beck, C., et al., *A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-*
614 *Associated Neurological Diseases in Horses*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 678084.

25. Rushton, J.O., et al., *Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(4): p. 635-7.
26. Team, R.C., *R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 3.1. 2): R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. Available from URL <http://www.R-project.org>, 2015.
27. Dauphin, G. and S. Zientara, *West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development*. Vaccine, 2007. **25**(30): p. 5563-76.
28. eCDC, http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/pages/index.aspx. Latest data update 16 Décembre 2016.
29. Sanchini, A., et al., *Second international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(4): p. e2184.
30. Domingo, C., et al., *International external quality control assessment for the serological diagnosis of dengue infections*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 167.
31. Niedrig, M., et al., *First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection*. BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 72.
32. Prince, H.E., et al., *Development and persistence of West Nile virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4316-20.
33. Castillo-Olivares, J., et al., *Antibody response in horses following experimental infection with West Nile Virus lineages 1 and 2*. Transbound Emerg Dis, 2011. **58**(3): p. 206-12.
34. Tardei, G., et al., *Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2232-9.
35. Khatibzadeh, S.M., et al., *West Nile virus-specific immunoglobulin isotype responses in vaccinated and infected horses*. Am J Vet Res, 2015. **76**(1): p. 92-100.
36. Cleton, N.B., et al., *A Serological Protein Microarray for Detection of Multiple Cross-Reactive Flavivirus Infections in Horses for Veterinary and Public Health Surveillance*. Transbound Emerg Dis, 2016.
37. Yeh, J.Y., et al., *A diagnostic algorithm to serologically differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections and its validation in field surveillance of poultry and horses*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012. **12**(5): p. 372-9.
38. De Filette, M., et al., *Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination*. Vet Res, 2012. **43**(1): p. 16.
39. Kitai, Y., et al., *Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate west nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(8): p. 1024-31.
40. Sotelo, E., et al., *Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus*. J Virol Methods, 2011. **174**(1-2): p. 35-41.
41. Kitai, Y., T. Kondo, and E. Konishi, *Non-structural protein 1 (NS1) antibody-based assays to differentiate West Nile (WN) virus from Japanese encephalitis virus infections in horses: effects of WN virus NS1 antibodies induced by inactivated WN vaccine*. J Virol Methods, 2011. **171**(1): p. 123-8.
42. Konishi, E., et al., *Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(11): p. 5087-93.
43. Balasuriya, U.B., et al., *Detection of antibodies to West Nile virus in equine sera using microsphere immunoassay*. J Vet Diagn Invest, 2006. **18**(4): p. 392-5.
44. Diamond, M.S., T.C. Pierson, and D.H. Fremont, *The structural immunology of antibody protection against West Nile virus*. Immunol Rev, 2008. **225**: p. 212-25.
45. Crill, W.D. and G.J. Chang, *Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13975-86.
46. Chabierski, S., et al., *Distinguishing West Nile virus infection using a recombinant envelope protein with mutations in the conserved fusion-loop*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 246.

- 666 47. Beasley, D.W. and A.D. Barrett, *Identification of neutralizing epitopes within structural*
667 *domain III of the West Nile virus envelope protein*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 13097-100.
- 668 48. Mathengtheng, L. and F.J. Burt, *Use of envelope domain III protein for detection and*
669 *differentiation of flaviviruses in the Free State Province, South Africa*. Vector Borne Zoonotic
670 Dis, 2014. **14**(4): p. 261-71.
- 671 49. Beasley, D.W., et al., *Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific*
672 *serological diagnosis of West Nile virus infection*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(6): p. 2759-65.
- 673 50. Durand, B., et al., *Identification of hotspots in the European union for the introduction of four*
674 *zoonotic arboviroses by live animal trade*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70000.

675

3.1.1.1.2. Discussion et conclusion

Ce manuscrit amène aux conclusions suivantes :

1/Le réseau des LNR est bien constitué en Europe avec une augmentation du nombre de participants (17 en 2010 versus 21 en 2013) et une amélioration de la qualité des résultats entre 2010 et 2013 pour le diagnostic des sérums positifs en IgG et IgM anti-WNV (82% en 2010 versus 95% en 2013 de résultats conformes pour la détection des sérums positifs WNV par ELISA de compétition). Entre les deux EILA, le fait le plus remarquable est l'augmentation du nombre de participants assurant le diagnostic des IgM anti-WNV (3 participants en 2010 versus 13 en 2013) grâce à la mise sur le marché de kits commerciaux. A contrario on observe une stagnation du nombre des LNRs pratiquant la SNT (8 en 2010 et 7 en 2013) avec des résultats systématiquement non satisfaisants pour plus de 30% des laboratoires pratiquant cette technique.

2/ une hétérogénéité dans la performance des méthodes utilisées est clairement soulignée quand on compare les méthodes sur un même panel de sérums positifs et négatifs pour le WNV et pour les *flavivirus* apparentés (JEV, TBEV et USUV). En effet, les ELISA de compétition commercialisés sont très sensibles pour le diagnostic du WNV mais donnent des résultats faussement positifs avec les *flavivirus* apparentés. A l'inverse, les ELISA de capture IgM anti-WNV sont beaucoup plus spécifiques que les ELISA de compétition mais leur sensibilité analytique est plus faible. Enfin la séroneutralisation (SNT) est très spécifique avec une absence de réaction faussement positive sur des échantillons sérologiquement positifs contre USUV, JEV ou TBEV. Cependant, la sensibilité analytique de la SNT est plus faible que l'ELISA de compétition avec des échantillons dilués trouvés systématiquement positifs en ELISA de compétition et positifs dans 2/3 cas avec la SNT.

L'ensemble de ces constatations plaide en faveur du développement de méthodes aussi rapides et sensibles que l'ELISA de compétition mais aussi spécifiques que la SNT afin de connaître précisément le *flavivirus* responsable de la séroconversion chez l'animal infecté.

3.1.1.2. Outils de diagnostic sérologique multiplexe : application de la méthode MIA au sérodiagnostic des flavivirus neurotropes chez les chevaux

3.1.1.2.1. Présentation du manuscrit N°3

✓ Contexte

Comme décrit dans l'Introduction de ma thèse, les *flavivirus* sont largement distribués dans le monde (ex : TBEV en Europe, WNV présent sur les 5 continents, DENV en Afrique, Asie et sur le continent américain, JEV en Asie ...) et sont responsables de maladies à dominante hémorragique chez l'homme ou neurologique chez l'homme et le cheval (cas du JEV ou du WNV).

La virémie étant brève chez le cheval, les méthodes de diagnostic utilisées pour les *flavivirus* sont essentiellement sérologiques et le fréquent chevauchement des aires de répartition de ces virus complique le diagnostic. En effet, les *flavivirus* appartenant à différents sérocomplexes (sérocomplexes de la dengue, de l'encéphalite japonaise ou de l'encéphalite à tique) induisent des réactions sérologiques croisées au sein des sérocomplexes lors de l'utilisation des méthodes de diagnostic usuel (SNT, ELISA ou IFI) mais aussi entre les sérocomplexes pour l'ELISA et l'IFI. Du fait de ce manque de spécificité des outils diagnostiques rapides, les résultats sérologiques doivent être interprétés avec prudence, l'émergence d'un nouveau *flavivirus* pouvant être facilement confondue avec un *flavivirus* existant dans le pays (ex : WNV et SLEV aux USA). Les résultats sérologiques doivent donc être confirmés par la méthode fastidieuse de SNT virale avec les différents *flavivirus* qui circulent sur le terrain.

Pour pallier à ce manque de spécificité et à la lourdeur de la SNT, nous avons développé une méthode de diagnostic sérologique multiplexe, à l'aide de la technologie MIA, afin de différencier les principaux *flavivirus* pathogènes du cheval (cf. 1.5.2.5). Grâce à cette méthode, un sérum mis en contact avec un panel d'antigènes viraux couplés à des billes magnétiques donne une réaction positive uniquement avec l'antigène viral provenant du *flavivirus* responsable de l'infection.

Sachant que la partie soluble de l'ectodomaine de la glycoprotéine E d'enveloppe (sE) des *flavivirus* est divisée en 3 domaines structuraux, DI, DII et DIII et que certains épitopes du DIII de la glycoprotéine E (EDIII) sont spécifiques du virus (cf 1.4.1.1.1 et tableau 3), des protéines recombinantes des DIII (rEDIIIs) des différents *flavivirus* d'intérêt pour le cheval ont été synthétisées en système d'expression *Drosophila* S2 à l'IP.

	AA (% homologie)	
	JEV.EDIII	TBEV.EDIII
WNV.EDIII	75%	38%
JEV.EDIII		39%

Tableau 3 : Pourcentage d'homologie en AA des rEDIII du WNV (AY033389.1), JEV (FJ979830.1) et TBEV (AY268437.1)

Les différentes protéines recombinantes WNV.sE et rEDIII ont été couplées à des billes magnétiques et testées avec la technologie MIA sur sérums équins.

La bille couplée à WNV.sE permet de mettre en évidence une réponse « anti-flavivirus » du fait des réactions sérologiques croisées entre *flavivirus* ciblant principalement le DII. Les antigènes WNV.EDIII, JEV.EDIII et TBEV.EDIII plus spécifiques permettent de faire la distinction entre ces *flavivirus*. Ainsi par exemple, un sérum positif WNV réagira le plus souvent contre deux antigènes, WNV.sE et WNV.EDIII. Pour améliorer la reproductibilité de la technique, des contrôles faiblement positifs (CP) pour WNV, JEV et TBEV ont été systématiquement inclus dans les essais et un ratio défini par $S/CP \times 100$ (avec S = *sample*) était calculé pour chaque bille.

Pour valider la technique, nous avons produit des sérums de référence équins contre le WNV lignée 1 ou 2, le JEV et le TBEV après infections expérimentales de poneys avec ces différents virus à la plateforme d'infectiologie (PFIE) de l'INRA de Nouzilly.

Des sérums terrains positifs bien caractérisés contre les WNV, JEV et TBEV ainsi que des sérums négatifs pour ces 3 virus ont été testés avec les trois techniques ELISA de compétition, MIA et SNT et une comparaison des résultats obtenus par ces différentes techniques a été effectuée.

✓ Résultats

- Optimisation du couplage

Des essais préliminaires avec différentes concentrations d'antigènes (de 5µg à 50µg), différentes dilutions de sérums (de 1/50 à 1/200) ainsi que d'anticorps secondaires (de 1/100 au 1/2000) ont été effectués afin de déterminer les conditions optimales qui permettaient la meilleure distinction entre sérums positifs (WNV, JEV et TBEV) et sérums négatifs. Les concentrations de 5 µg pour les antigènes WNV.sE et TBEV.EDIII et 50µg pour JEV.EDIII et WNV.EDIII ont été retenues car ayant un rapport MFI échantillons positifs/MFI échantillons négatifs le plus élevé. De même un tableau de titrage à double entrée a permis de calculer le facteur optimal de dilution de 1/100 pour les sérums et de 1/500 pour l'anticorps secondaire.

- Calcul du seuil de positivité pour les différentes billes

Les seuils de positivité, respectivement de 17 pour la bille WNV.sE, 54 pour WNV.EDIII, 55 pour JEV.EDIII et 59 pour TBEV.EDIII ont été calculés par la méthode ROC à l'aide d'un panel de sérums positifs et négatifs pour chaque virus (tableau n°2 du manuscrit 3). L'observation de la plus grande spécificité diagnostique de la bille WNV.sE (99.4%) par rapport aux billes WNV.EDIII (92.3%) ou JEV.EDIII (94.4%) a conduit à la mise en place d'un algorithme décisionnel pour améliorer la spécificité de la technique : toute bille positive WNV.EDIII ou JEV.EDIII mais négative avec la bille WNV.sE était considérée négative. De même pour prendre en compte les éventuelles réactions sérologiques croisées entre les billes EDIII, un cheval avec une bille WNV.sE positive était considéré infecté avec un *flavivirus* spécifique si et seulement si la bille couplée à l'EDIII générait un ratio S/CP supérieur au moins d'un facteur 1.5 à celui généré avec les autres billes EDIII positives. Ce facteur a été déterminé suite à la comparaison des résultats en MFI des billes EDIII.WNV et EDIII. JEV sur les sérums WNV et JEV bien caractérisés. Dans le cas contraire, ou en l'absence de réaction avec les EDIII, l'échantillon était considéré comme « *flavivirus* non déterminé » (figure 31).

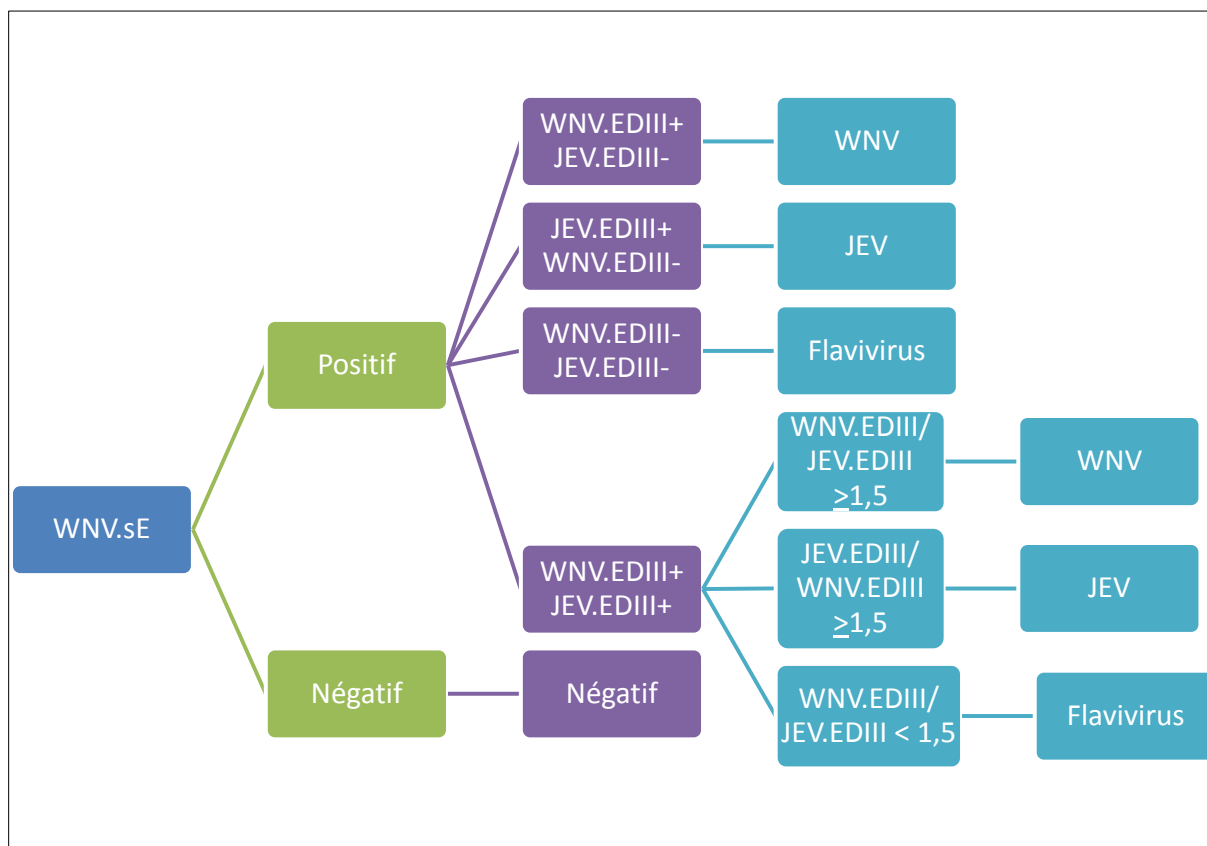


Figure 31 : Algorithme décisionnel pour l'identification du WNV ou JEV par méthode MIA

Sérums de référence provenant d'infections expérimentales

Les sérums ont été testés avec les protéines recombinantes WNV.sE, WNV.EDIII, JEV.EDIII et TBEV.EDIII utilisées en multiplexe.

1/ En comparaison de l'ELISA compétition (kit ID Screen® West Nile competition, ID Vet) très sensible, la méthode multiplexe permet un diagnostic plus précoce d'une infection à *flavivirus* (positivité de la bille sE) sur les sérums obtenus après infection expérimentale par le WNV lignée 2 (positif à J8 en MIA et J11 en ELISA) et équivalent pour les sérums WNV lignée 1 (résultats positifs à J11 en MIA et ELISA), TBEV et JEV (résultats positifs à J20 en MIA et ELISA).

2/Aucune réaction croisée avec l'antigène TBEV.EDIII n'a été observée pour les sérums dirigés contre des *flavivirus* du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise (WNV et JEV). Au sein du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise, une faible réaction sérologique croisée a été observée uniquement à J58 entre WNV.EDIII et JEV.EDIII avec les sérums WNV lignée 1 et 2.

La distinction entre infection à JEV, WNV et TBEV a pu être faite dès J8 lors d'infection par le WNV lignée 2 et J35 pour les infections à WNV lignée 1 et TBEV, mais pas pour lors d'infection expérimentale par le JEV.

Les potentiels discriminants du MIA et de la SNT sont comparables mais le délai d'identification du flavivirus en cause est augmenté avec la méthode MIA par rapport à la SNT pour le WNV lignée 2 (J35 pour MIA versus J14 pour SNT), TBEV (J35 pour MIA versus J8 pour SNT) et JEV (pas d'identification avec la méthode MIA versus J35 pour SNT).

Sérums terrains

246 sérums équins provenant de différentes zones d'endémie pour les WNV (103 sérums de Madagascar et Pakistan), JEV (101 sérums du Japon) et TBEV (74 sérums d'Autriche) ont été testés conjointement par les techniques ELISA, SNT et MIA. Les résultats montrent que la méthode MIA (bille WNV.sE) présente une sensibilité diagnostique comparable à la méthode ELISA pour les infections à WNV, JEV et TBEV.

La méthode MIA permet de correctement différencier les sérums provenant d'infection à WNV et TBEV des autres infections à *flavivirus*. En ce qui concerne le JEV, la méthode MIA et ELISA de compétition ont des résultats très comparables mais sont moins sensibles que la SNT. Néanmoins, les 2 techniques MIA et SNT différencient correctement les infections dues à JEV des autres infections à WNV ou TBEV sur les sérums trouvés positifs avec la bille WNV.sE.

Manuscrit N°3 : Application de la méthode
d'immuno-essais sur billes au
sérodiagnostic des *flavivirus* responsables
de maladies neurologiques chez les chevaux

Research Article

A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses

Cécile Beck,¹ Philippe Desprès,^{2,3} Sylvie Paulous,³ Jessica Vanhomwegen,³ Steeve Lowenski,¹ Norbert Nowotny,^{4,5} Benoit Durand,¹ Annabelle Garnier,¹ Sandra Blaise-Boisseau,¹ Edouard Guitton,⁶ Takashi Yamanaka,⁷ Stéphan Zientara,¹ and Sylvie Lecollinet¹

¹UMR 1161 of Virology, ANSES, INRA, ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, EU-RL on Equine Diseases, UPE, 94701 Maisons-Alfort, France

²UMR PIMIT (I2T Team), INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Technology Platform CYROI, University of Reunion, 97491 Saint-Clotilde, Réunion

³Department of Infections and Epidemiology, Institut Pasteur, 75724 Paris, France

⁴Viral Zoonoses, Emerging and Vector-Borne Infections Group, Institute of Virology, University of Veterinary Medicine Vienna, 1210 Vienna, Austria

⁵Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine and Health Sciences, Sultan Qaboos University, 123 Al-Khoudh, Oman

⁶INRA UE 1277, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, 37380 Nouzilly, France

⁷Equine Research Institute, Japan Racing Association, Tochigi 329-0412, Japan

Correspondence should be addressed to Cécile Beck; cecile.beck@anses.fr

Received 11 March 2015; Accepted 12 May 2015

Academic Editor: Sulagna Das

Copyright © 2015 Cécile Beck et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

West Nile virus (WNV), Japanese encephalitis virus (JEV), and tick-borne encephalitis virus (TBEV) are flaviviruses responsible for severe neuroinvasive infections in humans and horses. The confirmation of flavivirus infections is mostly based on rapid serological tests such as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). These tests suffer from poor specificity, mainly due to antigenic cross-reactivity among flavivirus members. Robust diagnosis therefore needs to be validated through virus neutralisation tests (VNTs) which are time-consuming and require BSL3 facilities. The flavivirus envelope (E) glycoprotein ectodomain is composed of three domains (D) named DI, DII, and DIII, with EDIII containing virus-specific epitopes. In order to improve the serological differentiation of flavivirus infections, the recombinant soluble ectodomain of WNV E (WNV.sE) and EDIIIs (rEDIIIs) of WNV, JEV, and TBEV were synthesised using the *Drosophila* S2 expression system. Purified antigens were covalently bonded to fluorescent beads. The microspheres coupled to WNV.sE or rEDIIIs were assayed with about 300 equine immune sera from natural and experimental flavivirus infections and 172 nonimmune equine sera as negative controls. rEDIII-coupled microspheres captured specific antibodies against WNV, TBEV, or JEV in positive horse sera. This innovative multiplex immunoassay is a powerful alternative to ELISAs and VNTs for veterinary diagnosis of flavivirus-related diseases.

1. Introduction

Many flaviviruses such as West Nile virus (WNV), tick-borne encephalitis virus (TBEV), Japanese encephalitis virus (JEV), or dengue virus are emerging or reemerging diseases threatening humans and/or animals [1–4]. Most flaviviruses are arboviruses that can be transmitted by ticks, *Aedes* or

Culex mosquitoes, or by unknown vectors [5, 6]. Mosquito-borne viruses are grouped into serocomplexes such as the dengue or Japanese encephalitis serocomplexes on the basis of their antigenic relationships [7]. WNV and JEV—two major encephalitic viruses in horses and humans [8, 9]—belong to the Japanese encephalitis serocomplex which is composed of eight virus species and two subtypes [10].

TBEV, another encephalitic flavivirus known to cause severe infections in humans and dogs, belongs to the group of mammalian tick-borne viruses [2].

Only low levels of viremia are induced after infection with most flaviviruses (apart from dengue), so diagnosis is confirmed mainly through serological tools. Rapid serological tools are widely used in human and veterinary diagnostic laboratories, in particular enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and immunofluorescence assays (IFAs). ELISAs and IFAs are very sensitive but suffer from a lack of specificity, generating positive reactions for close flaviviruses within a specific serocomplex or even for flaviviruses belonging to other serocomplexes [6]. For example, JEV- or TBEV-infected patients can generate false positive reactions in WNV ELISAs [11, 12]. Serological assays should thus be interpreted with care taking into account the patient's history of vaccination and past infection and confirmed by comparative virus neutralisation tests (VNTs) [7, 13]. Nevertheless, the VNT is usually less sensitive than ELISA or IFA and some residual cross-reactions can be observed within the Japanese encephalitis serocomplex. This time-consuming immunoassay generally requires the production of infectious virus particles in BSL3 facilities.

Rapid flavivirus serological assays have already been misinterpreted in the past, highlighting the need for improved serological tools. During the emergence of WNV in the USA in 1999, the first WNV cases were initially thought to be Saint Louis encephalitis cases, a flavivirus prevalent in North America [14]. Consequently, the flavivirus surveillance programmes currently in operation in many countries could detect belatedly, or even fail to detect, the emergence of a new flavivirus. Moreover, the spatial and temporal overlapping in the circulation of flaviviruses makes it difficult to precisely monitor the dynamics of a specific flavivirus. Mosquito-borne flaviviruses like WNV or Usutu virus are widely distributed throughout Europe with high spatial overlapping, for example, in Italy, Austria, and Hungary [15–17], while WNV and TBEV are regularly isolated in Central Europe [6].

Most antibodies elicited during flavivirus infections are directed against the highly immunogenic envelope (E) protein, which contains both flavivirus cross-reactive and virus-specific epitopes [18, 19]. The E glycoprotein is composed of three domains named EDI, EDII, and EDIII, altogether composing the soluble ectodomain of E (sE). Both EDI and EDIII contain virus-specific epitopes [20–22], and EDIII mediates virus attachment to the cell membrane [23, 24]. Potent neutralising antibodies have been shown to map to EDIII [25–29], and amino acid substitutions within EDIII may influence the pathogenicity of flaviviruses [27, 30–34].

The development of xMAP microsphere immunoassays (MIAs) or Luminex assays for human and veterinary diagnoses offers promising multiplexing approaches to the capture of specific antibodies directed against flavivirus antigens [35–38]. To significantly improve the specificity and sensitivity of flavivirus serodiagnosis based on the capture of specific antibodies in host vertebrates, MIA has been designed with recombinant flavivirus EDIII antigens (rEDIII) covalently coupled to colour-coded microspheres. This innovative diagnostic tool combines the ease and rapidity of

ELISA with the precision of flow cytometry technology, giving a reliable measurement of the multiple components of antibody response in a single assay.

The serological diagnosis of infection due to neurotropic flaviviruses is challenging due to their antigenic cross-reactivity [11, 12, 39, 40]. The rapid serological tests used to diagnose tick-borne encephalitis in Europe may be confused with West Nile disease in endemic regions with high prevalence rates of infection in humans and horses [2, 41–43]. This research evaluated the capacity of the rEDIII-based MIA to detect and differentiate the antibody response induced after three flavivirus infections responsible for encephalitis in humans and horses: WNV, JEV, and TBEV.

Equine reference sera for these three diseases were produced by experimental infection. These experiment-produced sera were tested with an innovative MIA, as were field sera collected from horses in countries with highly prevalent JEV (Japan), TBEV (Austria), or WNV (Madagascar and Pakistan) infections. The results obtained were compared using VNTs for WNV, JEV, and TBEV and a flavivirus competition ELISA.

2. Materials and Methods

2.1. Production of Recombinant WNV.sE and rEDIIIs of WNV, JEV, and TBEV. The *Drosophila* S2 expression system (DES, Life Technologies) was used to produce recombinant WNV.sE and the flavivirus rEDIIIs in *Drosophila* S2 cells.

The synthetic genes (GeneCust, Luxembourg) encoding the soluble ectodomain of E from WNV strain IS-98-ST1 (Genbank AY033389.1, residues E-1 to E-405) and the EDIII (residues E-295 to E-405) from IS-98-ST1, EDIII (residues E-302 to E-413) from JEV strain GP05 of genotype 3 (Genbank FJ979830.1), or EDIII (residues E-293 to E-399) from TBEV strain Kumlinge A52 (Genbank AY268437.1) were cloned into shuttle vector pMT/BiP/HisA in which the SNAP-tag sequence (Covalys BioSciences AG) had been initially inserted as a stabilizing protein. The resulting plasmids encoding either chimeric protein WNV.sE-SNAP or chimeric proteins SNAP-EDIII were transfected into S2 cells to establish stable cell lines S2/WNV.sE, S2/WNV.EDIII, S2/JEV.EDIII, and S2/TBEV.EDIII according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies) [44]. After a 10-day cadmium induction of the stable S2 cell lines grown in a 1 L spinner, cell supernatants were recovered and secreted soluble His-tagged recombinant viral antigens were purified on chelating and size-exclusion chromatography columns. The protein quantities of highly purified WNV.sE-SNAP, SNAP-WNV.EDIII, SNAP-JEV.EDIII, and SNAP-TBEV.EDIII were determined using a BCA protein assay kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Ten to hundred milligrams of recombinant viral antigens was obtained from a single 1 L batch of S2 cell culture (Table 1).

2.2. Western Blot. A Western blot analysis was carried out on 12% polyacrylamide gel on purified proteins heated for five minutes at 95°C and mixed with Laemmli 1X (Bio-Rad) plus 5% β -mercaptoethanol. Proteins were subsequently transferred to nitrocellulose membrane and probed overnight

TABLE 1: Amount of flavivirus antigens produced in *Drosophila* S2 cells per litre of culture.

Recombinant flavivirus antigens	Amount of purified protein (mg) obtained per L of culture
WNV.sE	40
WNV.EDIII	175
JEV.EDIII	225
TBEV.EDIII	180

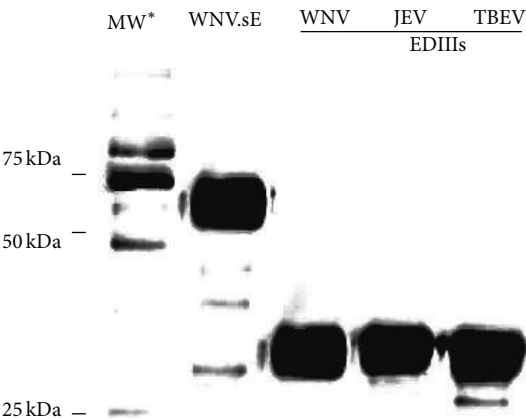


FIGURE 1: 12% polyacrylamide gel electrophoresis showing the recombinant WNV.sE-SNAP, SNAP-WNV.EDIII, SNAP-JEV.EDIII, and SNAP-TBEV.EDIII proteins after purification. *MW: molecular weight marker.

at 4°C with the anti-His mouse monoclonal antibody at a dilution of 1:1000 (Invitrogen, Life Technologies). The membranes were incubated at a 1:5000 dilution of anti-rabbit immunoglobulins coupled to horseradish peroxidase (DakoCytomation) for one hour at room temperature (RT). Proteins were then detected with Clarity ECL Western blotting substrate (Bio-Rad) with five minutes of incubation and 30 seconds of exposure. The Precision Plus Protein WesternC Standard was used as a molecular size marker (Bio-Rad) (Figure 1).

2.3. Multiplex Immunoassay Technology

2.3.1. Coupling Assay. Different colour-coded magnetic beads (Bio-Plex Pro™ Magnetic COOH Beads, Bio-Rad Laboratories) were coupled at room temperature (RT) to WNV.sE or flavivirus rEDIIIs through carboxylate amine bonds. Bead regions 34, 46, 53, and 65 were used for TBEV.EDIII, JEV.EDIII, WNV.sE, and WNV.EDIII, respectively. The amine coupling assay was performed following the manufacturer’s instruction manual using the commercial Bio-Plex Amine Coupling Kit (Bio-Rad Laboratories).

Each coupling reaction required 1.25×10^6 beads. Beads were vortexed thoroughly for one minute and washed twice with the bead wash buffer using a magnetic separator to

retain the beads. The beads were then resuspended in 80 µL of bead activation buffer. Ten microlitres of hydroxysulfosuccinimide sodium salt (S-NHS; 50 mg/mL) (Sigma-Aldrich) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDAC; 50 mg/mL) (Sigma-Aldrich) was prepared extemporaneously in the bead activation buffer and added to the bead suspensions. The beads were vortexed and then placed in the dark on a rotary wheel for 20 min at RT. One hundred and fifty microlitres of PBS at pH 7.4 (Gibco, Life Technologies) was added to the bead, briefly mixed by vortexing at high speed, and removed (step repeated once). The beads were then resuspended in 100 µL of PBS. Five micrograms of WNV.sE or TBEV.EDIII or 50 µg of WNV.EDIII or JEV.EDIII (optimal final protein amount established after different assays) was added to the beads in 500 µL of PBS (pH 7.4). The beads were incubated in the dark on a rotary wheel for 2 h. The coupled beads were washed with 500 µL of PBS (pH 7.4), resuspended in 250 µL of blocking buffer, vortexed, and then incubated for 30 min in the dark on a rotary wheel. The supernatant was removed and the coupled microspheres were resuspended in 500 µL of storage buffer, vortexed, removed, and finally resuspended in 150 µL of storage buffer, counted, and stored between 2 and 8°C in the dark.

2.3.2. Multiplex Immunoassay with WNV.sE and Flavivirus rEDIIIs. The magnetic beads coupled to their specific antigen were diluted in 50 µL of dilution buffer from the ID Screen West Nile competition kit (ID Vet Company) at a final concentration of 1250 beads/well and placed in the wells of the MIA plate (Bio-Plex Pro™ flat bottom well plates, Bio-Rad Laboratories). Serum samples and controls, once heat-inactivated for 30 min at 56°C ± 1°C, were diluted at 1:100 in 50 µL of the ID Screen dilution buffer and mixed with the beads. After one-hour incubation at RT on a plate shaker, the plate was washed three times with the washing solution (PBS containing 0.05% Tween-20). Fifty microlitres of a secondary biotinylated goat anti-horse IgG (Jackson Immuno Research Inc.), diluted at 1:500 in the ID Screen dilution buffer, was added to each well and incubated at RT for 45 min on a plate shaker. After three washing steps, 50 µL of streptavidin R-phycoerythrin conjugate (SAPE; 1 µg/mL; Qiagen), diluted at 1:100 in the ID Screen dilution buffer, was added to each well. Finally, after 15-minute incubation at RT on a plate shaker and three additional washing steps, the beads were resuspended in 125 µL of xMAP Sheath fluid buffer (Bio-Rad Laboratories) and analysed using a Luminex 200 system (Bio-Rad Laboratories) (Figure 2). Fluorescence intensity and bead colour coding were measured by dual lasers that excite the beads at two different wavelengths: 635 nm to identify the microsphere particle and 532 nm to excite the SAPE reporter dye [45].

For each sample, the median fluorescence intensity (MFI) was calculated from at least 50 beads bearing the same antigen.

All equine sera were tested in duplicate in two separate assays. If discrepant results were obtained from the two assays, the corresponding sample was retested. The results presented below correspond to one representative MIA.

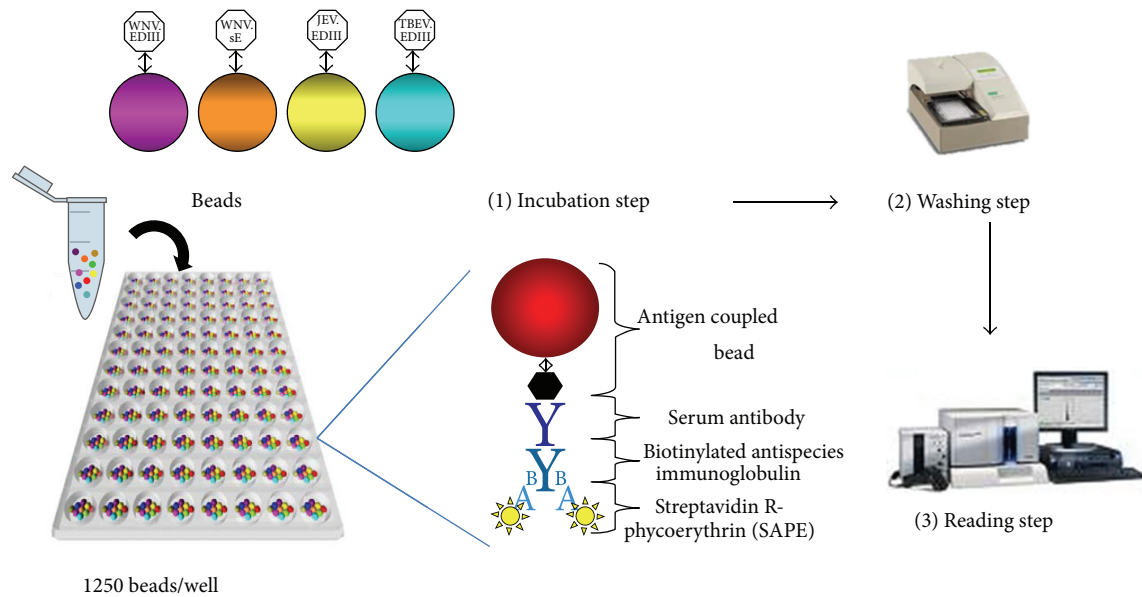


FIGURE 2: Presentation of the flavivirus microsphere immunoassay (MIA) with four beads coupled to four antigens (WNV.sE, WNV.EDIII, JEV.EDIII, and TBEV.EDIII).

2.4. ELISA Procedure. Equine serum samples were screened using a commercial ELISA (ID Screen West Nile competition ELISA kit; ID Vet, Montpellier, France) for antibodies against WNV and related flaviviruses [11, 13, 40, 41, 46, 47]. Assays were performed according to the manufacturer's instructions. In particular, the threshold value for considering a serum as positive by the competition ELISA was % S/N < 40% and as doubtful was $40 \leq \% \text{ S/N} < 50\%$ as recommended by the manufacturer.

2.5. Virus Neutralisation Tests. ELISA positive samples were further investigated through virus-specific microneutralisation tests (MNTs) against flaviviruses reported in the area where the sera were collected.

Heat-inactivated sera, serially diluted (1:5 to 1:3645) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were mixed with an equal volume (50 μL) of DMEM containing 100 tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) of WNV strain IS-98-ST1, JEV strain Nakayama, Usutu virus (USUV) strain SAAR-1776 (South Africa) or TBEV strain Hypr (most being a generous gift from the National Reference Centre for Arboviruses in France at the Institut Pasteur, Paris). Each serum was tested in duplicate. Cell and virus controls, as well as virus back titration controls, were included in every MNT run. After incubation of the plates at 37°C for 1.5 h, 2×10^4 Vero cells in 100 μL of DMEM were added to all the wells. Plates were incubated at 37°C for 3 to 5 days (3 days for WNV and USUV, 4 days for JEV and 5 days for TBEV), then cytopathogenic effects were observed under a light microscope. A serum was considered negative if infection occurred regardless serum concentration. It was considered positive if cells were protected at the 1:10 serum dilution for WNV, USUV and JEV and 1:20 for TBEV; its titre was calculated as the inverse of the latest dilution at which cells

were protected [48]. For TBEV field sera from Austria, TBEV antibodies were previously identified by a Plaque Reduction Neutralisation Test (PRNT) as per an existing protocol [41].

Owing to cross-neutralisation between flaviviruses, especially within the same serocomplex, VNTs end point titres need to be compared. The flavivirus can then be identified by considering the virus with the highest neutralisation capacity and at least a fourfold difference in titres [49, 50].

2.6. Serum Samples

2.6.1. Reference Sera. Four Welsh mares of varying ages (between 7 and 17 years) were used for experimental infection with different flaviviruses. The ponies were screened for the presence of antibodies against WNV or related flaviviruses using a commercial ELISA kit (ID Screen West Nile competition ELISA kit; ID Vet) and found negative prior to flavivirus infection. One week before infection, they were moved into a biocontainment building at the experimental platform of infectiology (INRA, Nouzilly) and maintained under biosafety level 3 conditions for 10 weeks. They were infected subcutaneously with 10^7 pfu of either WNV lineage 1 (WNV1, IS-98-ST1 strain), or lineage 2 (WNV2, Aus08), or JEV (Nakayama strain) or TBEV (Hypr strain). The animals were monitored for clinical signs for 10 weeks and blood was sampled on day 0 (D0), day 4 (D4), day 8 (D8), day 11 (D11), day 14 (D14), day 20 (D20), day 35 (D35), and day 58 (D58). Sera were obtained by centrifuging blood samples (2400 g, 10 minutes) and tested with the ID Screen West Nile competition kit (ID Vet), MIA, and MNT (viruses tested: WNV, JEV, and TBEV). These infections were initiated after bioethics acceptance according to European regulations on animal welfare (Directive 2010/63/UE; French Ethical Committee number 23-01-6V2).

TABLE 2: Determination of MIA cut-off, diagnostic sensitivity, and diagnostic specificity for WNV.sE, WNV.EDIII, JEV.EDIII, and TBEV.EDIII antigens by ROC analysis on ELISA positive and negative samples.

	Number of ELISA positive samples	Number of ELISA negative samples	ROC analysis		
			ROC cut-off	Diagnostic sensitivity determined with this cut-off	Diagnostic specificity determined with this cut-off
WNV.sE	189	172	17	98.4	99.4
WNV.EDIII	101	172	54	97.0	92.3
JEV.EDIII	88	172	55	93.2	94.7
TBEV.EDIII	59	172	61	98.4	100.0

2.6.2. Field Sera. A panel of WNV, JEV, and TBEV positive and negative field sera were tested with the developed MIA.

WNV Sera. One hundred and one field sera collected in either Madagascar (35) or Pakistan (66) were found positive with the ID Screen West Nile competition kit (ID Vet), and two sera were doubtful. Prior to MIA testing, sera were evaluated by MNTs to investigate the causative flavivirus involved. According to the known circulation history of flaviviruses in each area, WNV and USUV MNTs were performed on the sera from Madagascar, while WNV and JEV antibodies were evaluated in the sera from Pakistan. JEV neutralizing antibodies were also sought in the sera from Madagascar due to the substantial propensity of JEV to spread. WNV infection was confirmed by MNT on 96 Equidae from Pakistan [51] and Madagascar.

JEV Sera. One hundred and one field sera were sampled in horses injected twice at one-month intervals with the inactivated Japanese encephalitis vaccine (Nisseiken, Tokyo) according to the manufacturer's instructions, about four months after the last vaccination, and were sent by the Japan Racing Association. They were tested simultaneously by ELISA, MNT (viruses tested: JEV and WNV), and flavivirus MIA. JEV-specific antibodies were identified in 91 sera by the MNT.

TBEV Sera. Sera were collected from 74 Lipizzaner horses spread over three federal states in Austria and then screened using the ID Screen West Nile competition kit (ID Vet). ELISA positive and negative serum samples were further investigated by a VNT for the three flaviviruses circulating in Austria (WNV, USUV (MNT), and TBEV (PRNT)). TBEV-specific antibodies were identified in 62 sera by PRNT [41].

Negative Sera. To test the specificity of the method, 104 field sera sampled in the Camargue region of Southern France in 2007 and 56 sera from Ireland—all found negative with the ID Screen West Nile competition kit (ID Vet)—were tested with the flavivirus MIA.

3. Results and Discussion

3.1. Coupling of Recombinant Viral Antigens on Coloured Microspheres. To significantly improve the specificity and sensitivity of flavivirus serodiagnosis based on the capture of

specific antibodies in host vertebrates, the MIA was designed with recombinant flavivirus EDIII antigens (rEDIII) covalently coupled to colour-coded microspheres. Amino acid similarities in the EDIII proteins of JEV, WNV, and TBEV were determined using NCBI, Blastp program. Sequence alignment showed an amino acid identity of 39% for WNV and JEV versus TBEV and 74% between WNV and JEV, as previously determined by Danecek et al. [30]. Highly concentrated recombinant WNV.sE and rEDIII proteins from JEV, WNV, and TBEV were obtained in the supernatant of S2 cells by using the *Drosophila* S2 expression system (Table 1) and were purified on chromatography columns. The apparent molecular weights (MWs) of the soluble WNV.sE-SNAP protein (between 50 and 75 kDa) and SNAP.EDIII proteins (between 25 and 37 kDa) on PAGE-SDS were consistent with their theoretical MWs (Figure 1).

3.2. Determination of MIA Experimental Cut-Offs. The diagnostic cut-off of the flavivirus MIA technology was determined by ROC analysis for all the antigens using well-characterised sera found positive or negative by ELISA, for example, 172 negative samples from Ireland, Camargue (France), and Austria, 101 ELISA positive samples from Madagascar and Pakistan (for WNV.sE and WNV.EDIII cut-off), 88 positive samples from Japan (for WNV.sE and JEV.EDIII cut-off), and 59 positive sera from Austria (for TBEV.EDIII cut-off) (Table 2).

One low positive control for each bead was systematically included in every test and the fluorescence results obtained with WNV.sE, WNV.EDIII, JEV.EDIII, and TBEV.EDIII beads were normalised as the ratio of the sample MFI over the positive control MFI $\times 100$ (S/P ratio).

The cut-off for the TBEV.EDIII antigen was determined to be 61, generating a diagnostic sensitivity (Se) of 98.4% and a specificity (Sp) of 100% (Figure 3). The cut-off for the WNV.sE antigen was determined to be 17, with corresponding Se of 98.4% and Sp of 99.4%, while cut-off values for WNV.EDIII and JEV.EDIII antigens were found to be 54 and 55, respectively, with corresponding Se of 97.0 and 93.2% and corresponding Sp of 92.3 and 94.7% (Table 2).

According to ROC analysis, sera positive for flaviviruses belonging to the JEV serocomplex were detected with a higher specificity when WNV.sE beads were used rather than WNV.EDIII or JEV.EDIII beads. Consequently, to improve the specificity of the developed MIA for the diagnosis of

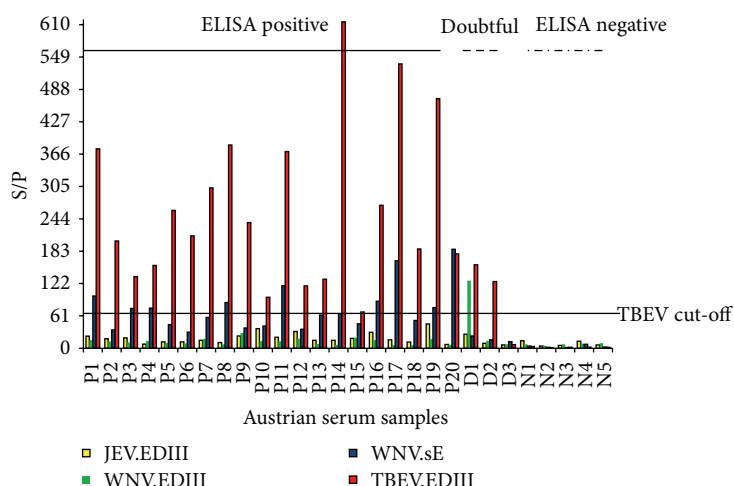


FIGURE 3: MIA fluorescence results, expressed as the ratio of the sample MFI over the positive control MFI X 100 (S/P ratio) on 20 ELISA positive (P), three doubtful (D), and five negative (N) horse samples from Austria, as determined with the ID Screen West Nile competition ELISA kit (ID Vet). The cut-off for the TBEV.EDIII antigen was determined to be 61.

flaviviruses in the JEV serocomplex, a decision algorithm was set up as follows: (1) an immune serum was considered to be positive for WNV or JEV antibodies only if it reacted with the WNV.sE antigen; (2) on the contrary an immune serum that did not recognize WNV.sE antigen was evaluated as a naive serum for both anti-WNV and JEV antibodies. Based on this algorithm, the impact of the lower specificity of WNV.EDIII ($Sp = 92.3\%$) and JEV.EDIII ($Sp = 94.7\%$) tests was reduced by the fact that false reactives with WNV.EDIII or JEV.EDIII were discarded if the WNV.sE signal was found to be negative.

Since TBEV belongs to another serocomplex, and the TBEV.EDIII test was highly specific ($Sp = 100\%$), a serum was considered positive for TBEV when the TBEV.EDIII MFI value was above the threshold.

Finally, taking into account possible cross-reactions between rEDIIIs due to partial rEDIII homology, a horse was considered infected with a specific flavivirus if the corresponding bead coupled to rEDIII generated an S/P ratio at least 1.5-fold greater than that generated with the other rEDIII beads. If a 1.5-fold difference could not be achieved, the sample was considered to be infected with an undetermined flavivirus. The sample was also considered positive for an undetermined flavivirus if it reacted with WNV.sE but not with any of the rEDIIIs.

3.3. Evaluation of the MIA on Experimental Sera. Sera sampled from experimentally infected horses (WNV1, WNV2, JEV, and TBEV) were analysed by flavivirus MIA and compared to flavivirus competition ELISA and WNV, JEV, and TBEV MNTs.

Flavivirus Detection. Given that the envelope E glycoprotein from WNV reacts to the antibodies directed at least against members of the JEV serocomplex of flaviviruses, the microspheres bearing the recombinant WNV.sE were more efficient in capturing early anti-WNV (lineage 1 and, to a lesser extent, lineage 2), anti-JEV, or anti-TBEV antibodies from infected

ponies than the respective rEDIII beads (Figure 4). Antibody detection in WNV-infected ponies could be evidenced as early as 8–11 days postinfection (PI), which was comparable to MNT (D8) and ELISA (D11) results. For JEV infection, the three serological assays, that is, WNV.sE MIA, ELISA, and MNT, achieved a comparable detection efficacy as early as 20 days PI (Table 3). In TBEV-infected animals, anti-TBEV antibodies were more efficiently evidenced by a TBEV MNT (D8) than by ELISA or WNV.sE MIA detection (D20). TBEV belongs to the mammalian tick-borne encephalitis group and the percentage of homology between TBEV and WNV.sE proteins is lower than 40% (calculated by NCBI, Blastp program) which can account for the delay in detecting anti-TBEV antibodies by WNV.sE ELISA and MIA. To improve the early detection of TBEV, a TBEV.sE bead could be added to the panel of beads.

Therefore, in a single assay, the WNV.sE-based MIA was found to be more sensitive than ELISA for the detection of WNV lineage 2 antibodies and as sensitive as ELISA for the early detection of WNV lineage 1, JEV, and TBEV antibodies.

Flavivirus Identification. As mentioned above, a TBEV.EDIII positive signal alone is sufficient to consider a horse infected with TBEV, while WNV.EDIII and JEV.EDIII positive signals can be considered to be due to WNV or JEV infections if the sera also reacted with the WNV.sE coupled microspheres.

WNV antibodies were specifically identified as early as D8 PI in the pony infected with WNV lineage 2, which meant earlier detection than with the WNV MNT (D14). Conversely, TBEV-, JEV- and WNV-specific antibodies, in the case of the pony infected with a lineage 1 WNV strain, were identified later by MIA than by MNT (D8 for MNT versus D35 for MIA considering TBEV- and WNV lineage 1-infected ponies and D35 for JEV identification with MNT versus no identification with MIA) (Figure 4 and Table 3).

This discrepancy in early specific detection by MNT and MIA could arise from differences in the rapidity and intensity

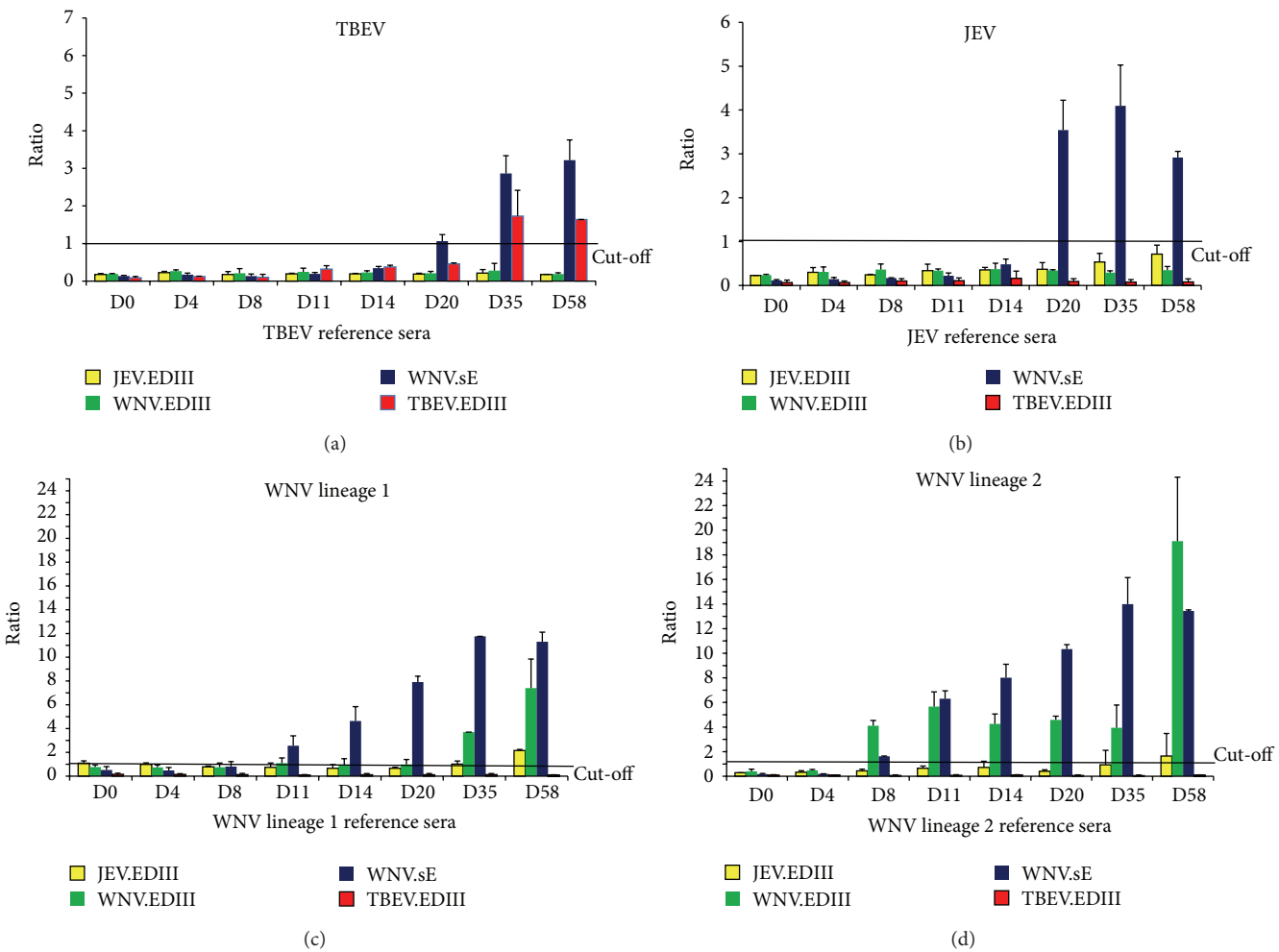


FIGURE 4: Reference equine sera sampled from ponies experimentally infected by different flaviviruses: TBEV (a), JEV (b), WNV lineage 1 (c), and WNV lineage 2 (d) collected on different days after infection and tested by flavivirus MIA with four antigen coupled beads (JEV.EDIII, WNV.EDIII, WNV.sE, and TBEV.EDIII). The mean and standard error of the S/P ratio of Ag “x” divided by the ROC cut-off value for Ag “x” is displayed. A sample was considered positive for the bead if its ratio was greater than one. The assay was carried out twice in separate experiments.

TABLE 3: Comparison of the earliest antibody detection using flavivirus ELISA, MIA, and VNT. Identification of specific WNV, JEV, or TBEV antibodies in reference sera sampled on days 0, 4, 8, 11, 14, 20, 35, and 58.

		ELISA	MIA		MNT	
		positive ⁽¹⁾	Positive for WNV.sE ⁽²⁾	Flavivirus identification ⁽³⁾	Positive ⁽⁴⁾	Flavivirus identification ⁽⁵⁾
Sera	WNV lineage 1	D11	D11	D35	D8	D14
	WNV lineage 2	D11	D8	D8	D8	D14
	JEV	D20	D20	Not achieved	D20	D35
	TBEV	D20	D20	D35	D8	D8

⁽¹⁾ ID Screen West Nile competition ELISA kit (ID Vet). Sample positive if %S/N ≤ 40%, doubtful if 40 ≤ %S/N < 50%, and negative if %S/N ≥ 50.

⁽²⁾ WNV.sE positive if S/P ratio > 17 for the WNV.sE bead.

⁽³⁾ WNV.EDIII identification if S/P ratio > 17 for the WNV.sE bead and S/P ratio > 54 for the WNV.EDIII bead. JEV.EDIII identification if S/P ratio > 17 for the WNV.sE bead and S/P ratio > 55 for the JEV.EDIII bead; TBEV.EDIII identification if S/P ratio > 61 for the TBEV.EDIII bead.

⁽⁴⁾ MNT positive if MNT titre ≥ threshold (10 for JEV and WNV and 20 for TBEV).

⁽⁵⁾ MNT identification of the flavivirus with the highest neutralisation capacity and at least a fourfold difference in titres.

of antibody response in the immunised ponies. Indeed, only the pony having received the lineage 2 WNV developed signs of infection, with an increase in body temperature of 2°C nine days after the injection (data not shown). The fact that the JEV Nakayama strain used for JEV infection was an attenuated vaccine strain can also account for poor sensitivity in identifying JEV antibodies with the JEV.EDIII bead. Finally, EDIII IgM antibodies detected soon after infection in model or naturally infected mammals [18] efficiently neutralise the virus in MNT but are not detected by our indirect IgG MIAs.

In conclusion, when used in a multiplex MIA format, rEDIIIs were able to specifically identify WNV and TBEV antibodies, particularly if sera were sampled after D20 PI. EDIIIs of each virus were shown to be specific to the targeted virus, with no cross-reactivity observed between rEDIII beads during TBEV infection and slight cross-reactivity between JEV.EDIII and WNV.EDIII beads on D58 with reference sera (Figure 4).

3.4. Evaluation of the MIA on Field Sera

WNV Survey. The study was based on sera sampled in countries (Pakistan and Madagascar) with a high prevalence of WNV infection.

Out of 101 sera positive with the ID Screen West Nile competition kit, 100 were found WNV.sE positive and one was WNV.sE negative with the flavivirus MIA. As regards binding of rEDIII beads on WNV.sE positive sera, 99 sera were found to bind WNV.EDIII, 53 JEV.EDIII, and 2 TBEV.EDIII. Concurrently, 99 sera neutralised WNV and 36 neutralised JEV during the MNT for WNV and JEV, respectively (Table 4). Cross-reactions were evidenced with both techniques and incited us to define rules for flavivirus differentiation.

By comparing the MFI of rEDIII beads and applying the rules defined in Section 3.2 (S/P ratio of WNV.EDIII at least 1.5-fold greater than S/P ratios of other rEDIII beads to be able to conclude that a WNV infection occurred), 96 sera were found WNV positive by MIA and four were undetermined. These results were similar to MNT results. The three negative MIA and MNT sera were low positive or doubtful in ELISA (% S/N = 38, 41, and 44, resp.).

To evaluate the specificity of the MIA on WNV negative samples, 104 sera sampled in 2007 in the Camargue region, Southern France, were added to the analysis [52]. This region is where French WNV cases had been previously reported in 2000 and 2004 but the tested sera were found negative by competition ELISA. One hundred and two sera were determined to be negative by the flavivirus MIA and two were found positive: one assigned as WNV positive and the other one positive for an undetermined flavivirus. These two discrepant results could be due to the generation of false positives by MIA or to MIA being more sensitive than ELISA. Interestingly, 56 other negative ELISA samples from Ireland—a country having never encountered WNV cases—also tested by MIA were all negative, supporting the second hypothesis.

In the case of our WNV serosurvey, the MIA offered sensitivity and specificity close to the ID Screen West Nile

competition ELISA (Se = 99.0% and Sp = 98.1%) for the detection of flavivirus antibodies and similar to WNV MNT for the identification of WNV antibodies (Se = 100%) (Table 5).

JEV Positive and Negative Sera from Japan. Of the one hundred and one sera collected from Japan healthy horses vaccinated against JEV, the sensitivities of flavivirus ELISA and MIA were comparable: 90 sera were found WNV.sE positive by MIA, while they were either positive (88) or doubtful (2) by ELISA, and 11 sera were found negative by both MIA and ELISA. Fewer JEV positive sera than sera from the WNV survey reacted with WNV.EDIII (29 reactors) and TBEV.EDIII (2 reactors) and cross-reactivity in MNT was also evidenced in 11 sera, found positive for WNV and JEV antibodies.

The JEV MNT was shown to be more sensitive than MIA, with 91 sera found positive by JEV MNT versus 82 by MIA (Tables 4 and 5). This result is in agreement with MIA's lower sensitivity value (93.2%) calculated by ROC analysis and highlighted with reference sera.

JEV.sE (Genbank FJ979830.1) and WNV.sE (AY033389.1) proteins have a percentage of amino acid homology of 77% (calculated by NCBI, Blastp program). With our decision scheme, a sample was considered flavivirus positive only if WNV.sE bound equine sera. To improve the MIA, it could be beneficial to add beads coupled to other flaviviral antigens and in particular to JEV.sE and to determine its cut-off through comparison with a sensitive IgG ELISA dedicated to the detection of Japanese encephalitis disease. The addition of JEV.EDIII beads of JEV genotypes other than genotype 3 could also be considered to improve the technique's sensitivity.

Interestingly, three samples which were WNV.EDIII positive by MIA were found positive for both JEV and WNV by MNT. These three samples presented higher WNV neutralising antibody titres than JEV titres, but the comparison of end-point titres and the fourfold difference rule was only applicable for one sample considered as WNV positive. The other two sera gave inconclusive results following MNTs. It turned out that these three samples originated from horses born in the USA, while the remaining 98 horses were born either in Japan (96), in France (1), or in Ireland (1) and consequently these three horses could present sustained anti-WNV antibodies response, testimony of past vaccination, or exposure to WNV in the USA.

Finally, flavivirus MIA and ELISA presented a similar sensitivity for the detection of flavivirus antibodies in JEV positive sera, while their sensitivity was weaker than JEV MNT. For sera found to be positive for flavivirus (WNV.sE) by MIA, the identification of JEV positive sera by MIA and a JEV MNT were consistent. The determination of MIA diagnostic Se and Sp should now be validated through a large screening study with horses living in countries with a high JEV prevalence.

Austrian TBEV Survey. Seventy-four sera collected in 2011 from horses in Austria and screened using flavivirus ELISA and WNV, USUV, and TBEV VNTs were tested with our new MIA technology [41].

TABLE 4: Comparison of the identification of circulating flaviviruses in equine field sera by three different techniques: flavivirus ELISA, MIA, and VNT.

Positive sera	Number of field sera	ELISA			MIA			Flavivirus identification		WNV pos.	JEV pos.		USUV pos.		TBEV pos.		VNT	
		ELISA pos.	ELISA doubt.	ELISA neg.	WNV.sE pos.	WNV.EDIII pos.	JEV.EDIII pos.	TBEV.EDIII pos.	Neg.								Neg.	Flavivirus identification
WNV	103: Pak. (68) + Mada. (35)	101	2	0	100	99	53	2	3	96	WNV positive	99	36	9/35 (Mada.)	NA*	4	96	WNV positive
JEV	101 (Japan)	88	2	II	90	29	87	2	II	4	Undetermined flavivirus	11	96	NA	NA	5	3	Undetermined flavivirus
										82	JEV positive							JEV positive
										3	WNV positive							WNV positive
										5	Undetermined flavivirus							Undetermined Flavivirus
TBEV	74 (Austria)	59	3	12	59	1	7	61	13	60	TBEV positive	3	NA	4	62	12	62	TBEV positive
										1	Undetermined flavivirus							
Negative sera	160 (Carnar-gue + Ireland)			160	2	16**	12**	0	158	158	Negative							
										2	WNV positive							

* Not analysed (NA).

** Positive sera evaluated as false reactives for JEV or WNV if WNV.sE signal was negative.

Bold italic: negative sample and italic: doubtful sample.

The thresholds for ELISA, MIA, and MNT were as defined in Table 3. In the event of cross-reaction with rEDIII beads during MIA, a horse was considered infected with a specific flavivirus if the corresponding bead coupled to rEDIII generated an S/P ratio at least 1.5-fold greater than that generated with the other rEDIII beads. In the event of cross-reaction with MNT, flavivirus identification is determined by the virus with the highest neutralisation capacity and at least a fourfold difference in titres.

TABLE 5: Comparison of Se and Sp for flavivirus MIA, ELISA, and VNT on horse field sera.

Virus identified	MIA/ELISA	MIA/VNT		Number of field sera tested
	Positive for WNV.sE/ELISA positive ^(*)	Positive for WNV.sE/VNT positive ^(*)	MIA identification/VNT identification ^(*)	
WNV	Se = 99.0% (100/101) Sp = 98.1% (102/104) ⁽¹⁾	Se = 100.0% (99/99)	Se = 100.0% (96/96)	207 sera from Pakistan (68) + Madagascar (35) + France (104)
JEV	Se = 100.0% (88/88) ⁽²⁾ Sp = 100.0% (11/11)	Se = 93.8% (90/96) Sp = 80.0% (4/5) ⁽³⁾	Se = 90.1% (82/91) ⁽⁴⁾	101 sera from Japan
	Positive for WNV.sE/ELISA positive ^(*)	Positive for TBEV.EDIII/VNT positive ^(**)	MIA identification/VNT identification ^(*)	
TBEV	Se = 100.0% (59/59) ⁽⁵⁾ Sp = 100.0% (12/12)	Se = 98.4% (61/62) Sp = 100.0% (12/12)	Se = 96.8% (60/62) ⁽⁶⁾ Sp = 100.0% (12/12)	74 sera from Austria

(*) Same thresholds as in Table 3.

(**) Positive for TBEV when the TBEV.EDIII MFI > 61.

(1) Two samples from the Camargue, France, were found positive by MIA but negative by ELISA.

(2) Two samples found doubtful by ELISA and positive by MIA were not taken into account for Se calculation (ELISA/MIA).

(3) One sample was found doubtful by ELISA, slightly positive by MIA with the WNV.sE bead, and negative by MNT.

(4) Three samples were identified as positive for WNV by MIA. One was also positive for WN by MNT while the other two were positive for an undetermined flavivirus.

(5) Three samples found doubtful by ELISA and positive (2) or negative (1) by MIA were not taken into account for Se calculation (ELISA/MIA).

(6) One undetermined sample by MIA due to TBEV.EDIII and WNV.EDIII reacting beads.

Of 74 sera considered for analysis, low cross-reactivity between the rEDIIIs was observed, with seven sera reacting with the JEV.EDIII bead and one serum with the WNV.EDIII bead.

When considering TBEV.EDIII beads only, 61 sera were found to be positive and 13 negative, while ELISA identified 59 positive and three doubtful results and TBEV MNTs found 62 positive results (Table 4). All negative MIA samples were also found negative by ELISA and TBEV MNT (Sp = 100%).

Three samples found doubtful by ELISA and positive using a TBEV PRNT were found negative (1 sample), TBEV positive (1 sample), or with an undetermined flavivirus status by MIA (1 sample). The undetermined flavivirus status in this last sample was due to TBEV.EDIII and WNV.EDIII reacting beads (Figure 3). However this sample tested negative for WNV by MNT.

With these 74 samples, MIA was shown to be as sensitive as ELISA (Se = 100%) and slightly less sensitive than TBEV VNT (Se = 98.4%) on TBEV positive horse sera (Table 5).

4. Conclusion

In the present study, we describe an innovative multiplexing immunoassay (MIA) based on the use of recombinant antigens from zoonotic flaviviruses potentially responsible for neurological diseases in horses. The flaviviral antigens were efficiently produced in S2 *Drosophila* cells and the

resulting purified milligrams of recombinant WNV.sE or flavivirus rEDIII proteins were used for reproducible binding to coloured microspheres. The beads covered with viral antigens led to the specific capture of antibodies directed against WNV, JEV, or TBEV in spite of the well-known antigenic cross-reactivity between these flaviviruses. The flavivirus MIA provided a rapid and reliable alternative to routine methods for flavivirus serological diagnosis. As previously mentioned, standardised diagnostic tests such as WNV ELISAs or IFAs suffer from a lack of specificity, so positive results should be further investigated using time-consuming VNTs which require BSL3 facilities. Within three hours, our MIA method identified IgG directed against neurotropic flaviviruses with a sensitivity and specificity equivalent to an ELISA followed by corresponding VNTs. For JEV, a lack of sensitivity was underlined in our study, but could probably be resolved by the addition of JEV antigens (JEV.sE or rEDIII from other JEV genotypes).

The identification of the main neutralising epitopes involved in neutralisation of TBEV, WNV, and JEV in EDIII stimulated its use as an antigen for serological diagnosis of flavivirus infections [53]. The use of flavivirus rEDIII proteins in ELISA as a tool to detect and differentiate flavivirus infections already proved successful for tick- and mosquito-borne flaviviruses (Langat virus and WNV) as well as for mosquito-borne flaviviruses belonging to different serocomplexes (WNV and Wesselsbron virus) [54]. Indirect ELISA

with WNV.EDIII was also shown to generate WNV-specific reactions with experimental sera from animals infected with flaviviruses of the same serocomplex (WNV, JEV, Saint Louis encephalitis, and Murray Valley encephalitis viruses) [20, 53]. However, in our hands, the OD signals produced by rEDIIIs ELISAs are not sufficiently dissimilar to differentiate the infecting flaviviruses when they belong to the same serocomplex, such as WNV and JEV. Moreover, the results of these rEDIIIs ELISAs usually need to be confirmed by a VNT to obtain accurate results [54]. By employing the multiplexing capacities of MIA, reactions in parallel and identical conditions could be easily compared and interpreted. In our study, MIA was shown to accurately identify TBEV, WNV, and JEV infections.

Several advantages plead in favour of the development and implementation of MIA technology in reference laboratories: not only does it remove the need for level 3 biocontainment conditions to confirm flavivirus infections, but it only requires a small quantity of sample (1 µL) and is very quick (<3 hours compared to 3–6 days for flavivirus VNTs).

In the future, other proteins could be added to the flavivirus MIA protocol to improve the serological diagnosis of flaviviruses as coupling nonstructural proteins (NS) such as NS1 or NS5 to differentiate vaccinated from naturally infected animals or to distinguish recent from old infections [55]. The detection of anti-flavivirus IgM as described in [36] is another promising approach. Finally, the development of species-independent MIAs for flaviviruses generally circulating in many different animal species would also be a valuable input.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank Eric Cardinal (CIRAD, CRVOI Reunion, France), Sophie Pradier (French Veterinary School of Toulouse, France), Muhammad Saqib (University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan), and Patrick Raleigh (Irish institute, Ireland) for providing diagnosis samples and D. Libby-Claybrough, professional translator and native English speaker, for editorial assistance. This study was supported by the EU Commission through DG SANCO funding (EU-RL on equine diseases) and was partially funded by EU Grants FP7-289364 Rapidia Field and FP7-613996 Vmerge project.

References

- [1] Z. Hubálek and J. Halouzka, "West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 5, no. 5, pp. 643–650, 1999.
- [2] J. Süss, "Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview," *Ticks and Tick-borne Diseases*, vol. 2, no. 1, pp. 2–15, 2011.
- [3] S. L. Hills and D. C. Phillips, "Past, present, and future of Japanese encephalitis," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 8, p. 1333, 2009.
- [4] M. G. Guzman, S. B. Halstead, H. Artsob et al., "Dengue: a continuing global threat," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 12, supplement, pp. S7–S16, 2010.
- [5] G. Kuno, G.-J. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos, and C. B. Cropp, "Phylogeny of the genus *Flavivirus*," *Journal of Virology*, vol. 72, no. 1, pp. 73–83, 1998.
- [6] C. Beck, M. A. Jimenez-Clavero, A. Leblond et al., "Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 10, no. 11, pp. 6049–6083, 2013.
- [7] A. T. de Madrid and J. S. Porterfield, "The flaviviruses (group B arboviruses): a cross neutralization study," *Journal of General Virology*, vol. 23, no. 1, pp. 91–96, 1974.
- [8] D. Ghosh and A. Basu, "Japanese encephalitis—a pathological and clinical perspective," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 9, article e437, 2009.
- [9] J. J. Sejvar, "Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection," *Viruses*, vol. 6, no. 2, pp. 606–623, 2014.
- [10] E. A. Gould, "Evolution of the Japanese encephalitis serocomplex viruses," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 267, pp. 391–404, 2002.
- [11] S. T. Sonleitner, J. Simeoni, R. Baumgartner et al., "The spreading of flaviviruses over the continental divide: a challenge for serological diagnostics," *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, vol. 3, article 002, 2013.
- [12] A. Papa, D. Karabaxoglou, and A. Kansouzidou, "Acute West Nile virus neuroinvasive infections: cross-reactivity with dengue virus and tick-borne encephalitis virus," *Journal of Medical Virology*, vol. 83, no. 10, pp. 1861–1865, 2011.
- [13] G. Dauphin and S. Zientara, "West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development," *Vaccine*, vol. 25, no. 30, pp. 5563–5576, 2007.
- [14] D. Nash, F. Mostashari, A. Fine et al., "The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999," *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 24, pp. 1807–1814, 2001.
- [15] M. Tamba, P. Bonilauri, R. Bellini et al., "Detection of usutu virus within a west nile virus surveillance program in northern Italy," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 11, no. 5, pp. 551–557, 2011.
- [16] A. Vázquez, M. Jiménez-Clavero, L. Franco et al., "Usutu virus: potential risk of human disease in Europe," *Eurosurveillance*, vol. 16, no. 31, 2011.
- [17] M. Calzolari, P. Gaibani, R. Bellini et al., "Mosquito, bird and human surveillance of west nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna region (Italy) in 2010," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, Article ID e38058, 2012.
- [18] T. Oliphant, G. E. Nybakken, S. K. Austin et al., "Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus," *Journal of Virology*, vol. 81, no. 21, pp. 11828–11839, 2007.
- [19] M. Lobigs and M. S. Diamond, "Feasibility of cross-protective vaccination against flaviviruses of the Japanese encephalitis serocomplex," *Expert Review of Vaccines*, vol. 11, no. 2, pp. 177–187, 2012.
- [20] D. W. C. Beasley, M. R. Holbrook, A. P. A. Travassos Da Rosa et al., "Use of a recombinant envelope protein subunit antigen

- for specific serological diagnosis of West Nile virus infection," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 6, pp. 2759–2765, 2004.
- [21] M. R. Holbrook, R. E. Shope, and A. D. T. Barrett, "Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 9, pp. 4101–4110, 2004.
- [22] D. Ludolfs, M. Niedrig, J. T. Paweska, and H. Schmitz, "Reverse ELISA for the detection of anti West Nile virus IgG antibodies in humans," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 26, no. 7, pp. 467–473, 2007.
- [23] S. Bhardwaj, M. Holbrook, R. E. Shope, A. D. T. Barrett, and S. J. Watowich, "Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 8, pp. 4002–4007, 2001.
- [24] J. J. H. Chu, R. Rajamanonmani, J. Li, R. Bhuvanankantham, J. Lescar, and M.-L. Ng, "Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein," *Journal of General Virology*, vol. 86, part 2, pp. 405–412, 2005.
- [25] M. D. Sánchez, T. C. Pierson, M. M. DeGrace et al., "The neutralizing antibody response against West Nile virus in naturally infected horses," *Virology*, vol. 359, no. 2, pp. 336–348, 2007.
- [26] T. Oliphant, M. Engle, G. E. Nybakken et al., "Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus," *Nature Medicine*, vol. 11, no. 5, pp. 522–530, 2005.
- [27] D. W. C. Beasley and A. D. T. Barrett, "Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein," *Journal of Virology*, vol. 76, no. 24, pp. 13097–13100, 2002.
- [28] G. E. Nybakken, T. Oliphant, S. Johnson, S. Burke, M. S. Diamond, and D. H. Fremont, "Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody," *Nature*, vol. 437, no. 7059, pp. 764–769, 2005.
- [29] W. M. P. B. Wahala, A. A. Kraus, L. B. Haymore, M. A. Accavitti-Loper, and A. M. de Silva, "Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody," *Virology*, vol. 392, no. 1, pp. 103–113, 2009.
- [30] P. Danecek, W. Lu, and C. H. Schein, "PCP consensus sequences of flaviviruses: correlating variance with vector competence and disease phenotype," *Journal of Molecular Biology*, vol. 396, no. 3, pp. 550–563, 2010.
- [31] G. Añez, R. Men, K. H. Eckels, and C.-J. Lai, "Passage of dengue virus type 4 vaccine candidates in fetal rhesus lung cells selects heparin-sensitive variants that result in loss of infectivity and immunogenicity in rhesus macaques," *Journal of Virology*, vol. 83, no. 20, pp. 10384–10394, 2009.
- [32] M. Nickells and T. J. Chambers, "Neuroadapted yellow fever virus 17D: determinants in the envelope protein govern neuroinvasiveness for SCID mice," *Journal of Virology*, vol. 77, no. 22, pp. 12232–12242, 2003.
- [33] C. W. Mandl, S. L. Allison, H. Holzmann, T. Meixner, and F. X. Heinz, "Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site," *Journal of Virology*, vol. 74, no. 20, pp. 9601–9609, 2000.
- [34] K. Hiramatsu, M. Tadano, R. Men, and C.-J. Lai, "Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence," *Virology*, vol. 224, no. 2, pp. 437–445, 1996.
- [35] F. J. van der Wal, R. P. Achterberg, S. M. de Boer et al., "Bead-based suspension array for simultaneous detection of antibodies against the Rift Valley fever virus nucleocapsid and Gn glycoprotein," *Journal of Virological Methods*, vol. 183, no. 2, pp. 99–105, 2012.
- [36] S. J. Wong, V. L. Demarest, R. H. Boyle et al., "Detection of human anti-flavivirus antibodies with a west nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 1, pp. 65–72, 2004.
- [37] T.-H. Chen, F. Lee, Y.-L. Lin et al., "Development of a Luminex assay for the detection of swine antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus," *Journal of Immunological Methods*, vol. 396, no. 1–2, pp. 87–95, 2013.
- [38] A. Sánchez-Matamoros, C. Beck, D. Kukiella et al., "Development of a microsphere-based immunoassay for serological detection of african horse sickness virus and comparison with other diagnostic techniques," *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015.
- [39] P. Koraka, H. Zeller, M. Niedrig, A. D. M. E. Osterhaus, and J. Groen, "Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA," *Microbes and Infection*, vol. 4, no. 12, pp. 1209–1215, 2002.
- [40] J. Hirota, H. Nishi, H. Matsuda, H. Tsunemitsu, and S. Shimizu, "Cross-reactivity of Japanese encephalitis virus-vaccinated horse sera in serodiagnosis of West Nile Virus," *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 72, no. 3, pp. 369–372, 2010.
- [41] J. O. Rushton, S. Lecollinet, Z. Hubálek, P. Svobodová, H. Lussy, and N. Nowotny, "Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 4, pp. 635–637, 2013.
- [42] C. Klaus, U. Hörügel, B. Hoffmann, and M. Beer, "Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations," *Veterinary Microbiology*, vol. 163, no. 3–4, pp. 368–372, 2013.
- [43] S. Šikutová, S. Hornok, Z. Hubálek, I. Doležálová, Z. Juřicová, and I. Rudolf, "Serological survey of domestic animals for tick-borne encephalitis and Bhanja viruses in northeastern Hungary," *Veterinary Microbiology*, vol. 135, no. 3–4, pp. 267–271, 2009.
- [44] A.-C. Bréhin, L. Rubrecht, M. E. Navarro-Sanchez et al., "Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein," *Virology*, vol. 371, no. 1, pp. 185–195, 2008.
- [45] M. Faresjö, "A useful guide for analysis of immune markers by fluorochrome (Luminex) technique," in *Cytokine Bioassays*, vol. 1172 of *Methods in Molecular Biology*, pp. 87–96, Springer, New York, NY, USA, 2014.
- [46] C. Klaus, U. Ziegler, D. Kalthoff, B. Hoffmann, and M. Beer, "Tick-borne encephalitis virus (TBEV)—findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera," *BMC Veterinary Research*, vol. 10, article 78, 2014.
- [47] A. Arnal, E. Gómez-Díaz, M. Cerdà-Cuellar et al., "Circulation of a Meaban-like virus in yellow-legged gulls and seabird ticks in the Western Mediterranean Basin," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Article ID e89601, 2014.

- [48] R. Bargaoui, S. Lecollinet, and R. Lancelot, "Mapping the serological prevalence rate of west nile Fever in equids, Tunisia," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 62, no. 1, pp. 55–66, 2015.
- [49] J. A. Farfán-Ale, B. J. Blitvich, N. L. Marlenee et al., "Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 74, no. 5, pp. 908–914, 2006.
- [50] J. Y. Yeh, J. H. Lee, J. Y. Park et al., "A diagnostic algorithm to serologically differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections and its validation in field surveillance of poultry and horses," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 12, no. 5, pp. 372–379, 2012.
- [51] A. Zohaib, M. Saqib, C. Beck, and et al, "High prevalence of West Nile virus in equines from the two provinces of Pakistan," *Epidemiology and Infection*, pp. 1–5, 2014.
- [52] S. Pradier, A. Sandoz, M. C. Paul et al., "Importance of wetlands management for West Nile Virus circulation risk, Camargue, Southern France," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 11, no. 8, pp. 7740–7754, 2014.
- [53] J. H. Chávez, J. R. Silva, A. A. Amarilla, and L. T. Moraes Figueiredo, "Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization," *Biologicals*, vol. 38, no. 6, pp. 613–618, 2010.
- [54] L. Mathengtheng and F. J. Burt, "Use of envelope domain III protein for detection and differentiation of flaviviruses in the Free State Province, South Africa," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 14, no. 4, pp. 261–271, 2014.
- [55] S. J. Wong, R. H. Boyle, V. L. Demarest et al., "Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 9, pp. 4217–4223, 2003.

3.1.1.2.2. Discussion et conclusion

Dans cet article nous avons décrit une méthode MIA innovante basée sur les antigènes recombinants, la sE du WNV et les EDIII des WNV, JEV et TBEV, pour le diagnostic de *flavivirus* zoonotiques, responsables de maladies neurologiques chez le cheval.

La production d'antigènes sur cellules de *Drosophila* S2 est importante (>2 mg/ml) et les antigènes obtenus sont reconnus spécifiquement par les sérums équins testés. De plus la grande pureté des antigènes obtenus par les systèmes d'expression en cellules S2 réduit les problèmes de bruit de fond souvent observés dans les tests immunologiques utilisant d'autres systèmes de production.

Avec les sérums de référence, l'identification d'une infection à *flavivirus* (bille WNV.sE) a été comparable entre ELISA de compétition et MIA. En revanche, la détection du *flavivirus* en cause au cours du temps a été plus tardive pour TBEV, WNV lignée 1 et JEV avec la méthode MIA comparativement à la méthode SNT. En particulier JEV n'a pas été identifié entre J4 et J58 avec la méthode MIA. Cette différence entre les 2 méthodes peut s'expliquer par l'intensité de la réponse immunitaire suite à l'épreuve expérimentale. En effet, seul le poney ayant été éprouvé avec le WNV lignée 2 a présenté des signes d'infection avec une augmentation de la température > à 2°C, 9 jours après l'infection (données non fournies). Le fait que la souche de JEV utilisée (souche Nakayama de génotype III ; code Genbank: EF571853) pour l'infection ne soit pas une souche de terrain récente peut expliquer l'induction de cette faible réponse immunitaire. Enfin la SNT détecte les IgM et IgG alors que notre méthode MIA, telle qu'elle est conçue, ne met en évidence que les IgG.

Hormis ce petit bémol, nous avons montré que les EDIII étaient capables de spécifiquement identifier, avec des réactions sérologiques croisées minimales, les anticorps WNV et TBEV pour des sérums de référence prélevés après J20.

Concernant les sérums de terrain, la méthode MIA nécessite un algorithme décisionnel du fait de réactions croisées résiduelles entre les billes (figure 31).

Avec les conditions détaillées dans le manuscrit, on obtient pour les sérums prélevés en zones d'endémie WNV, une sensibilité (Se) et spécificité (Sp) diagnostiques proches du kit ID Screen® West Nile competition, ID Vet (Se=99% et Sp=98,1%) pour la détection des anticorps anti-*flavivirus* et une sensibilité diagnostique identique à la SNT WNV pour l'identification (Se=100%) des anticorps anti-WNV.

Pour les sérums positifs et négatifs JEV, la méthode MIA offre une Se et Sp identiques à l'ELISA (Se=100% et Sp =100%) pour la détection des anticorps anti-*flavivirus* mais une sensibilité plus faible que la SNT (Se=90.1%) pour l'identification des anticorps anti-JEV.

Enfin pour les sérums terrains TBEV, la méthode est trouvée aussi sensible et spécifique que l'ELISA (Se et Sp=100%) et légèrement moins sensible que la SNT pour l'identification du *flavivirus* en cause (Se=96.8%, Sp=100%).

En conclusion, malgré les réactions sérologiques croisées qui sont la règle dans le diagnostic sérologique des *flavivirus*, cette méthode MIA permet en moins de 3 heures de correctement différencier les IgG dirigées contre les infections à WNV, JEV et TBEV avec une sensibilité et spécificité qui sont équivalentes à l'ELISA de compétition complétée d'une analyse de confirmation par SNT.

Rapidité et spécificité de la méthode et faible quantité de sérums nécessaire (1µl) rendent cette technique multiplexe très prometteuse pour la détection et la caractérisation des infections à *flavivirus* chez le cheval. Elle a en outre le mérite de pouvoir s'affranchir d'un travail en laboratoire de confinement de niveau 3 pour la confirmation des infections à *flavivirus*, à la différence de la SNT. L'ajout de nouveaux antigènes à la méthode (antigène USUV en priorité) serait une nouvelle étape intéressante pour avoir un kit de diagnostic des principaux *flavivirus* circulant en Europe.

La technique MIA est à l'heure actuelle systématiquement appliquée au laboratoire pour le diagnostic des *flavivirus* chez les chevaux. Elle permet de faire un « screening » rapide du *flavivirus* en cause et de s'assurer que la séroconversion observée n'est pas la conséquence de l'émergence d'un nouveau *flavivirus*. En effet comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, le cheval est un bon indicateur de la circulation du WNV dans une région mais son rôle de sentinelle pourrait être étendu à d'autres *flavivirus* qui sont de première importance en santé humaine.

3.1.1.2.3. Données complémentaires : faire face à l'émergence de nouveaux *flavivirus*

3.1.1.2.3.1. Contexte

En Septembre 2015, la DDPP de la Nouvelle-Calédonie, dans le cadre d'une demande d'évaluation de la situation sanitaire des équidés du territoire nous a fait parvenir 30 sérums équins trouvés positifs ou douteux avec le kit ELISA compétition West Nile (kit ID Screen® West Nile competition) afin de connaître le ou les *flavivirus* responsables d'une réaction sérologique positive.

Sur les 30 chevaux positifs, 18 étaient des chevaux locaux, 10 avaient été importés d'Australie, 1 de Nouvelle-Zélande et 1 de France.

Les sérums de Nouvelle-Calédonie ont été testés au laboratoire par la méthode MIA avec les antigènes WNV.sE, JEV.EDIII, WNV.EDIII et TBEV.EDIII (cf méthode manuscrit 3) avec les mêmes seuils

que décrits dans la publication (WNV.sE : seuil de 17, WNV.EDIII : seuil de 54, JEV.EDIII : seuil de 55 et TBEV.EDIII : seuil de 61) et le même algorithme décisionnel (cf ci-dessus).

Tous les sérums ont par ailleurs été testés en SNT contre JEV et WNV (cf méthode manuscrit 3).

3.1.1.2.3.2. Résultats

Les 30 sérums trouvés positifs avec l'ELISA ont été trouvés positifs en MIA avec la bille WNV.sE. Concernant les EDIII, 8 sérums ont été trouvés positifs avec JEV.EDIII et WNV.EDIII et 1 avec TBEV.EDIII. En appliquant l'arbre décisionnel défini ci-dessus, la technique MIA a permis de conclure à 3 sérums WNV positifs, 4 sérums JEV positifs et 23 sérums positifs pour des *flavivirus* non déterminés. Par méthode SNT, l'identification a donné 2 échantillons WNV positifs, 1 échantillon JEV positif et 27 échantillons positifs pour des *flavivirus* non déterminés (tableau 4). Les 4 résultats discordants en MIA et SNT (3 sérums trouvés JEV positifs et un sérum trouvé WNV positif en MIA seulement) reflètent un défaut de spécificité de la méthode MIA ou un manque de sensibilité de la SNT.

ELISA	MIA				Identification des <i>flavivirus</i> par MIA		SNT		Identification des <i>flavivirus</i> par SNT	
Sérums positifs en ELISA	WNV.sE positifs	WNV.EDIII positifs	JEV.EDIII positifs	TBEV.EDIII positifs			WNV pos	JEV pos		
30	30	8	8	1	3	WNV positifs	3	2	2	WNV positifs
					4	JEV positifs			1	JEV positif
					23	<i>Flavivirus</i> indéterminé			27	<i>Flavivirus</i> indéterminé

Tableau 4 : Identification des *flavivirus* circulant en Nouvelle-Calédonie par méthode MIA et SNT

Les 3 sérums trouvés positifs en SNT WNV ou JEV ont été prélevés sur des chevaux originaires d'Australie. Une vaccination antérieure contre le WNV et JEV ou une ancienne infection (KUNV et JEV) pourraient être à l'origine de ces sérologies positives.

Afin d'expliquer les plus de 75% (23/30) de résultats négatifs, une analyse préliminaire avec la technologie MIA a été effectuée à l'IP en utilisant les antigènes EDIII de DENV1, DENV2, DENV3 et ZIKV qui sont utilisés pour le diagnostic sérologique de ces maladies chez l'homme. N'ayant pas de sérums positifs équins contre les différents sérotypes de DENV et ZIKV, le seuil de positivité pour ces

antigènes a été déterminé par le calcul de la moyenne de la MFI des sérums négatifs +3 écarts types. Les résultats montraient que plus de 50% des sérums testés semblaient positifs en DENV1 et moins de 10% étaient positifs en ZIKV.

Une sélection de 15 sérums positifs avec le kit ELISA ID Screen® West Nile competition ainsi qu'en DENV1 ou ZIKV par MIA mais négatifs en WNV et JEV ont été envoyés au CNR Arbovirus (IRBA) pour recherche sérologique de DENV1 et ZIKV par SNT, ces deux *flavivirus* ayant été responsables en 2014 d'infections humaines sur l'île [331].

6 échantillons ont été trouvés positifs en DENV1 avec des titres en anticorps neutralisants entre 10 et > 40 et 3 animaux présentaient des sérologies DENV1 et ZIKV positives (Titres anti-ZIKV à 20 et anti-DENV1 à 10-20) pour les 3 échantillons (tableau 5).

Nombre de sérums	SNT			Bilan SNT
	WNV positifs	DENV1 positifs	ZIKV positifs	
15	0	9	3	6 DENV1 3 co-infections DENV1 et ZIKV

Tableau 5 : Bilan des analyses par séroneutralisation DENV1, ZIKV et WNV

Bilan réalisé sur 15 chevaux de Nouvelle-Calédonie positifs en ELISA ID Screen® West Nile competition mais négatifs en SNT WNV et JEV

Ces résultats sont intéressants car ils montrent :

1/ que le cheval peut être infecté par les virus DENV et ZIKV, plus probablement suite à la piqûre de moustiques *Aedes* infectés. Les moustiques du genre *Aedes*, reconnus comme majoritairement anthropophiles dans leurs préférences trophiques, surtout en ce qui concerne *Aedes aegypti*, peuvent ainsi se gorger sur d'autres vertébrés dont les chevaux [332-334].

2/ que la réplication virale est suffisante pour qu'il y ait une séroconversion détectable en MIA ou SNT chez les animaux infectés.

Concernant les sérums négatifs en WNV, DENV1, JEV et ZIKV, l'infection par d'autres sérotypes de DENV (comme DENV3) ou d'autres *flavivirus* apparentés comme MVEV décrits dans cette région du monde pourraient expliquer ces réponses ELISA positives.

3/ Sur les 9 chevaux positifs en DENV1, 7 étaient originaires de Nouvelle-Calédonie et 2 originaires d'Australie (date d'importation sur l'île inconnue). Pour les chevaux trouvés co-infectés ZIKV et DENV1, un cheval était originaire de Nouvelle-Calédonie et 2 d'Australie où aucun cas autochtone de ZIKV n'a pour l'instant été diagnostiqué. On peut donc suspecter que ces chevaux ont été infectés localement.

La prochaine étape serait de comparer en Nouvelle-Calédonie le taux de séroprévalence du cheval pour les virus DENV et ZIKV à celui de l'homme afin de savoir si cette espèce pourrait être utilisée comme sentinelle de l'infection de ces différents *flavivirus*.

3.1.1.2.3.3. Discussion et conclusion

La méthode MIA montre dans cet exemple l'aide significative qu'elle peut apporter à la détection d'un *flavivirus* émergent. En effet, lors d'enquêtes séro-épidémiologiques sur les chevaux, l'absence de fixation des sérums sur les EDIII des *flavivirus* circulants classiquement en Europe a permis de suspecter l'existence de réactions sérologiques associées à l'infection par d'autres *flavivirus*.

L'IP a synthétisé des antigènes EDIII recombinants (protocole décrit dans le manuscrit n°3) contre les 4 sérotypes de DENV et le ZIKV, antigènes utilisés et validés pour la caractérisation des infections à *flavivirus* chez l'homme avec la technologie MIA [335]. L'ajout de ces nouveaux antigènes à notre technologie « MIA *flavivirus* cheval » permettrait d'améliorer la surveillance chez les équidés des *flavivirus* de première importance en santé vétérinaire et en santé publique.

Nous allons maintenant nous intéresser au LIV, *flavivirus* présent depuis très longtemps en Europe et qui, s'il suscite moins d'intérêt que le TBEV, est responsable d'encéphalites chez les petits ruminants mais aussi parfois chez le cheval [119], les bovins et l'homme (cf. 1.2.2.2).

3.1.1.3. Outils de diagnostic sérologique multiplexe : application de la méthode MIA au sérodiagnostic du LIV chez les ovins

Nous avons produit au laboratoire, lors du stage Master 2 d'Audrey Gabassi, les EDIII des virus BAGV (antigène qui n'a pu jusqu'à présent être testé faute de sérums positifs anti-BAGV) et LIV suivant une

technique de production en système *Drosophila* S2 transmise aimablement par l'équipe de Philippe Desprès (brevet WO 2012/076715 A1) [336] et décrite brièvement dans le manuscrit 3.

3.1.1.3.1. Matériel et méthodes

3.1.1.3.1.1. Production des protéines recombinantes LIV et BAGV

a. Cellules

- Les plasmides d'intérêt, portant un gène de résistance à l'ampicilline, ont été clonés et amplifiés en **bactéries thermo-compétentes DH5α** (Invitrogen)

- **La lignée cellulaire S2** (Invitrogen) est une lignée cellulaire continue dérivée d'une culture primaire d'embryons de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972). Les cellules S2 ont été cultivées à 28 °C sans CO₂ dans des flasks 25cm² pour culture cellulaire, en milieu Schneider Drosophila Medium (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) et un mélange antibactérien et antifongique (Antibacterian-Antimycotic solution 100X, Sigma).

b. Gènes synthétiques

Des gènes synthétiques correspondant aux EDIII de souches virales de BAGV et LIV isolées récemment en Europe sur des espèces sensibles à l'infection viral ont été obtenus auprès de Genecust (tableau 6).

	Isolement	Code GenBank	Nucléotides pour la synthèse d'EDIII
Bagaza (BAGV)	Perdrix, Espagne 2010	HQ644143.1	1865 à 2143
Louping ill (LIV)	Agneau, Angleterre 2009	KF056331.1	1905 à 2153

Tableau 6 : Souches choisies pour la synthèse des EDIII des virus BAGV et LIV.

Pour le BAGV, la souche retenue a été isolée sur une perdrix à Cadix dans le Sud-Ouest de l'Espagne en 2010 (code Genbank HQ644143.1). Le LIV a été isolé à Penrith (Cumbria, Angleterre) sur un agneau en 2009 (code GenBank KF056331.1).

Les sites de restriction reconnus par les endonucléases AgeI (A'CCGGT) et BssHII (G'CGCGC) ont été introduits en amont et en aval respectivement du gène synthétique EDIII.

c. Plasmides et constructions plasmidiques

Les plasmides de clonage pUC57 contenant les gènes synthétiques des séquences modifiées ont été obtenus auprès de la société GeneCust (GeneCust Europe, Luxembourg). Le plasmide pUC57 (GenScript) est un vecteur commercial couramment utilisé pour la réalisation de clonages en système bactérien. Il contient un gène de résistance à l'ampicilline, ainsi qu'un site de clonage multiple inséré dans la région 5' du gène rapporteur codant la β -galactosidase.

Le plasmide pMT/BiP/SNAP receveur a été aimablement fourni par l'IP. Il est constitué du promoteur de la métallothionéine (pMT), de la séquence signal BiP (18AA), de la séquence SNAP (190AA) ainsi que du site de restriction BssHII ajoutés en aval de la séquence BiP. Il permet l'expression inductible de protéines recombinantes et leur sécrétion dans le surnageant de culture grâce à la présence du gène d'insecte BiP. L'expression du gène d'intérêt est sous contrôle d'un promoteur inductible au chlorure de cadmium (CdCl_2) (figure 32). La cassette d'expression comprend la séquence BiP, un site de clonage multiple pour l'insertion du gène d'intérêt, suivi d'une séquence codant une étiquette hexahistidine (6 résidus histidine) pour la purification des protéines chimériques recombinantes à l'aide d'une résine chélatrice de Nickel (Ni^{2+}).

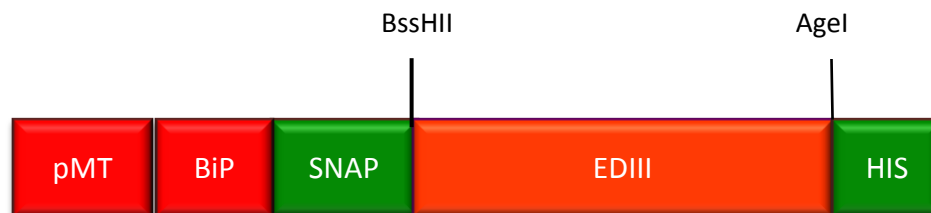


Figure 32: Représentation schématique du plasmide vecteur.

pMT : promoteur inductible aux métaux lourds ; BiP : protéine chaperonne avec un signal d'adressage pour la sécrétion dans le milieu extérieur ; SNAP : étiquette ; BssHII et Age I : enzymes de restriction ; HIS : Etiquette hexahistidine

d. Clonage des séquences d'intérêt

Les gènes synthétiques codant les EDIII de BAGV et LIV ont été insérés en aval de la séquence du domaine SNAP, entre les sites de restriction BssHII et AgeI du plasmide pMT/BiP/SNAP.

2 μg des plasmides pUC57-EDIII et 2 μg du plasmide receveur pMT/BiP/SNAP ont été digérés avec les enzymes BssHII et AgeI dans du tampon 1.1 (New England Biolabs) à 37°C pendant une heure. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à faible point de fusion (Invitrogen) concentré à 1% a ensuite été réalisée (100 Volts, 45 minutes) afin de récupérer après migration les fragments correspondant aux

inserts (environ 300 pb) ainsi que la bande du plasmide receveur correspondant au plasmide pMT/BiP/SNAP ouvert et sans insert (4061 pb). Chaque bande a été découpée du gel puis purifiée en suivant le protocole du kit fournisseur QIAquick gel extraction (Qiagen).

Une fois les ADN purifiés, une ligation a été réalisée entre 25ng des inserts LIV.EDIII ou BAGV.EDIII et 50 ng de plasmide receveur pMT/BiP/SNAP, avec 5 µl de sticky end ligase master mix (New England Biolabs). Des bactéries thermo-compétentes Dh5α ont été transformées avec les plasmides pMT-BiP-SNAP-BAGV.EDIII et pMT-BiP-SNAP-LIV.EDIII. Les bactéries qui se sont développées sur gélose solide LB + ampicilline grâce au gène de résistance à l'ampicilline contenu dans le plasmide pMT-BiP-SNAP-BAGV.EDIII ou pMT-BiP-SNAP-LIV.EDIII ont été repiquées sur milieu liquide LB + ampicilline (Sigma-Aldrich) (1 colonie/tube). Les plasmides ont ensuite été purifiés en suivant le protocole du kit «nucleospin plasmid DNA purification kit» (Macherey-Nagel). Les plasmides obtenus après purification ont été vérifiés par digestion enzymatique (PstI pour BAGV et BamHI pour LIV) en ayant pris soin de choisir un site de restriction localisé au sein d'EDIII. La taille des produits de digestion obtenus a été contrôlée par migration sur gel d'agarose 1%. Un séquençage de la séquence insérée a également été réalisé.

e. Transfection *in vitro* en cellules de drosophiles

La transfection de cellules de drosophile S2 par les plasmides pMT-BiP-SNAP-BAGV.EDIII ou pMT-BiP-SNAP-LIV.EDIII a été réalisée selon le protocole établi par l'Institut Pasteur.

Des lignées stables, exprimant la protéine d'intérêt, peuvent être générées en 3 à 4 semaines en co-transfectant les cellules S2 avec le vecteur d'expression et un vecteur de sélection, pCOBlast, contenant le gène de résistance à la blasticidine. Les cellules S2 ont étéensemencées en plaques 6 puits en milieu de culture Schneider supplémenté avec 10 % de SVF, à raison de 3×10^6 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été co-transfectées par 2 µg d'ADN plasmidique et 0,1 µg de pCOBlast en présence des transfectants du kit Effectene (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. Après 24 h d'incubation à 28 °C, le milieu de culture a été changé. Au jour J4 après transfection, la blasticidine a été ajoutée à une concentration finale de 25 µg/ml dans le milieu de culture des puits, afin de sélectionner les cellules transfectées. Les cellules transfectées ont ensuite été passées 2 fois par semaine en flasks 25cm² pendant 3 semaines dans du milieu Schneider avec 10 % SVF contenant 25 µg/ml de blasticidine. Au 7ème passage, les cellules ont été resuspendues dans du milieu Schneider sans SVF, contenant 5 µM de chlorure de cadmium (CdCl₂) afin d'induire l'expression des protéines recombinantes. Après 10 jours d'induction par le cadmium, le milieu extracellulaire des cellules S2 transfectées contenant les protéines accumulées a été prélevé et congelé à -80 °C (figure 33).

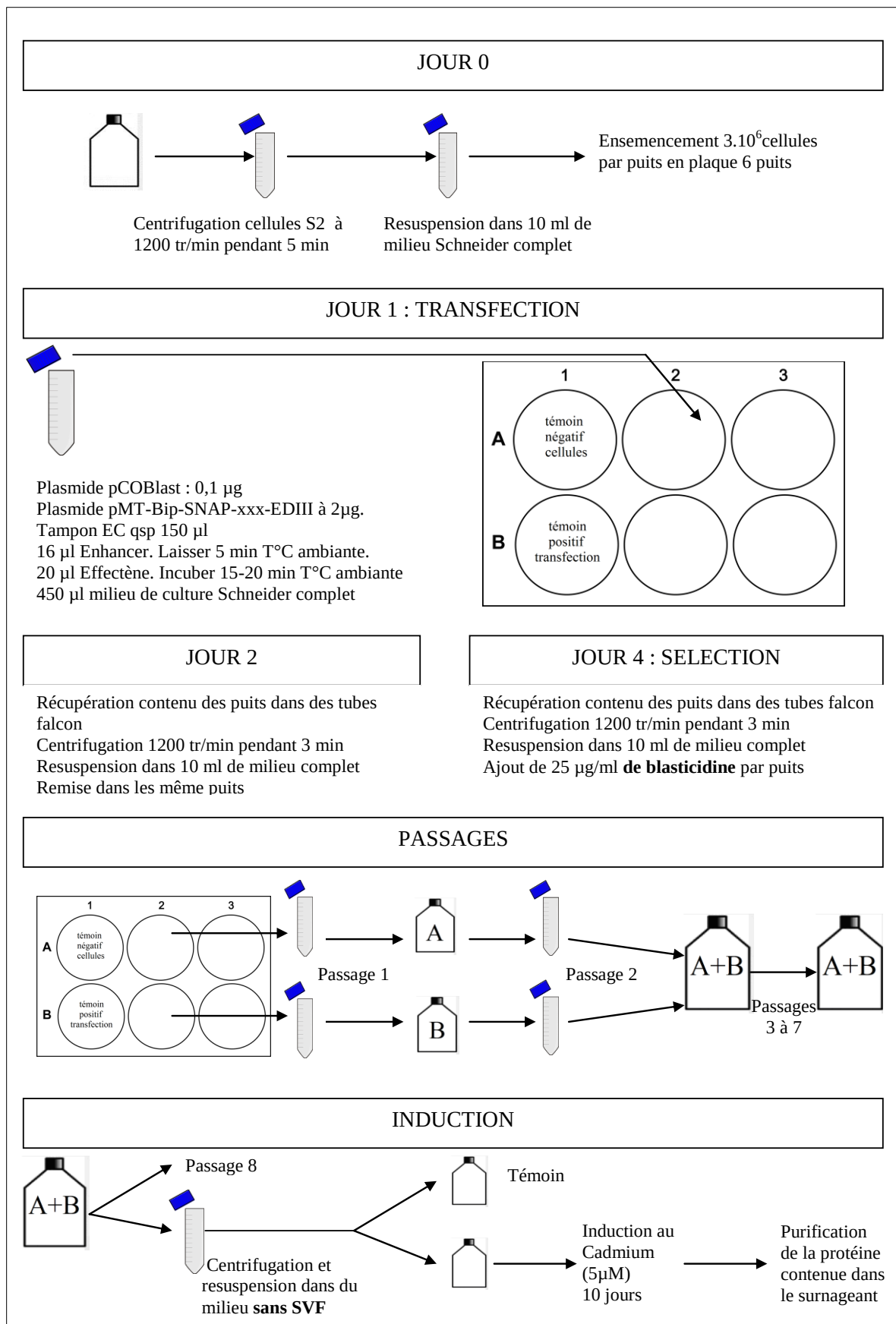


Figure 33 : Schéma de la transfection des plasmides d'intérêt en cellules de drosophile S2 (Audrey Gabassi)

f. Concentration et purification des antigènes recombinants

L'expression de la protéine d'intérêt a été recherchée par analyse Western Blot à partir d'une fraction du milieu extracellulaire sur un gel SDS-Page (Biorad) contenant 12% de polyacrylamide. 30 µl de chacun des surnageants de cellules S2 transfectées et obtenus après 10 jours d'induction a été mis en contact avec du bleu de Laemmli 4x (Biorad) et 5% de β-mercaptoéthanol (Biorad). L'ensemble a été dénaturé 5 minutes à 95°C avant d'être déposé sur le gel. Après migration, le gel a été transféré sur membrane en condition semi-liquide durant 30 minutes (Trans-Blot-Turbo, Biorad) puis une saturation de la membrane durant 1 heure à température ambiante par du PBS-Tween 0,05%-lait 5% a été effectuée avant incubation pendant une heure à température ambiante avec 5ml d'anticorps primaire de souris anti-Histidine (Invitrogen) dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,05%-lait 5%. Après incubation, 3 lavages successifs de 5 minutes avec 5 ml de PBS-Tween 0,05% ont été nécessaires avant incubation pendant une heure à température ambiante avec 5ml d'anticorps secondaire de lapin anti-souris HRP (Dako) dilué à 1/5000 dans du PBS-Tween 0,05%-lait 5%. Après 3 nouveaux lavages pendant 5 minutes avec 5 ml de PBS-Tween 0,05%, 2ml d'ECL contenant 0,5 µl de H2O2 (Sigma) ont été déposés sur la membrane à l'obscurité durant 5 minutes avant lecture dans le lecteur de chimioluminescence Fusion (Vilver).

Une fois la présence des protéines visualisée, à un poids moléculaire attendu, le reste du surnageant a été transmis à la plateforme PF5 de l'IP pour purification.

3.1.1.3.1.2. Sérums terrains

35 sérums d'ovins positifs en Ig totales anti-LIV et 20 sérums d'ovins négatifs (sérologies réalisées par technique HIT) nous ont été gracieusement envoyés par Mara Rocchi (Moredun Research Institute, Scotland, UK) pour comparaison des résultats HIT avec la méthode MIA.

3.1.1.3.1.3. Méthode MIA

Les conditions de la méthode MIA LIV sont principalement celles décrites dans le manuscrit 3. Les analyses étant dans un premier temps réalisées sur sérums ovins, un anticorps biotinylé de lapin anti-IgG ovines (Jackson Immuno Research) a été utilisé dilué au 1/500.

Les différents antigènes couplés aux billes étaient respectivement WNV.sE (bille 53), WNV.EDIII (bille 65), JEV.EDIII (bille 46), LIV.EDIII (bille 29) et TBEV.EDIII (bille 34).

3.1.1.3.1.4. Méthode ELISA

Les sérums ovins ont été testés par ELISA compétition en utilisant le kit commercial ID Screen® West Nile compétition (ID Vet) pour la détection des anticorps contre le WNV et les *flavivirus* apparentés.

L'essai a été réalisé suivant les instructions du fabricant. Le seuil de positivité pour cet ELISA de compétition était % S/N < 40% et les sérums étaient considérés comme douteux pour $40 \leq \% S/N < 50\%$ comme recommandé par le fabricant.

3.1.1.3.2. Résultats

3.1.1.3.2.1. Expression et purification des protéines recombinantes

a. Expression des protéines recombinantes

Toutes les protéines chimériques (« SNAP-antigène viral ») ont été fusionnées dans leur région N-terminale au peptide signal BiP, induisant la sécrétion dans le milieu extracellulaire des protéines exprimées. Les surnageants prélevés ont d'une part été envoyés à l'Institut Pasteur pour que chaque protéine soit purifiée et d'autre part testés en parallèle à l'UMR de Virologie en Western Blot avec un anticorps anti-Histidine pour vérifier la présence de la protéine. Les résultats sont présentés figure 34. Une unique bande, correspondant à une protéine de poids moléculaire compris entre 25 et 37 kDa, a été observée pour les puits 1 BAGV.EDIII et 3 LIV.EDIII. Aucune bande n'était visible sur les puits témoins 2 et 4 non induits. En conclusion les protéines EDIII des virus BAGV et LIV ont été produites avec succès, après induction de leur synthèse dans le surnageant des cellules S2.

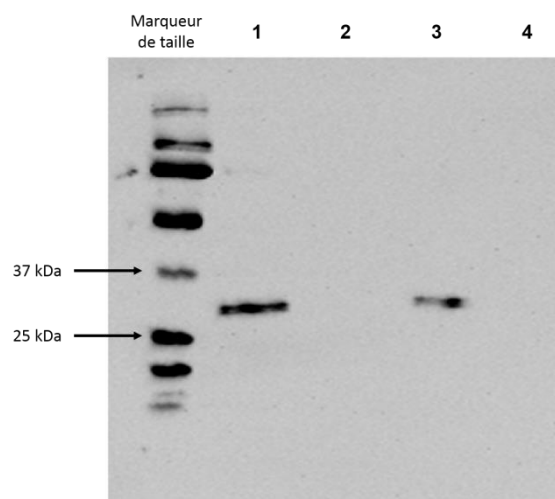


Figure 34 : Vérification de la production des protéines SNAP-BAGV.EDIII et SNAP-LIV.EDIII par Western-Blot. Marqueur de taille. 1. SNAP-BAGV.EDIII induite, 2. SNAP-BAGV.EDIII témoin 3.SNAP-LIV.EDIII induite 4. SNAP-LIV.EDIII témoin

b. Purification et dosage des protéines

Les surnageants induits contenant les protéines SNAP-BAGV.EDIII et SNAP-LIV.EDIII ont été transmis à la plateforme PF5 de production et de purification de protéines recombinantes en cellules eucaryotes de l'IP. Après concentration et purification des protéines sécrétées par les cellules, la pureté des fractions protéiques récoltées a été vérifiée à l'IP par migration dans un gel à gradient de polyacrylamide (figure 35).

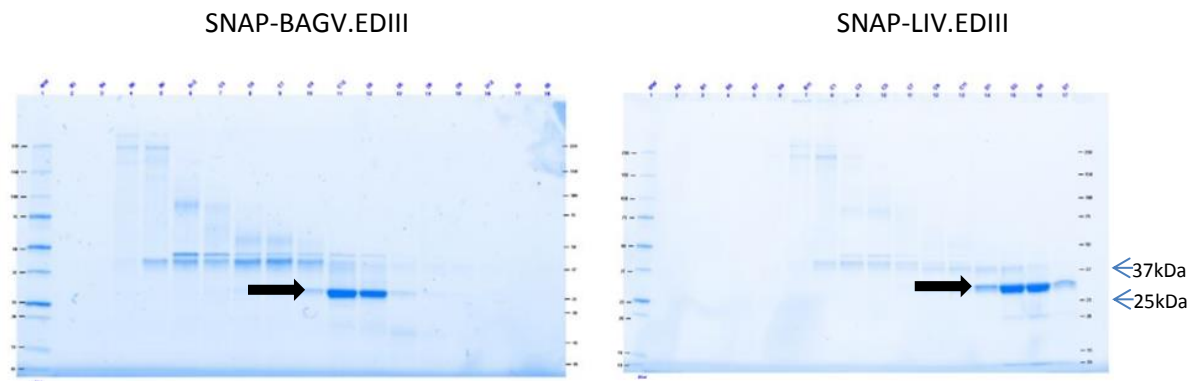


Figure 35 : Compte rendu de la purification des protéines recombinantes établi par la plateforme PF5 de l'IP Electrophorèse sur gel dénaturant à gradient de polyacrylamide de 4 à 15% (Mini-PROTEAN® TGX StainFree™ precast gel, Bio-Rad) des protéines recombinantes préalablement purifiées sur colonne d'affinité. Le marqueur de poids moléculaire des protéines est situé à gauche, le poids des protéines de référence est indiqué en kDa. La flèche noire indique la position des protéines purifiées à la taille attendue.

Les concentrations en protéines purifiées des fractions variaient entre 0.2 mg/ml pour SNAP-LIV.EDIII et 0.32mg/ml pour SNAP-BAGV.EDIII ce qui correspond à des concentrations modestes pour le système de production S2.

3.1.1.3.2.2. Utilisation de la méthode MIA pour le diagnostic LIV

1. Détermination du seuil de positivité

Les seuils de positivité pour l'antigène LIV-EDIII et WNV.sE ont été déterminés par analyse des courbes ROC sur les 68 sérums ovins trouvés positifs et négatifs par méthode HIT pour le LIV.

Le seuil de positivité pour la bille LIV-EDIII a été déterminé à **462** (Se : 91.4% et Sp de 81.8%) et le seuil de positivité pour la bille WNV.sE a été déterminé à **2197** (Se : 91.4% et Sp : 90.9%) (figure 36)

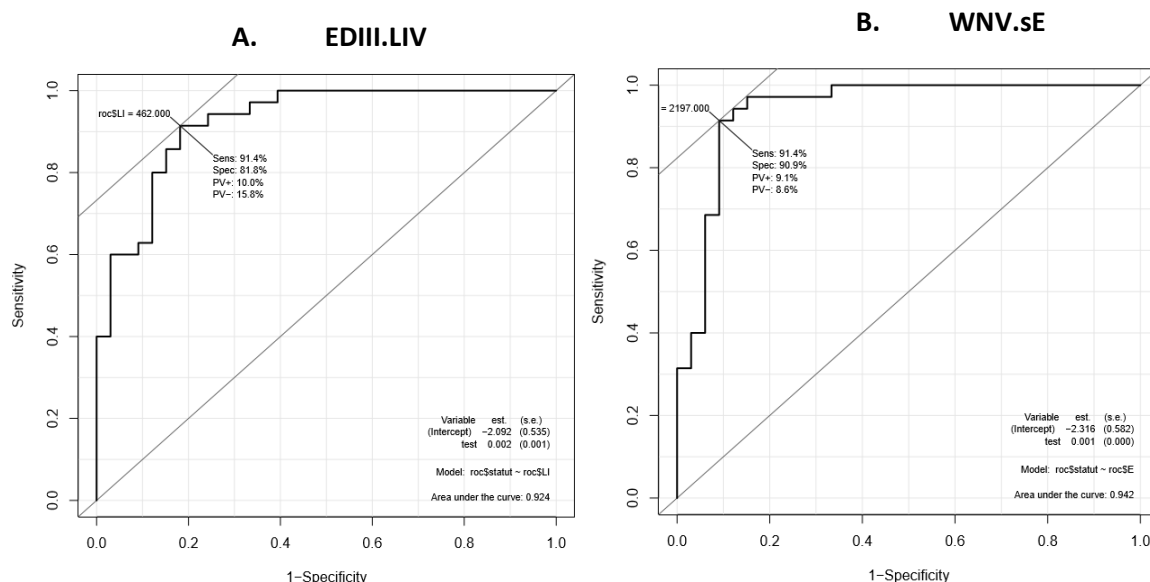


Figure 36 : Courbes ROC calculées pour la détection d'anticorps spécifiques de LIV par méthode MIA dans les sérums ovins précaractérisés en HIT.

(A) Courbe ROC pour la recherche d'IgG spécifiques de EDIII de LIV. (B) Courbe ROC pour la recherche d'IgG reconnaissant la glycoprotéine WNV.sE (tous flavivirus)

Le seuil de positivité pour les autres billes WNV.EDIII, JEV.EDIII et TBEV.EDIII n'ont pu être déterminés par cette méthode du fait de l'absence de sérums positifs ovins pour les virus WNV, JEV et TBEV. Le seuil de positivité pour ces antigènes a donc été déterminé par le calcul de la moyenne de la MFI des négatifs +3 écarts types ce qui donne : JEV : seuil **480** ; WNV : seuil de **706** et TBEV : seuil **1835**.

2. Evaluation de la méthode MIA sur sérums ovins

✓ Détection des *flavivirus*

Comme décrit dans le manuscrit 3, WNV.sE porte de nombreux épitopes commun au genre *flavivirus* et permet la mise en évidence des IgG dirigées contre la glycoprotéine E des *flavivirus* des sérocomplexes de l'encéphalite japonaise ou de l'encéphalite à tique (LIV faisant partie de ce dernier sérocomplexe).

En appliquant les différents seuils calculés ci-dessus, il a été observé que la bille WN.sE génère des résultats comparables à l'ELISA de compétition, à savoir 34 sérums positifs en ELISA et MIA (bille WNV.sE) versus 35 en HIT et respectivement 7 et 6 sérums trouvés positifs en ELISA et MIA et négatifs en HIT (tableau 6).

✓ Identification du *flavivirus* en cause.

32 sérums sur les 35 positifs en HIT ont été trouvés positifs avec la bille LIV.EDIII, 23 avec la bille TBEV, 0 avec la bille WNV.EDIII et 2 avec la bille JEV.EDIII (avec une valeur proche du seuil calculé

pour cette bille). 7 sérums, qui correspondaient aux sérums positifs en ELISA ainsi que pour 6 d'entre eux à la bille WNV.sE positive, ont été trouvés positifs avec la bille LIV.EDIII mais négatifs en HIT (cf. tableau 7).

	Nb sérums	ELISA Positifs ou douteux	MIA				
			JEV.EDIII Positifs	WNV.EDIII positifs	WNV.sE positifs	TBEV.EDIII positifs	LIV.EDIII positifs
HIT LIV Positif	35	34	2	0	34	23	32
HIT LIV négatif	33	7	1	1	6	1	7

Tableau 7: Identification d'anticorps ovins anti-LIV par 3 techniques différentes (HIT LIV, ELISA compétition (ID Screen® West Nile competition kit) et MIA LIV)

3.1.1.3.3. Discussion et conclusion

La méthode MIA permet la distinction entre les anticorps dirigés contre le LIV et ceux dirigés contre les *flavivirus* du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise avec une bonne sensibilité (Se=91.4%).

Avec cette méthode, 7 sérums ont été trouvés positifs avec la bille LIV.EDIII (sérums trouvés également positifs en ELISA) mais négatifs en HIT. Ce résultat peut souligner un manque de spécificité ou une plus grande sensibilité de la technique MIA LIV et ELISA par rapport à l'HIT. En effet il nous a été précisé lors de l'envoi des sérums que les échantillons trouvés positifs en HIT à la première dilution (1/10) étaient considérés négatifs pour prendre en compte les réactions aspécifiques du sérum avec les globules rouges. L'analyse de la spécificité de la technique MIA devrait donc être validée sur des sérums négatifs provenant de pays indemne de LIV. Ainsi la question de savoir si la technique MIA offre une meilleure sensibilité ou souffre à l'inverse d'un manque de spécificité ne peut être ici tranchée.

Les virus LIV et TBEV appartiennent au même sérocomplexe de l'encéphalite à tique et peuvent induire des réactions sérologiques croisées. On observe que 23/32 sérums positifs en HIT LIV ont une réaction positive à la fois aux antigènes TBEV.EDIII et LIV.EDIII (tableau 7). Cette constatation n'est pas surprenante quand on calcule l'homologie de séquences en acide aminé (AA) des deux domaines

TBEV.EDIII et LIV.EDIII (calculs réalisés à l'aide du programme NCBI Blastp). L'alignement des séquences des EDIII de *flavivirus* montre une identité en AA de 39% entre WNV souche Is98 (ou JEV souche Nakayama) et LIV (souche tableau 6) et à l'inverse de 93% entre TBEV et LIV (souches tableau 6). Cette forte homologie de séquences entre TBEV.EDIII et LIV.EDIII est en accord avec les données de la bibliographie qui considère le LIV comme un sous type de TBEV et non comme un virus différent (cf. 1.2.2.2).

En conclusion la méthode MIA permet une bonne distinction entre les réactions sérologiques induites par les virus appartenant au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise et celles dirigées contre les virus des encéphalites à tique mais les réponses sérologiques anti-LIV et TBEV ne peuvent être distinguées sur la seule base de la caractérisation des anticorps anti-EDIII par MIA, les domaines protéiques des virus LIV et TBEV étant très proches génétiquement. La méthode MIA permet donc de d'établir une première classification des réactions sérologiques observées pour les sérums provenant d'infection par les virus des encéphalites à tique. Cependant une validation par une SNT LIV et TBEV est nécessaire pour identifier le virus en cause.

Dans cette première partie, nous nous sommes attachés à différencier les réactions sérologiques induites après infections naturelle par des *flavivirus* circulant en Europe ou à risque d'émergence sur le continent.

Cependant, un autre défi du diagnostic sérologique des infections à *flavivirus* consiste en la différenciation entre les anticorps produits suite à une infection à *flavivirus* de ceux marqueurs d'une vaccination. Cette distinction est très importante dans le cas de la surveillance WNV, car le cheval est une sentinelle de l'infection, les cas neurologiques équins précédant souvent les cas humains. Le recours fréquent à la vaccination des équidés contre le WNV peut donc gêner la surveillance WNV si la distinction entre anticorps vaccinaux et non vaccinaux ne peut être faite.

Dans cette dernière partie de notre volet diagnostic, nous avons mis en place un test DIVA pour le WNV. Ce test a été évalué à partir de sérums prélevés en 2016 sur des chevaux de la région Camargue, région qui a connu une épizootie de WNV en 2015, et en ciblant particulièrement les écuries ayant vacciné contre le WNV suite à cette épizootie.

3.1.1.4. Approche sérologique multiplexe pour la mise en place d'un diagnostic DIVA

3.1.1.4.1. Contexte

La France a fait face en 2015 à une intense circulation du WNV dans la population équine en région Camargue. Entre août et octobre 2015, 72 cas suspects (chevaux avec des signes neurologiques) ont été comptabilisés en Camargue, conduisant à la confirmation de 41 cas de WNND et à 31 cas

infirmés. 3 formes fébriles et 5 infections asymptomatiques ont par ailleurs été diagnostiquées, provenant soit du dépistage systématique organisé sur les équidés des premiers foyers ou d'enquêtes rétrospectives aux alentours des foyers. De plus une forme fébrile humaine a été diagnostiquée dans la ville de Nîmes [135].

Suite à cette épizootie, un consortium pluridisciplinaire regroupant des scientifiques de l'INRA, des écoles vétérinaires (VetAgroSup et Toulouse), de l'ANSES, du Labéo Frank Duncombe a réalisé une enquête sérologique au printemps 2016 sur 289 chevaux de la région Camargue dans le cadre du projet OPIum financé par l'IFCE et les Fonds Eperon. La technique MIA a été utilisée pour étudier et comparer la réactivité des sérums obtenus vis-à-vis de plusieurs antigènes WNV (WNV.sE, WNV.EDIII et WNV.NS1), dans le but de déterminer s'il était envisageable de différencier les chevaux infectés naturellement de ceux vaccinés par le WNV.

Parmi les 289 chevaux qui ont été prélevés dans 43 écuries durant l'enquête 2016, 36 avaient été vaccinés avec le vaccin inactivé Equip® WNV de la firme Zoétis et 18 avec le vaccin recombinant Proteq® West Nile de la firme Merial (cf. 1.6.1). Aucun cheval n'a été vacciné avec le vaccin Equilis® West Nile d'Intervet à la suite de l'épizootie WNV de 2015.

Les 289 sérums ont été testés dans un premier temps avec le kit ID Screen® WNV competition kit commercialisé par ID Vet. Les essais ont été réalisés suivant les instructions du fabricant. Le seuil de positivité pour cet ELISA de compétition correspondait à un % S/N < 40% et les sérums étaient considérés comme douteux pour $40 \leq \% S/N < 50\%$ comme recommandé par le fabricant.

Une sélection de chevaux non vaccinés et positifs en ELISA de compétition WNV (chevaux infectés pendant l'épizootie 2015 ou les épizooties précédentes enregistrées en région Camargue en 2000 et 2004) et l'ensemble des chevaux vaccinés ont ensuite été testés par méthode MIA.

Trois antigènes WNV.sE, WNV.EDIII et l'antigène recombinant NS1 du WNV (WNV.NS1), souche Egypte 101 (Genbank: EU081844.1 ; AA 793-1143), produit sur cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) et aimablement fourni par Natalie Cleton [269] ont été couplés aux billes (annexe 1). Les numéros des billes utilisées étaient respectivement 65 pour WNV.EDIII, 53 pour WNV.sE et 37 pour WNV.NS1. La méthode utilisée était celle décrite dans le manuscrit N°3.

3.1.1.4.2. Résultats

3.1.1.4.2.1. Résultats ELISA

Sur les 235 chevaux non vaccinés de l'étude 2016, 40 chevaux ont été trouvés porteurs d'anticorps anti-WNV avec le kit ELISA de compétition WNV. Ce résultat sérologique positif est la signature soit d'une infection au cours de la dernière épizootie de 2015, soit d'une infection plus ancienne.

Au sein des écuries vaccinées, les 36 chevaux vaccinés avec le vaccin Zoétis ont été trouvés positifs en ELISA de compétition quel que soit le délai entre la seconde injection de primovaccination et le prélèvement (tableau 8). En revanche concernant les chevaux vaccinés avec le vaccin Merial, 11 chevaux ont été trouvés positifs, 3 douteux et 4 négatifs en ELISA. Parmi les 7 chevaux trouvés négatifs ou douteux, 2 chevaux (1 négatif et un douteux) n'avaient reçu qu'une seule injection de primo-vaccination (primo-vaccination incomplète) avant la prise de sang. Les 3 autres chevaux négatifs en ELISA avaient été vaccinés plus de 6 mois avant la réalisation du prélèvement. Le tableau 8 résume les résultats obtenus sur les chevaux vaccinés en fonction du vaccin et du délai entre seconde injection de primo-vaccination et prise de sang.

Vaccins	Résultats ELISA (ID Vet)	Résultats ELISA en fonction du délai entre la 2 ^{de} injection de primovaccination et la prise de sang (jours)			
		0-30	30-90	90-180	180-270
Vaccin Merial					
Positif	11	1	2	2	6
Douteux	2			1	1
Négatif	3				3
Total vaccin Merial	16*	1	2	3	10
Vaccin Zoétis					
Positif	36	8	9	2	17
Total vaccin Zoétis	36	8	9	2	17
Total général	52	8	11	5	27

Tableau 8: Résultats ELISA (kit ID Screen® West Nile competition kit) obtenus sur des chevaux vaccinés avec les vaccins Proteq® West Nile (Merial) et Equip® WNV (Zoétis)

Les résultats sont exprimés en fonction du délai entre 2^{de} injection de primovaccination et la prise de sang

* 2 chevaux vaccinés Merial n'apparaissent pas dans ce tableau car ils n'avaient reçu qu'une seule injection de primo-vaccination (protocole de primo-vaccination incomplet).

3.1.1.4.2.2. Résultats avec la méthode MIA

- ✓ Calcul du seuil de positivité pour la bille NS1

Comme décrit précédemment, le seuil de positivité pour l'antigène NS1 a été déterminé par analyse des courbes ROC sur un panel de 31 sérums trouvés positifs et 44 négatifs par ELISA de compétition WNV (ID Screen® West Nile competition kit). Un contrôle positif a été systématiquement inclus dans chaque essai et les résultats de fluorescence obtenus pour les billes WNV.sE, WNV.EDIII et WNV.NS1 ont été normalisés selon le ratio S/CP x100. Un seuil de 3 pour le ratio S/CPx100 a été calculé pour la bille WNV.NS1, associé à une Se de 93.5% et Sp de 97.7% (figure 37).

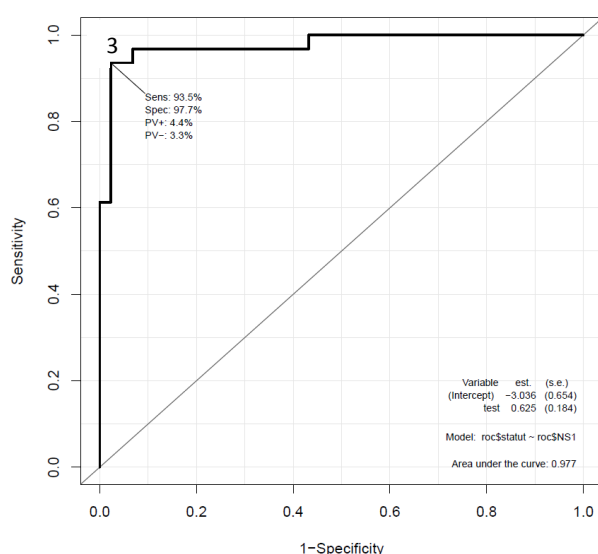


Figure 37 : Courbes ROC calculées pour la détection d'anticorps anti-NS1 WNV par méthode MIA sur des sérums de chevaux naturellement infectés et précaractérisés en ELISA de compétition WNV

La bille NS1 montre donc une très bonne spécificité mais une sensibilité (Se=93.5%) plus faible que celle trouvée avec la bille WNV.sE (Se=98.4%) (Manuscrit N°3).

Remarque : les seuils de positivité de 17 pour la bille WNV.sE et 54 pour WNV.EDIII avaient déjà été calculés dans le manuscrit N°3 :

✓ Résultats avec la méthode MIA

33 chevaux infectés naturellement par WNV ont été testés par méthode MIA et trouvés positifs à 100% (33/33), à 88% (29/33) et à 91% (30/33) avec les billes WNV.sE, WNV.EDIII et WNV.NS1 respectivement.

Après vaccination, les 36 chevaux vaccinés avec le vaccin Zoétis ont tous été trouvés positifs avec les billes WNV.sE, WNV.EDIII et 34 avec la bille WNV.NS1 (figure 38).

Dans le groupe des 11 chevaux vaccinés avec le vaccin Merial et positifs avec l'ELISA ID Vet, 100% (11/11) ont été trouvés positifs avec la bille WNV.sE, 55% (6/11) avec la bille WNV.EDIII et 18% (2/11) avec la bille WNV.NS1

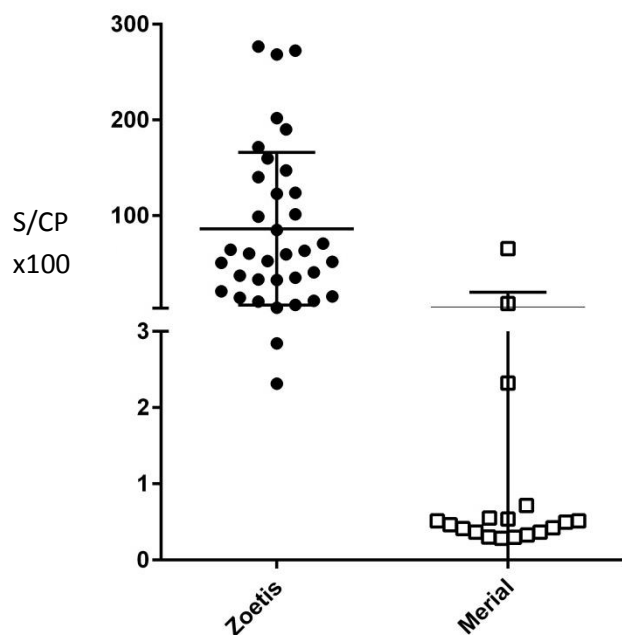


Figure 38 : Représentation des résultats de fluorescence MIA de la bille WNV.NS1 pour les chevaux vaccinés respectivement avec le vaccin Zoétis et Merial. Seuil de positivité de la bille WNV.NS1 = 3
Valeurs de fluorescence exprimées comme le ratio du MFI de l'échantillon sur le MFI du contrôle positif X 100 (S/CPX100)

Les 2 chevaux positifs avec la bille WNV.NS1 et vaccinés Merial se trouvaient dans une unique écurie où un cheval a développé une forme neuro-invasive à WNV en 2015. On peut donc fortement suspecter que ces 2 chevaux positifs ont développé une réponse anti-NS1 WNV suite à une infections asymptomatique à WNV en 2015.

Enfin dans le groupe des 7 chevaux négatifs ou douteux avec le kit ELISA ID Vet, 57 % (4 /7) ont été trouvés « positifs » avec la bille WNV.sE (résultat considéré douteux car au seuil de positivité de la bille) et 0% avec les billes WNV.EDIII et WNV.NS1 (tableau 9).

Statut vaccinal	Nb chevaux	Résultat MIA (positif)		
		WNV.sE	WNV.EDIII	WNV.NS1
Non vacciné	33	33	29	30
Vaccin Zoétis	36	36	36	34
Vaccin Merial (sérum positifs en ELISA IDVet)	11	11	6	2*
Vaccin Merial (sérum douteux et négatifs en ELISA IDVET)	7	4**	0	0

Tableau 9: Bilan des résultats obtenus par MIA sE/EDIII/NS1 WNV sur des chevaux infectés ou vaccinés contre le WNV

* chevaux trouvés positifs dans une écurie avec circulation de WNV en 2015

** résultat au seuil de positivité

3.1.1.4.3. Discussion et conclusion

Les résultats de notre enquête séro-épidémiologique sur les chevaux vaccinés en zone Camargue suite à l'épizootie WNV de 2015 montrent que la vaccination avec le vaccin inactivé et adjuvé Equip® WNV de la firme Zoétis induit une réaction, anticorps anti-WNV forte (moyenne MFI pour la bille WNV.sE= 133 pour les 36 chevaux vaccinés Zoétis) et durable. En revanche la réponse IgG avec le vaccin canarypox adjuvé (Proteq® West Nile de la firme Merial) apparaît d'intensité plus modérée (moyenne MFI pour la bille WNV.sE= 50 pour les 11 chevaux vaccinés Merial) et transitoire, comme décrit précédemment par Khatibzadeh et al. [268]. Cependant, El Garche et collègues ont pu démontrer l'induction d'une réponse cellulaire spécifique contre le WNV suite à la vaccination de chevaux avec le vaccin recombinant canarypox WNV qui a été objectivée dans cet article par un test à l'IFN γ sur les cellules mononuclées du sang périphérique de chevaux vaccinés avec un vaccin WNV canarypox [295]. Cette réponse cellulaire est fondamentale pour la clairance virale et la protection contre le WNV [174].

Les protéines NS sont des protéines candidates intéressantes pour la mise au point de tests DIVA WNV car elles ne sont pas présentes dans le virion. La protéine NS1 du WNV entraîne de plus une réponse humorale forte et représente donc un antigène de choix.

Cependant dans notre étude, la réponse contre l'antigène NS1 ne permet pas de différencier les chevaux vaccinés avec le vaccin inactivé de Zoétis des chevaux infectés WNV. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par N. Cleton par la méthode « micro-array NS1 » [269] (annexe 1) ou par U. Balasuriya par la méthode MIA [291] (cf. 1.5.2.5). Ces résultats montrent que le procédé de purification de ce vaccin inactivé n'élimine pas complètement la protéine NS1 présente sur les membranes cellulaires et/ou dans le surnageant. Cette difficulté ne semble pas exister avec les vaccins inactivés JEV où une distinction entre chevaux vaccinés et chevaux infectés peut être réalisée avec un ELISA anti-NS1 [279].

A l'inverse, le test MIA avec l'antigène NS1 WNV distingue correctement les chevaux vaccinés avec le vaccin canarypox (le vaccin recombinant ne permettant l'expression que de deux antigènes structuraux du WNV, prM et E – sérums positifs WNV.sE et WNV.EDIII) de ceux infectés naturellement (sérums positifs WNV.sE, WNV.EDIII et WNV.NS1).

La méthode MIA développée reposant sur l'analyse comparée de sérums équins vis-à-vis d'antigènes structuraux (EDIII) et non structuraux (NS1) spécifiques du WNV permet au final de distinguer les chevaux infectés des chevaux vaccinés avec un vaccin recombinant n'exprimant pas l'antigène NS1. Cette distinction est essentielle si on veut maintenir le cheval comme sentinelle de l'infection en

zone vaccinée et pousse à poursuivre le développement de ces vaccins recombinants ou chimériques.

Conclusion

Dans cette première partie, nous nous sommes attachés à améliorer le diagnostic sérologique des infections à *flavivirus* à l'aide d'une méthode MIA et de diverses protéines recombinantes du WNV ou d'autres *flavivirus*. Cette méthode est robuste, permet avec un faible volume de sérums d'identifier les principaux *flavivirus* neurotropes circulant en Europe et responsables d'encéphalites chez le cheval et les ovins et de réaliser un test DIVA fonctionnel chez les chevaux vaccinés avec les vaccins recombinants. Cette méthode ouvre de nombreuses perspectives qui seront discutées en partie 3.2 de ma thèse.

Le second volet de mon projet que nous allons maintenant aborder est de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les *flavivirus* d'intérêt en médecine vétérinaire (en priorité JEV et WNV).

3.1.2. Nouvelles stratégies thérapeutiques

3.1.2.1. Concept

L'objectif du travail réalisé est d'identifier une molécule antivirale à large spectre permettant soit de cibler une protéine virale commune à différents virus et d'inhiber sa fonction enzymatique soit de moduler un facteur de l'hôte indispensable à la réplication virale soit enfin de stimuler la réponse immunitaire innée [337]. Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons étudié les effets thérapeutiques de molécules antivirales à large spectre sur les *flavivirus* équins WNV et JEV. Ce projet s'inscrit dans un programme collaboratif impliquant plusieurs laboratoires (ANSES Maisons-Alfort et Dozulé, le laboratoire Labéo Frank Duncombe, le Centre d'Etudes et de Recherche du Médicament de Normandie (CERMN, Caen) et l'Institut Pasteur (IP)). Ce projet est soutenu par l'IFCE, les Fonds Eperon et le pôle de compétitivité Hippolia.

La sélection des molécules à large spectre s'est appuyée sur une méthode de criblage mise en place par l'équipe de Pierre Olivier Vidalain de l'Unité de Génomique Virale et Vaccination (G2V) de l'Institut Pasteur en collaboration avec le groupe d'Hélène Munier-Lehmann (Unité de Chimie et biocatalyse, Institut Pasteur).

La stratégie de criblage est basée sur l'infection *in vitro* de cellules HEK293T (*Human embryonic kidney 293T*, cellules rénales embryonnaires humaines exprimant l'antigène T du SV 40,) par les virus recombinants de la rougeole (rMV2/Luc) et du chikungunya (CHIKV/Ren) exprimant la luciférase *firefly* (luciférase de la luciole) ou la luciférase Renilla (luciférase de la pensée de mer) comme rapporteur de la réplication virale. Note: rMV2/Luc est dérivée du vaccin MV (MV pour *Measles virus*), souche Schwarz atténuée à l'inverse du CHIKV/Ren qui provient d'une souche sauvage de CHIKV.

La sélection a été réalisée uniquement sur les composés capables d'inhiber à la fois des virus à ARN de polarité positive tels que le CHIKV et négative tels que le MV [338]. Un test de viabilité cellulaire était aussi effectué pour éliminer les molécules cytotoxiques.

Sur **4640** composés du CERMN (Caen) qui ont été criblés avec cette technique, seulement 6 molécules antivirales à large spectre ont été sélectionnées. Parmi ces 6 molécules, la molécule sr1057 est le chef de file que nous avons testé en priorité et qui fait l'objet des résultats présentés dans ce manuscrit.

Propriétés du composé sr1057

Cette molécule appartient à la famille des pyrroloquinoxaline (figure 39 A). L'étude des propriétés antivirales et de son mode d'action font partie intégrante du mémoire de thèse de Samira Khiar et les

résultats de ce travail sont résumés succinctement dans la suite de ce manuscrit [330]. La méthode de criblage des molécules antivirales à l'aide de rMV2/Luc et CHIKV/Ren est détaillée dans l'article de Lucas-Hourani et al [338]. La première étape du criblage a permis de sélectionner tout d'abord les composés non toxiques et actifs contre le MV, puis ces molécules ont été testées pour leur activité antivirale contre le CHIKV. Seules les molécules qui étaient non toxiques et actives contre les deux virus ont été sélectionnées. La cytotoxicité 50 (CC₅₀) du sr1057, correspondant à la concentration de la molécule provoquant la mortalité de la moitié des cellules viables, a été déterminée **>20 µg/ml**. Les IC₅₀ (égales à la concentration de la molécule inhibant 50% de la réplication virale) ont été calculées pour le MV et pour le CHIKV en présence de sr1057 et étaient respectivement de **3 µg/ml** et **4µg/ml** en solvant DMSO (figure 39 B).

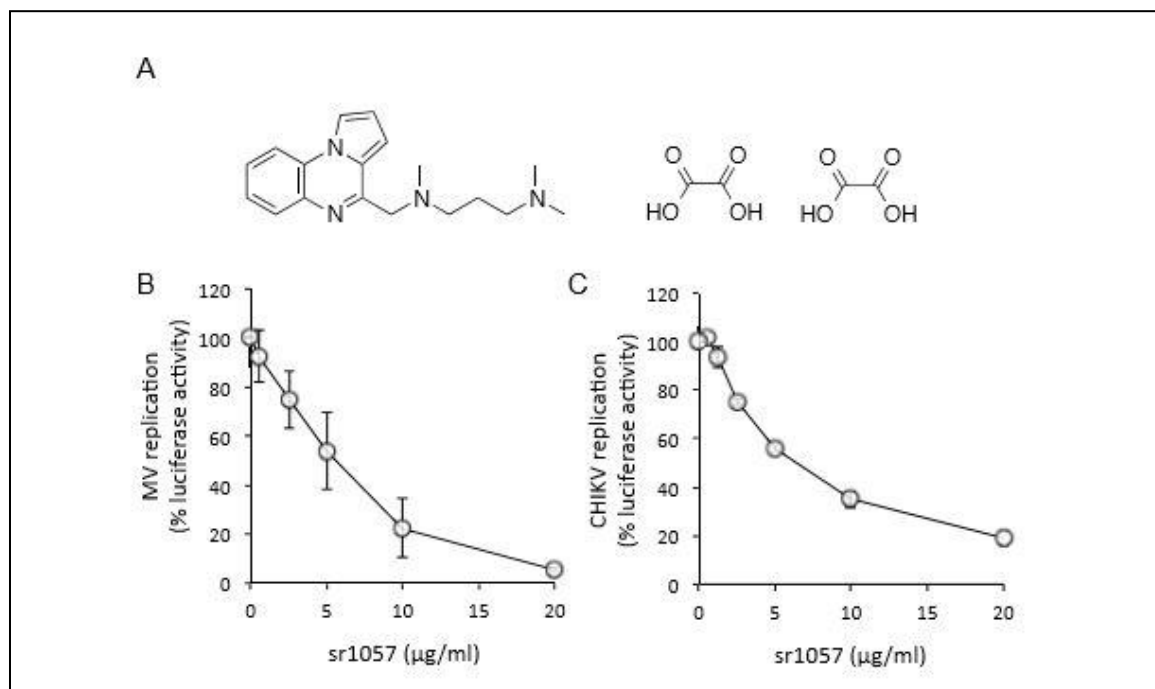


Figure 39 : Effet antiviral du composé sr1057 sur la réplication de rMV2/Luc et du CHIKV/Ren (A) Structure chimique du sr1057. (B)

Cellules HEK-293T infectées avec rMV2/Luc ou CHIKV/Ren, et traitées avec des doses croissantes de sr1057. Après 24h de culture, l'expression de la luciférase reflétant la réplication virale a été déterminée. Figure reproduite du manuscrit de Samira Khiar Thèse université 2016 [330].

Ces résultats ont permis de déterminer pour le CHIKV un index de sélectivité égal à CC₅₀/IC₅₀ estimé à 17, ce qui est un résultat encourageant pour une molécule non optimisée.

Cet index de sélectivité est une valeur importante à considérer pour évaluer l'avenir potentiel d'un antiviral, la concentration nécessaire pour inhiber la réplication virale ne devant pas être cytotoxique pour la cellule.

Une cinquantaine d'analogues du sr1057 ont été synthétisés au CERMN de Caen, puis testés par Samira Khier pour leur activité antivirale contre le virus de la rougeole. Le rôle central joué par le noyau pyrroloquinoxaline dans l'activité antivirale de ces composés a été mis en évidence mais aucune des autres molécules testées n'a permis d'augmenter significativement l'activité antivirale de cette série chimique.

Le mode d'action a aussi été étudié. Les conclusions de cette étude montre que le sr1057 ne cible ni les kinases cellulaires ni la voie de biosynthèse de novo des pyrimidines. Le mode d'action du sr1057 reste donc pour l'instant inconnu.

Enfin *in vivo*, l'administration du sr1057 par voie intraveineuse chez la souris a montré une demi-vie de 9 minutes. Une étude de sa stabilité métabolique sur des microsomes de foie a permis de déterminer une demi-vie de 6 minutes, confirmant ainsi que le composé sr1057 est très rapidement métabolisé *in vivo*. Cette molécule devra donc être optimisée dans l'éventualité d'une utilisation ultérieure en tant que médicament.

Nous avons souhaité tester cette molécule démontrée active contre le CHIKV et le MV sur des souches terrain de WNV et JEV.

3.1.2.2. Matériel et méthode

3.1.2.2.1. Lignée cellulaire

Nous avons voulu nous approcher le plus possible des conditions expérimentales établies précédemment par l'IP. Le modèle cellulaire HEK293T (ATCC® CRL3216™) a été utilisé car la drogue sr1057 a été démontrée efficace ($IC_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$) contre le CHIKV/Ren sur cellules HEK293T et nous avons distribué, comme décrit dans l'article d'Hourani-Lucas et al [338], les cellules conjointement au virus à J0 avec J0 correspondant au jour de l'infection (1^{er} protocole).

Nous avons en outre souhaité tester un mode opératoire en cours au laboratoire où les cellules sont distribuées dans les puits 24h avant l'ajout des antiviraux et l'infection virale (2nd protocole).

Les cellules étaient maintenues à l'étuve à 37°C avec 5% CO₂ en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-Invitrogen) supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal (SVF), 1% de pyruvate de sodium et 1% de Pénicilline Streptomycine

3.1.2.2.2. Virus

Deux *flavivirus* d'intérêt vétérinaire majeur (WNV et JEV) ainsi que le CHIKV, alphavirus, témoin positif de l'efficacité du composé sr1057, ont été testés au cours de cette étude.

Les différentes souches utilisées ont été respectivement : 1/ WNV Italie 2008 (lignée 1a) (code Genbank : FJ483549.1 ; source : Institut IZSLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia

e Dell'Emilia Romagna) 2/ JEV Japon, souche Nakayama, génotype 3 (code Genbank: EF571853 ; source : IP) et 3/ CHIKV Réunion 2005 (code Genbank: AM258990.1 ; source : IRBA).

Les virus ont été titrés sur cellule Vero selon la méthode OIE de titrage en plaque de lyse [339].

Les titres viraux exprimés en pfu/ml (*plaque forming unit* pour unité formant plaque/millilitre) sont respectivement : WNV It08 : $5,8 \times 10^7$ pfu/ml ; JEV : $8,7 \times 10^5$ pfu/ml et CHIKV : $2,7 \times 10^5$ pfu/ml.

3.1.2.2.3. Molécules

La molécule à tester est le composé sr1057 qui a été synthétisé par le CERMN. Il est dilué extemporanément dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 2mg/ml.

Les contrôles positifs de l'inhibition de l'infection sont :

- L'IFN β (Tebu-bio) qui a été utilisé à la concentration finale de 1000UI/ml
- Le bréquinar sous forme de sel de sodium hydraté (Sigma Adrich) qui a été utilisé à la concentration finale de 1 μ g/ml.

3.1.2.2.4. Tests de viabilité cellulaire

Les cellules HEK 293T ont été distribuées à raison de 5×10^4 cellules par puits (sous 100 μ L) sur deux plaques 96 puits (Nunc Immuno™ Plate Maxisorp™) et traitées en fonction du protocole (figure 40) à 0 ou 24 heures après le dépôt des cellules avec 100 μ L de doses croissantes des différentes molécules antivirales (molécules antivirales distribuées en duplicat). Le test de viabilité cellulaire a été effectué à l'aide du test de luminescence CellTiter-Glo (Promega) qui quantifie l'adénosine triphosphate (ATP) présent dans les puits de culture, ce qui reflète le nombre de cellules viables. Le test de luminescence a été effectué 24h et 48h après distribution de l'antiviral suivant les recommandations du fabricant. La luminescence a été mesurée à l'aide d'un luminomètre (Enspire; PerkinElmer). Un témoin positif de lyse cellulaire composé de 0.5% IGEPAL et des témoins cellules étaient inclus dans l'essai.

Deux protocoles ont été appliqués en fonction du moment de l'administration des molécules antivirales sur le tapis cellulaire : soit directement après distribution des cellules sur les plaques 96 puits, soit 24 heures après la distribution. Les différentes étapes sont résumées figure 40.

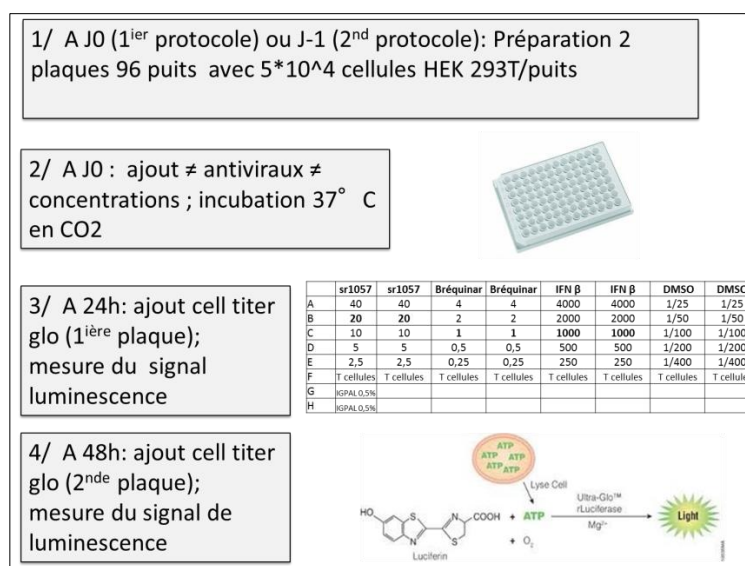


Figure 40 : Protocole du test de viabilité cellulaire des cellules HEK 293T avec différentes molécules antivirales

Les concentrations de sr1057 et de bréquinar sont exprimées en µg/ml, d'IFNβ en UI/ml et de DMSO en facteur de dilution

3.1.2.2.5. Inhibition de la réplication virale évaluée par quantification du génome viral et par titrage

✓ Distribution des cellules

Les cellules HEK 293T ont été distribuées sur une plaque de 24 puits à raison de 5×10^5 cellules/puits sous 1 ml

✓ Ajout des antiviraux

Deux protocoles ont à nouveau été appliqués en fonction du moment de l'ajout des molécules antivirales sur le tapis cellulaire : soit directement après distribution des cellules sur les plaques 24 puits, soit 24 heures après la formation du tapis cellulaire.

Les différents composés ont été distribués en triplicat à raison de 100µl/puits.

Dans le premier protocole, l'ensemble des composés (IFNβ, sr1057, DMSO et bréquinar) ont été déposés directement après la distribution des cellules. Le puits témoin non infecté (NI) et les 2 puits non traités (NT) ont reçu 100µl de DMEM.

Dans le second protocole, les cellules ont été distribuées à J-1, l'IFNβ 1000UI/ml à J0-5heures, les autres composés à J0-5heures ou à J0.

En fonction des protocoles, différentes concentrations de sr1057 (de 2,5 à 20µg/ml) et de DMSO (dilution de 1/100 à 1/400) ont été testées (figure 41).

✓ Infection virale

Les cellules, en présence des différents antiviraux, ont ensuite été infectées avec un des trois virus WNV (0.01 MOI), JEV (0.01 MOI) et CHIKV (0.0001MOI) sous 100µl. Le puit NI a reçu 100µl de DMEM.

✓ Prélèvement des surnageants

100µl de surnageant ont été prélevés dans tous les puits à J0, afin de valider l'homogénéité de la distribution du virus dans les puits, puis à J1 et J2 pour détecter et quantifier la charge virale dans les différents puits. Les temps J1 et J2 ont été choisis car correspondant à la phase de multiplication active des trois virus. Les puits ont ensuite été complétés avec 100µl de milieu complet avec le composé à la bonne concentration afin de travailler à volume constant.

✓ Extraction des ARN viraux

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée sous 100µl de surnageant au moyen de réactifs commercialisés par la société Life Technologies (kit MagVet™ Universal Isolation) et de l'automate Kingfisher. Le mode opératoire est dérivé de la notice d'utilisation incluse dans le kit d'extraction MagVet™ Universal Isolation (Life Technologies ; référence : MV384) (figure 41).

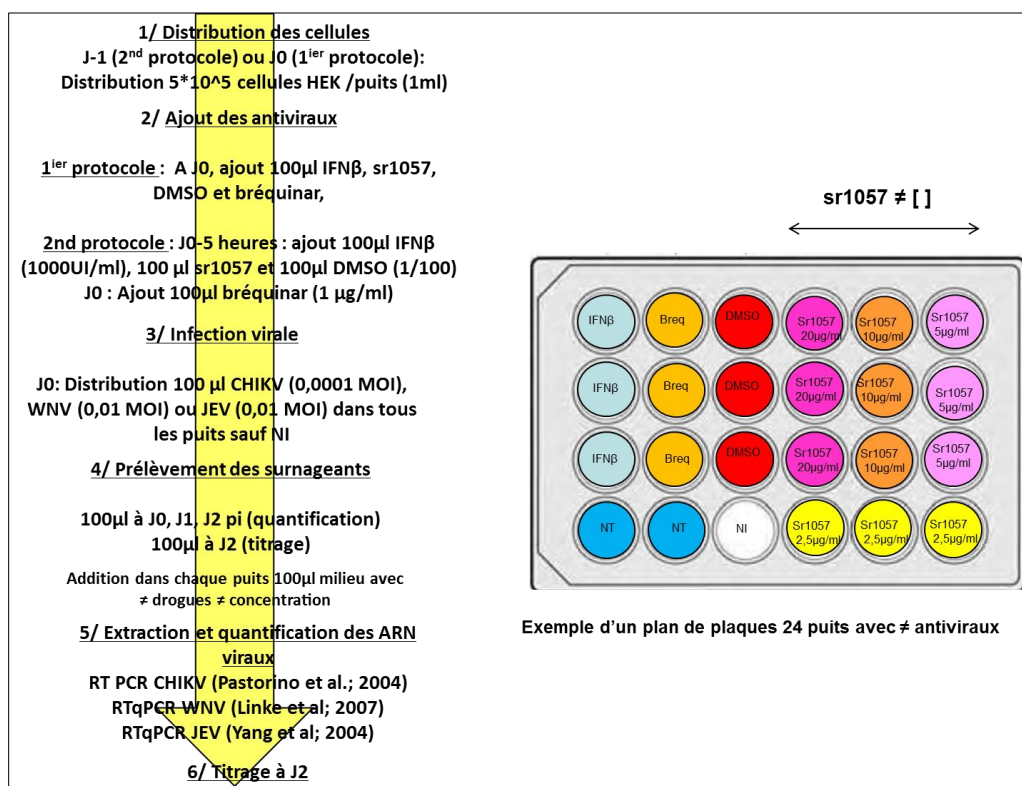


Figure 41 : résumé du protocole d'infection des cellules HEK293T par CHIKV, JEV ou WNV

✓ Détection et quantification du génome viral

La détection et la quantification du génome ont été réalisées sous 5µl d'éluat par différentes RT-PCR en temps réel utilisant des sondes Taqman d'après la technique décrite par Pastorino et al [340] pour le CHIKV, adaptée de S. Linke et al [243] pour le WNV, et de Dong-Kun Yang et al.[341] pour le JEV. Pour le CHIKV, le cycle seuil (cycle threshold ou CT) a été déterminé et la Δ CT a été calculée (CT molécule-CT(NT)).

Une quantification de l'ARN viral présent dans l'échantillon a de plus été réalisée pour le WNV et le JEV à l'aide de standards inclus lors de la RT PCR (RT-qPCR) mais n'a pu être faite pour le CHIKV en l'absence de standards disponibles au laboratoire.

✓ Titrage viral

A J2, 100 µl de surnageant ont été prélevés dans tous les puits afin de réaliser un titrage sur cellules sensibles Vero. Le titre viral a été estimé selon la méthode de Reed et Muench [342].

✓ Analyse statistique

La moyenne et l'écart type pour chaque triplicat ou duplicat ont été calculés pour chaque essai. Les résultats de la quantification du génome viral (nombre de copies/5µl) et du titrage (TCID₅₀/ml) ont été convertis en logarithme décimal avant analyse statistique. Les tests d'analyse de variance (ANOVA, *one-way* ou *two-way* en fonction du nombre de facteurs étudiés (i.e. effet drogue ou effet de la drogue et du temps) ont été utilisés et ont fait l'objet d'un test de comparaisons multiples de Dunnett qui permet pour chaque jour post-infection de comparer l'effet de la molécule par rapport aux puits non traités. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

3.1.2.3. Résultats

3.1.2.3.1. Le sr1057 inhibe l'infection à CHIKV sur cellules HEK293T

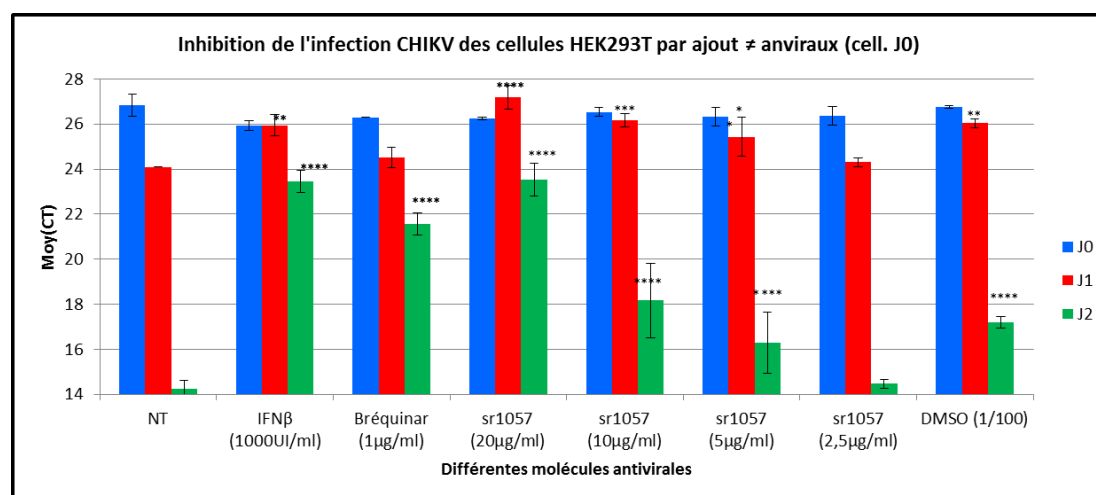
Nous avons d'abord souhaité confirmer l'activité antivirale du composé sr1057 sur le CHIKV en utilisant une souche de CHIKV sauvage.

✓ Calcul des CT sur cellules HEK293T traitées directement par les antiviraux (1^{ier} protocole)

Les propriétés antivirales du sr1057 sur cellules HEK293T avec le CHIKV ont été caractérisées. Les cellules, déposées dans les puits, ont été traitées avec le sr1057 à des concentrations de 2,5 à 20

µg/ml puis infectées avec CHIKV à 0,0001 MOI. L'infection virale a été mesurée par calcul des CT dans le surnageant à J0, J1 et J2 post infection (pi). Nous avons de plus ajouté deux molécules connues pour leurs propriétés antivirales contre le CHIKV mais qui n'ont pas le même mode d'action : l'IFNβ qui cible l'immunité innée cellulaire et le bréquinar qui inhibe la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques.

Le sr1057 a présenté par rapport au NT (CT=24,1 à J1 et CT=14,3 à J2), un très bon effet antiviral à J1 et J2 pi pour la dose de 20µg/ml (CT= 27,2 à J1 et CT = 23,5 à J2 ; $p < 0,0001$) et pour les doses plus faibles de 10µg (CT= 26,2 à J1 ; $p < 0,001$ et CT=18,2 à J2 ; $p < 0,0001$) et 5µg/ml (CT= 25,4 à J1 ; $p < 0,05$ et CT=16,3 à J2 ; $p < 0,001$). Le Δ CT (CT molécule – CT (NT)) a été de 3 à J1 et de 9,3 à J2 pour la dose de 20µg/ml. De plus un effet dose a été observé avec la gamme de dilution testée de sr1057 avec une activité décroissante de la molécule contre le CHIKV conjointe à la diminution de la concentration du sr1057 (figure 42). Enfin, par rapport au NT, un effet antiviral du DMSO à la dilution 1/100 à J1 (CT=26 ; $p < 0,01$) et J2 pi (CT=17,2 ; $p < 0,0001$), qui correspond à la dilution du DMSO utilisée dans les puits sr1057 (20µg/ml), a été noté. Aux plus faibles concentrations de DMSO (1/200 et 1/400), l'effet antiviral a été uniquement observé à J2 pi avec (Δ CT $\approx$ 1,8 pour DMSO 1/200 et le DMSO 1/400 ; $p < 0,05$) (figure 42 b). Comme escompté, les témoins positifs IFNβ et bréquinar ont montré un effet antiviral à J2 ($p < 0,0001$) avec des Δ CT respectivement de 7,3 et 9,3 (figure 42b).



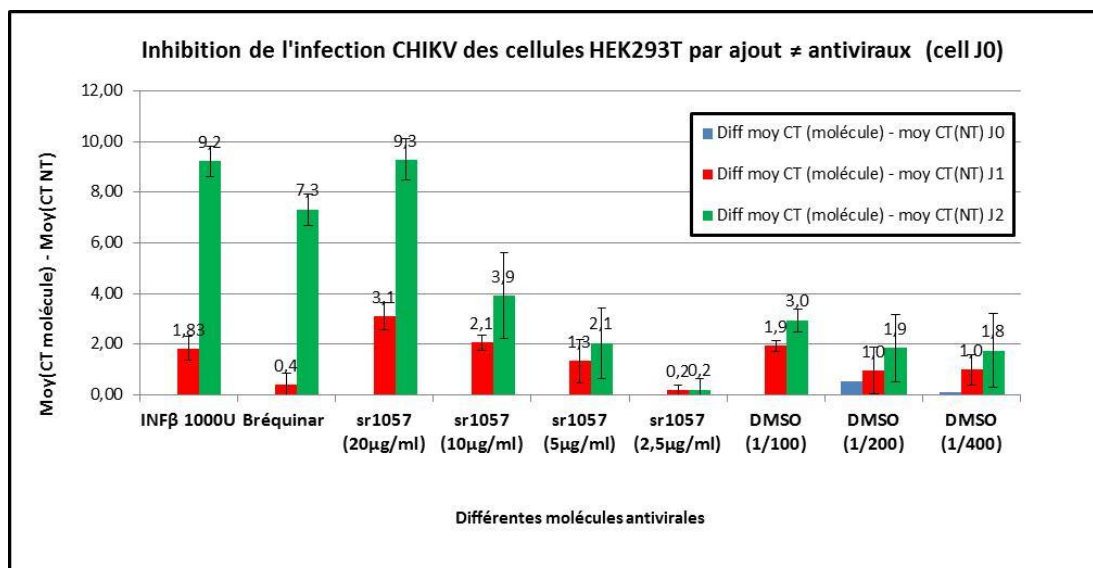


Figure 42 : Inhibition de l'infection CHIKV des cellules HEK293T (distribuées à J0) par l'ajout d'antiviraux

Détection par RT-PCR en temps réel sous 5μl d'éluât des génomes viraux CHIKV présents dans les surnageants de culture à J0, J1 et J2 pi sur cellules déposées dans les puits au moment de l'infection (0h avant infection).

a/Le graphique représente la moyenne des CT calculée à partir des données obtenues sur 3 répliquats à partir de la RT-PCR en temps réel développée par Boris Pastorino et al, 2004 [340] (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** = $p < 0,0001$).

b/ L'histogramme représente la différence de CT obtenus avec la molécule et sans traitement (Δ CT) à J0, J1 et J2 pi.

✓ Titrage du CHIKV présent dans le surnageant à J2 (1^{er} protocole)

Nous avons ensuite effectué un titrage en duplicat des surnageants cellulaires prélevés à J2 pi pour déterminer la quantité de particules infectieuses par puits (figure 43). Les titrages réalisés à J2 pi corroborent les résultats obtenus avec la RT-PCR en temps réel CHIKV avec des titres infectieux supérieurs de plus de 4 log(10) dans les puits non traités ($NT = 10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) par rapport aux puits traités avec la molécule sr1057 à 20 μg/ml ($8,4 \times 10^3$; $p < 0,001$) et supérieurs de plus de 2 log(10) par rapport aux puits traités avec la molécule sr1057 à 10 μg/ml ($5,5 \times 10^5 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$; $p < 0,01$). L' IC_{50} à J2 qui est de l'ordre de 50% de la valeur du NT ($NT/2 = 5 \times 10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) donne un intervalle de mesure pour le sr1057 entre **5 et 10 μg/ml**. On a observé de plus un effet antiviral du DMSO aux différentes concentrations testées (1/100, 1/200 et 1/400) mais qui est statistiquement non significatif.

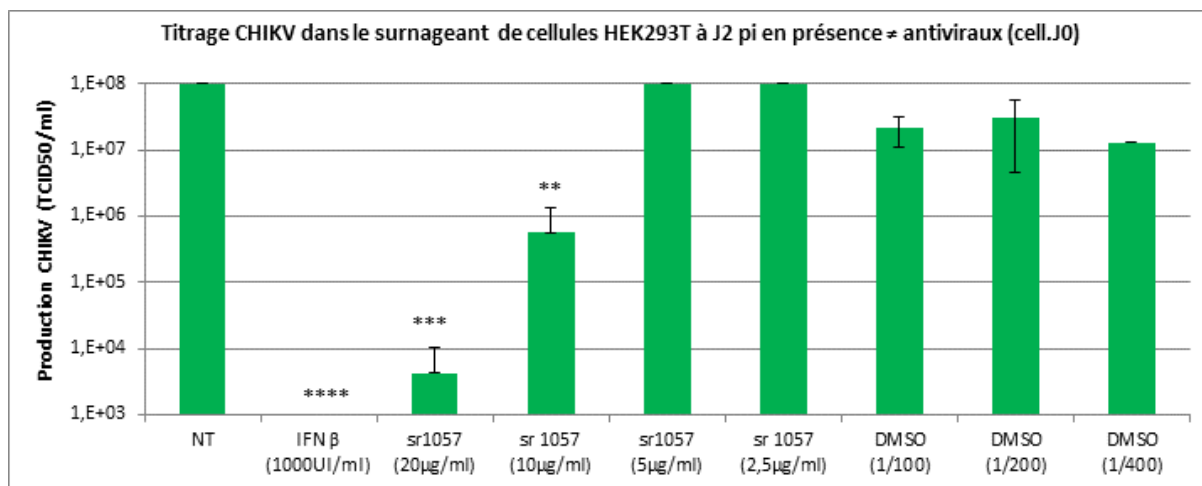


Figure 43 : Titration de l'infection CHIKV des cellules HEK293T à J2 pi en présence de différents antiviraux (cellules HEK distribuées à J0).

Inhibition estimée à J2 pi par titrage sur cellules Vero des surnageants des puits infectés par le CHIKV et traités par différentes concentrations de sr1057 et de DMSO (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** = $p < 0,0001$).

La moyenne du titre infectieux obtenu sur 2 réplicats est représentée.

Enfin, pour confirmer que l'inhibition virale est indépendante de la cytotoxicité du sr1057, la viabilité des cellules HEK 293T traitées avec des doses croissantes de sr1057 a été analysée à J1 et J2 après l'ajout de l'antiviral.

✓ Test de cytotoxicité du sr1057 (1^{er} protocole)

Différentes concentrations des molécules antivirales témoin, de DMSO et de sr1057 ont été utilisées: de 250 à 4000 UI/ml pour l'IFNβ, de 1 à 16μg/ml pour le bréquinar, de 10 à 80 μg/ml pour le sr1057 et une dilution allant de 1/25 à 1/400 pour le DMSO. La mesure du signal de luminescence à l'aide du réactif CellTiter-glo (Proméga) a été effectuée 24 et 48 heures après dépôt des différentes molécules (figure 44).

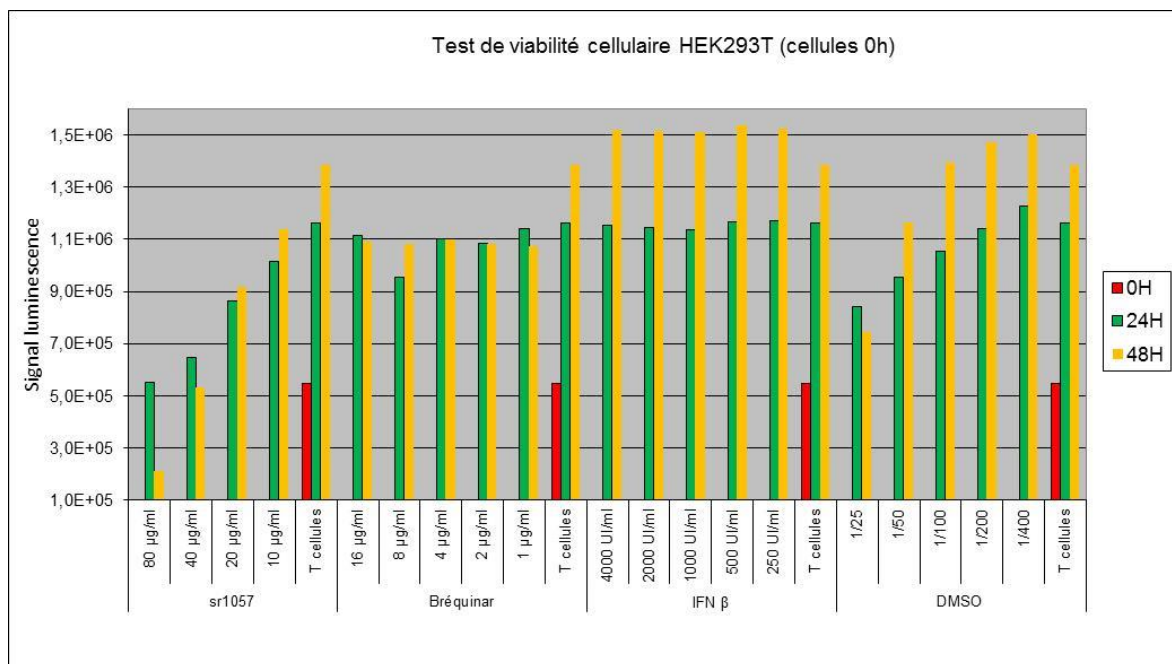


Figure 44 : test de viabilité cellulaire avec mesure de la luminescence à 0 heure (témoin cellules), 24 et 48 heures après dépôt des différents composés antiviraux sur des cellules HEK293T distribuées concomitamment dans le puits.

Les données de luminescence après traitement antiviral ont été comparées aux résultats des témoins cellules non traitées. Le bréquinar et l'IFN β ne sont pas cytotoxiques à 24h post-traitement quelle que soit la concentration des deux molécules utilisée. De même, à J2 post-traitement, l'IFN β n'a pas présenté d'effet cytotoxique. En revanche, un effet cytostatique du bréquinar a été observé.

Pour le sr1057, la molécule apparaît comme cytotoxique à forte dose et une **CC₅₀** (50% de la viabilité du témoin cellules) de l'ordre de **80µg/ml** à J1 et de **30µg/ml** à J2 post-traitement peut être calculée. Le DMSO dilué au 1/100 (correspondant à la dilution du DMSO pour un traitement par le sr1057 à 20µg/ml) n'est pas cytotoxique pour les cellules HEK293T à J1 et J2 post-traitement. Ces données de cytotoxicité de la molécule sr1057 sur cellules HEK293T (de l'ordre de **80µg/ml** à J1 post-traitement) sont comparables à celles générées par Samira Khier [330] selon le protocole décrit dans l'article de Lucas-Hurani et al [338].

Conclusion : Nous confirmons, par des approches différentes de celles développées par l'IP, l'efficacité de la molécule sr1057 à inhiber la réplication du CHIKV en cellules HEK293T à une concentration comprise entre **5 et 10 µg/ml** qui est peu cytotoxique pour la cellule.

De manière intéressante, un effet antiviral beaucoup plus limité est observé quand la molécule sr1057 est ajoutée sur des cellules HEK293T pré ensemencées et déjà organisées en tapis.

- ✓ Calcul des CT sur cellules HEK293T déposées à J-1 avant traitement par les antiviraux (2nd protocole)

Nous avons caractérisé dans un second temps les propriétés antivirales du sr1057 contre le CHIKV sur cellules HEK293T adhérentes en tapis (déposées dans les puits à J-1). Les cellules ont ensuite été traitées à J0 avec 20µg/ml de sr1057, concentration qui présentait l'effet antiviral le plus marqué dans l'essai précédent, puis infectées avec CHIKV à une MOI de 0.0001. Nous avons aussi voulu tester un prétraitement par le sr1057 à J0-5h.

Sur cellules de 24 heures, le sr1057 (20µg/ml) a significativement diminué par rapport au NT (CT=21,5 à J1 et CT= 15,5 à J2) la quantité de génomes viraux détectés par RT-PCR temps réel CHIKV uniquement à J1 (CT=23,3 ; $p < 0,001$) avec un Δ CT de 1,8 à J1 et de 0,3 à J2 (figure 45). Pour le sr1057 déposé à J0-5 h, l'efficacité a été supérieure avec un effet antiviral significatif à J1 et J2 (CT= 24 à J1 et CT= 17,1 à J2 ; $p < 0,001$). Cependant si on compare avec l'essai précédent, les valeurs de Δ CT obtenues dans ces essais sur cellules adhérentes sont beaucoup plus faibles avec un Δ CT de 2,5 à J1 (versus 3,1 pour des cellules traitées à J0) et 1,6 (versus 9,3 pour des cellules traitées à J0) à J2. Cette différence d'efficacité entre les deux essais n'a pas été observée avec les témoins positifs qui ont un effet antiviral significatif à J1 et J2 ($p < 0,001$) (Δ CT de 5,3 à J1 et de 11,7 à J2 avec le bréquinar et de 4,0 à J1 et 8,7 à J2 avec l'IFN β ; figure 45).

Remarque : Dans ce protocole, l'IFN β a été ajouté 5h avant infection virale (J0-5h) pour potentialiser la réponse innée de la cellule avant infection virale.

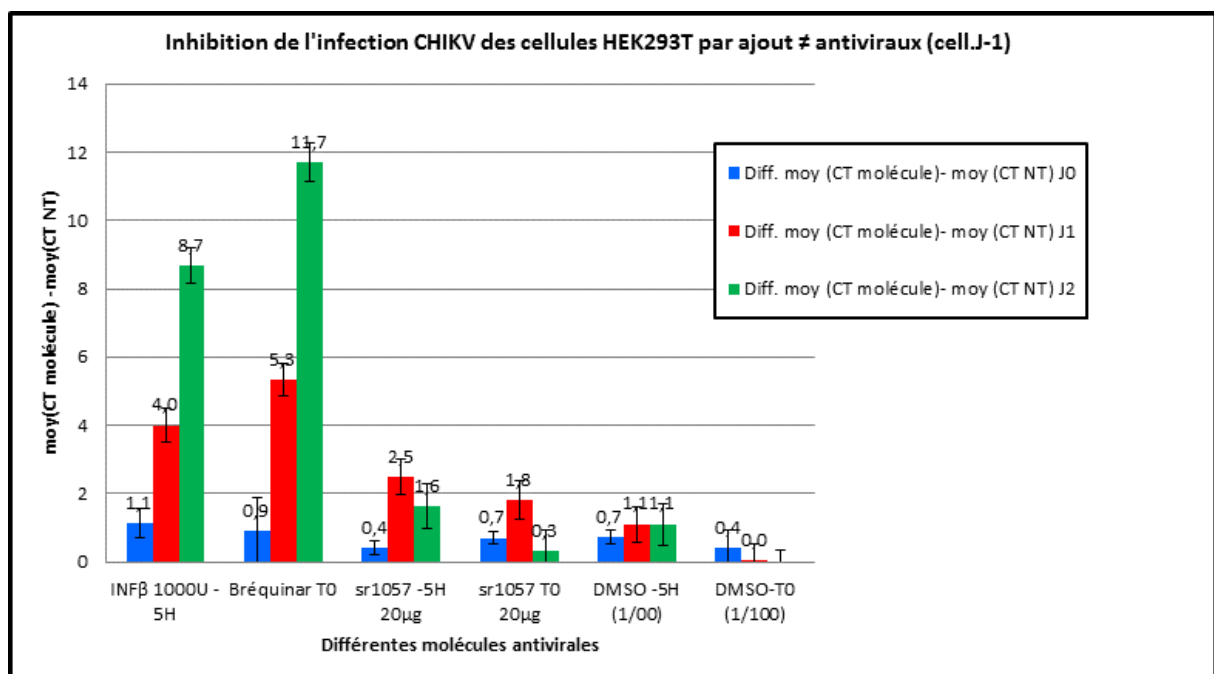
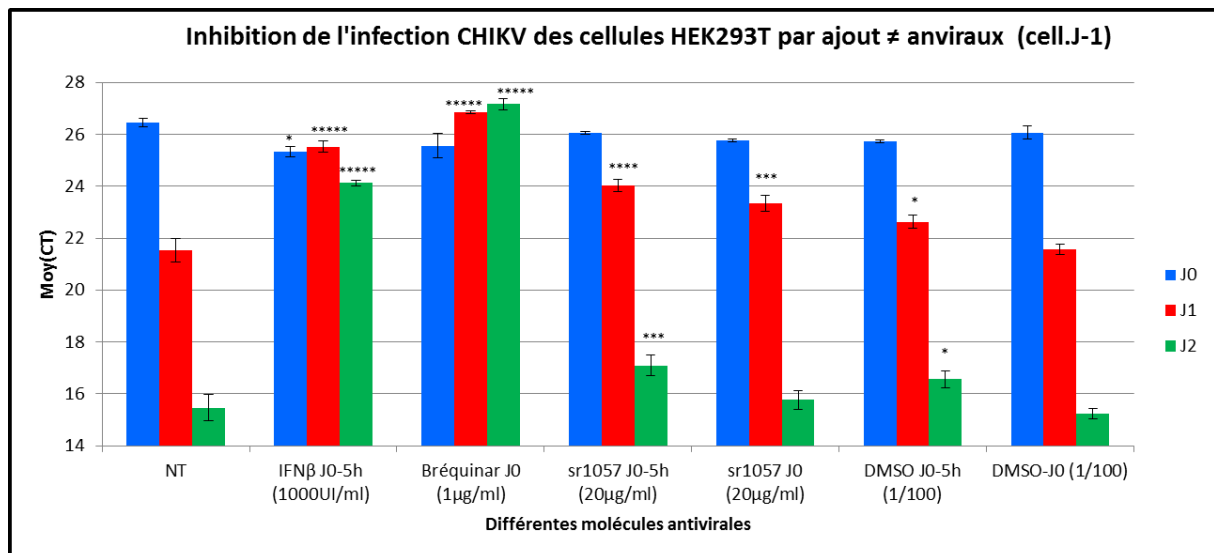


Figure 45 : Inhibition de l'infection CHIKV des cellules HEK293T distribuées à J-1 par l'ajout d'antiviraux
 Détection par RT-PCR en temps réel sur 5μl d'éluât des génomes viraux CHIKV présents dans les surnageants de culture à J0, J1 et J2 pi sur cellules déposées dans les puits à J-1 (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

a/ Le graphique représente la moyenne des CT calculée à partir des données obtenues sur 3 répliquats à partir de la RT-PCR en temps réel développée par Boris Pastorino et al, 2004 [340].

b/ L'histogramme représente la différence des CT obtenus avec la molécule et sans traitement (ΔCT) à J0, J1 et J2 pi.

✓ Test de cytotoxicité du sr1057 (2nd protocole)

Nous avons étudié la cytotoxicité du sr1057 pour les cellules HEK293T lors de ce protocole de traitement sur tapis adhérent (figure 46).

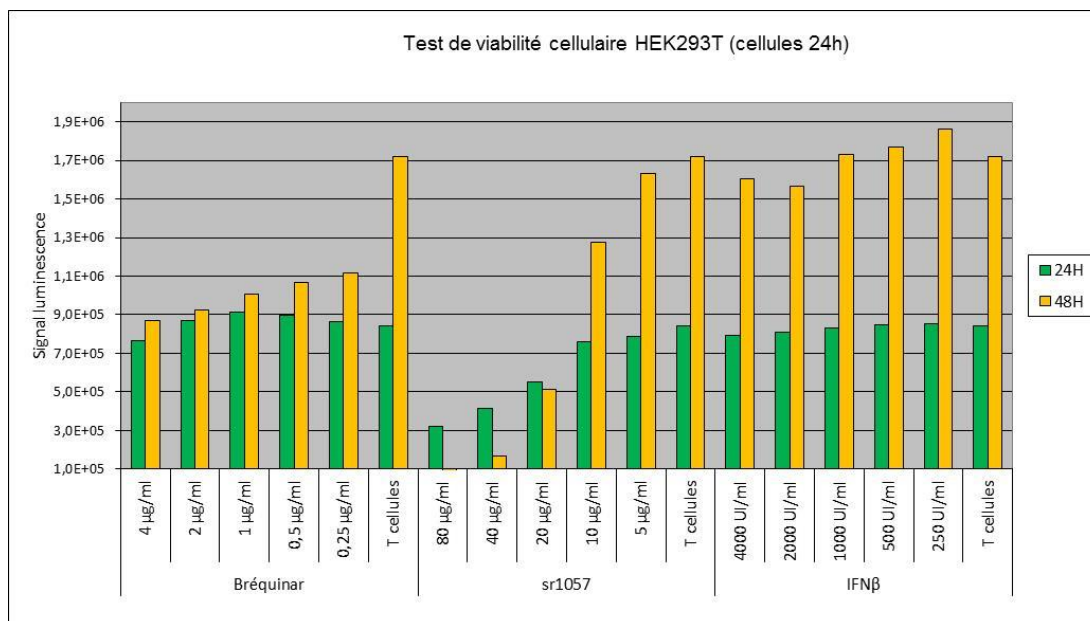


Figure 46 : test de viabilité cellulaire avec mesure de la luminescence à 24 et 48 heures après dépôt des différents composés sur des cellules HEK293Tensemencées 24 heures avant traitement.

On observe que la cytotoxicité du composé sr1057 est augmentée d'un facteur 2 environ en comparaison avec le protocole consistant en un ajout de la molécule sur des cellules non adhérentes avec une CC_{50} de **40µg/ml à J1** (versus 80µg/ml, 1^{er} essai) et de **15µg/ml** (versus 30 µg/ml ; 1^{er} essai). L'IFN β apparaît de nouveau comme non cytotoxique à J1 et J2 post-traitement et le bréquinar présente à nouveau de propriétés cytostatiques à J2 post-traitement.

Conclusion : l'efficacité antivirale (vis-à-vis du CHIKV) et la cytotoxicité du sr1057 en cellules HEK293T sont dépendantes du moment d'administration de la molécule.

3.1.2.3.2. Le sr1057 inhibe l'infection à JEV sur cellules HEK293T

- ✓ Quantification du génome dans le surnageant de cellules HEK293T traitées directement par les antiviraux (1^{er} protocole)

Nous avons testé l'efficacité antivirale du sr1057 sur la souche JEV Nakayama de génotype III. Les cellules déposées dans les puits ont été traitées extemporanément avec le sr1057 à des concentrations variant de 2,5 à 20 µg/ml puis infectées avec JEV à 0,01 MOI. 100 µl des surnageants des différents puits ont été prélevés et les ARN extraits à J0, J1 et J2 pi, puis une quantification du génome viral JEV a été réalisée sur 5µl d'éluât par RT-PCR en temps réel [341].

Une diminution significative de la quantité de génomes viraux JEV sous 5 μ l a été objectivée à J2 pi entre le NT ($1,5 \times 10^7$ copies) et le sr1057 à 5 μ g ($2,2 \times 10^6$ copies; $p < 0,01$), 10 μ g ($3,3 \times 10^6$ copies ; $p < 0,05$) et 20 μ g/ml ($1,5 \times 10^6$ copies; $p < 0,001$). Le sr1057 à la plus faible dose testée (2,5 μ g/ml) ainsi que le DMSO au 1/100 n'ont pas eu d'effet antiviral (figure 47).

Notre essai est validé car les témoins antiviraux IFN β et bréquinar ont inhibé la réplication du JEV avec une diminution de nombre de copies d'ARN viral à J2 pi par un facteur supérieur à 10 pour l'IFN β ($6,3 \times 10^5$ copies ; $p < 0,0001$) et supérieur à 100 pour le bréquinar ($2,2 \times 10^4$ copies ; $p < 0,0001$), par rapport aux cupules non traitées.

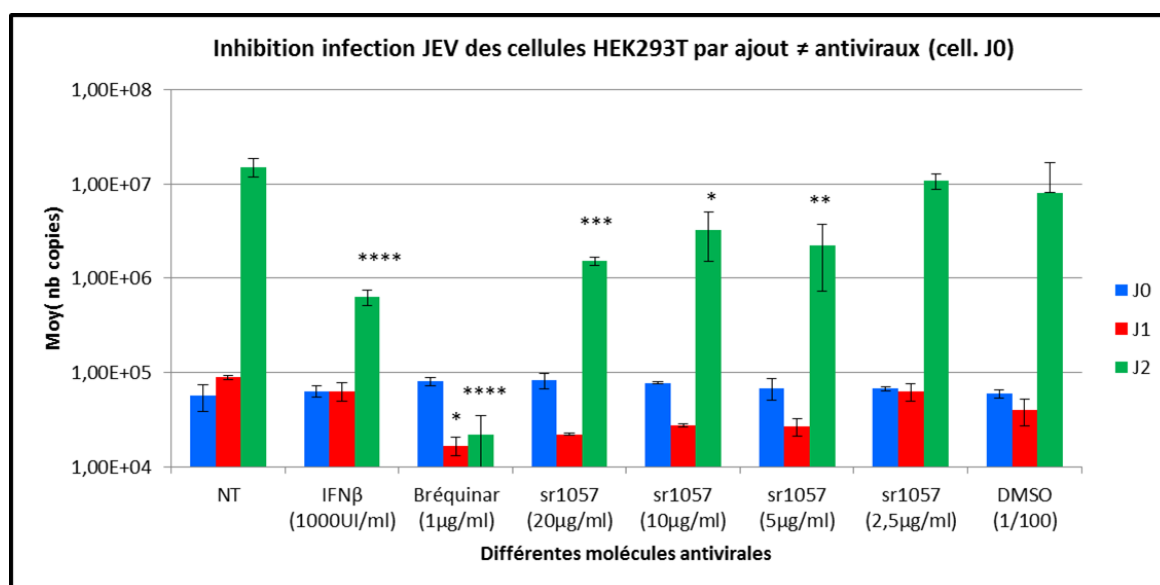


Figure 47 : Inhibition de l'infection JEV des cellules HEK293T distribuées à J0 par l'ajout d'antiviraux

Quantification par RTPCR en temps réel sur 5 μ l d'éluât des génomes viraux JEV présents dans les surnageants de culture à J0, J1 et J2 pi sur cellules déposées dans les puits au moment de l'infection (0h avant infection). Le graphique représente la Moy (nb copies d'ARN viral) calculée à partir des données obtenues sur 3 répliquats à partir de la RT-PCR en temps réel développée par Yang et al [341] (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

✓ Titrage du JEV dans le surnageant à J2 pi (1^{ier} protocole)

Nous avons souhaité valider ces résultats par le calcul du titre infectieux dans le surnageant des différents puits prélevés à J2 pi. Une diminution significative des titres infectieux a été observée entre le NT ($2,7 \times 10^5$ TCID₅₀/ml) et l'IFN β (< 100 TCID₅₀/ml ; $p < 0,0001$), le bréquinar (< 100 TCID₅₀/ml ; $p < 0,0001$), mais aussi le sr1057 à 10 μ g/ml ($8,4 \times 10^3$ TCID₅₀/ml ; $p < 0,05$) et 20 μ g/ml ($6,3 \times 10^3$ TCID₅₀/ml ; $p < 0,05$). Le titre infectieux des surnageants JEV est au moins 30 fois inférieur pour les puits traités avec le sr1057 à 20 μ g/ml et 10 μ g/ml par rapport aux cupules non traitées (figure 48).

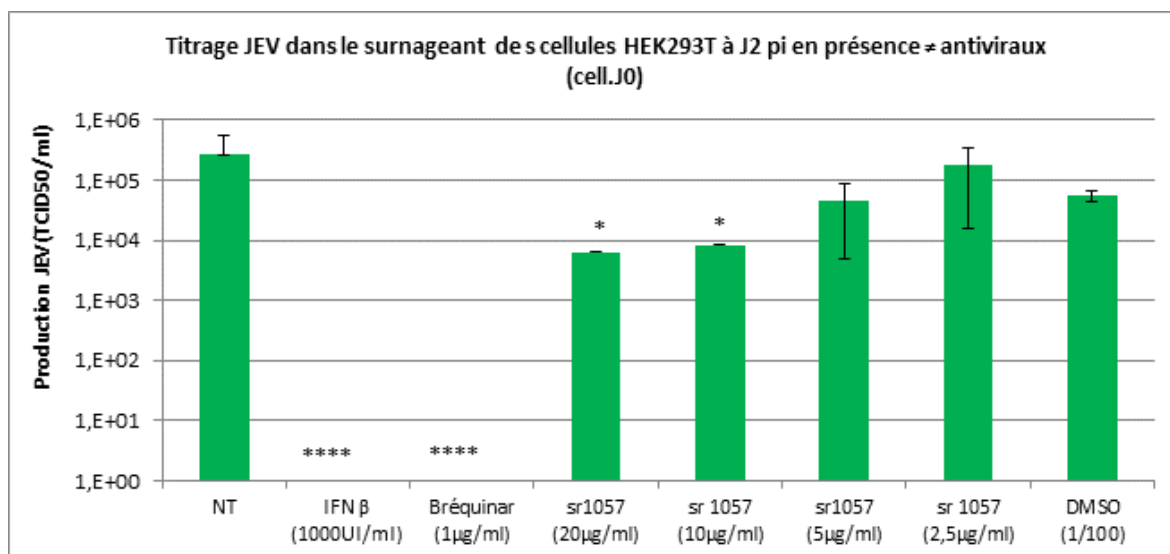


Figure 48 : Titrage de l'infection JEV des cellules HEK293T à J2 pi en présence de différents antiviraux (cellules HEK distribuées à J0).

Inhibition estimée à J2 pi par titrage sur cellules Vero des surnageants des puits infectés par le JEV et traités par différentes concentrations de sr1057.

La moyenne du titre infectieux obtenu sur des surnageants testés en duplicats est représentée (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** = $p < 0,0001$).

Conclusion : Le sr1057 à la concentration de 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$ présente un effet antiviral significatif contre le JEV sur des cellules HEK293T et permet de réduire la réplication virale, avec des titres infectieux bien plus faibles dans les surnageants traités avec ces doses de sr1057 par rapport aux puits non traités à J2 pi.

- ✓ Quantification du génome dans le surnageant de cellules HEK293T déposées à J-1 avant traitement par les antiviraux (2nd protocole)

Nous avons caractérisé dans un second temps les propriétés antivirales du sr1057 contre le JEV sur cellules HEK293T préensemencées dans les puits à J-1. Les cellules ont ensuite reçu un prétraitement d'IFN β et sr1057 avant infection JEV (J0-5h), puisque ces conditions de traitement ont été montrées comme les plus efficaces pour le CHIKV.

Ce second protocole a permis d'observer par rapport au NT (5×10^5 copies à J1 et $1,3 \times 10^8$ copies à J2) un effet antiviral très significatif du bréquinar et de l'IFN β à J1 mais surtout à J2 pi (1×10^6 copies pour l'IFN β et $4,6 \times 10^4$ pour bréquinar $p < 0.001$) et un effet antiviral peu marqué du sr1057, qui est

uniquement efficace à la dose de 20µg/ml à J1 ($1,7 \times 10^5$ copies à J1 ; $p < 0.05$ et $4,8 \times 10^7$ à J2 pi ; $p < 0.05$) (figure 49).

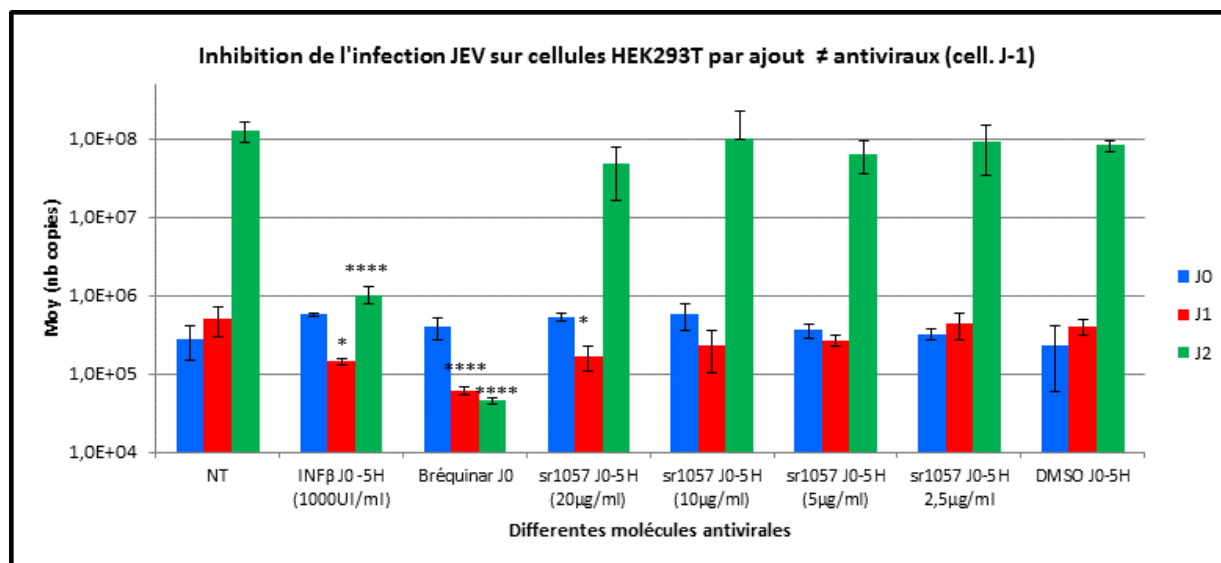


Figure 49 : Inhibition de l'infection JEV des cellules HEK293T distribuées à J-1 par l'ajout d'antiviraux

Quantification par RTPCR en temps réel sur 5µl d'éluât des génomes viraux JEV présents dans les surnageants de culture à J0, J1 et J2 pi sur cellules déposées dans les puits à J-1

Le graphique représente Moy (nb copies) calculée à partir des données obtenues sur 3 répliquats à partir de la RT-PCR en temps réel développée par Yang et al [341] (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

Conclusion : cet essai confirme l'importance, sur deux familles virales différentes (*Togaviridae* et *Flaviviridae*), de l'état physiologique des cellules pour l'action antivirale de la molécule sr1057.

3.1.2.3.3. Le sr1057 a une activité modeste sur la réplication du WNV

Nous avons enfin effectué l'infection des cellules HEK 293T avec le WNV, souche Italie 2008 à 0.01 MOI dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment avec le JEV.

- ✓ Quantification du génome WNV dans le surnageant de cellules HEK293T traitées directement par les antiviraux (1^{er} protocole)

Le sr1057 diminue significativement la quantité de génomes viraux WNV dans les surnageants des cellules traitées pour toutes les concentrations de sr1057 testées à J2 pi. Cependant la réduction du nombre de copies dans les puits traités par le sr1057 ($1,3 \times 10^3$ copies pour sr1057 à 20µg/ml) n'atteint pas une réduction d'un log(10) par rapport aux témoins non traités (10^4 copies). De plus,

comme pour le CHIKV, un effet antiviral du DMSO est observé à la dilution au 1/100 correspondant à la dilution de DMSO utilisée pour la préparation du sr1057 à 20µg/ml (figure 50).

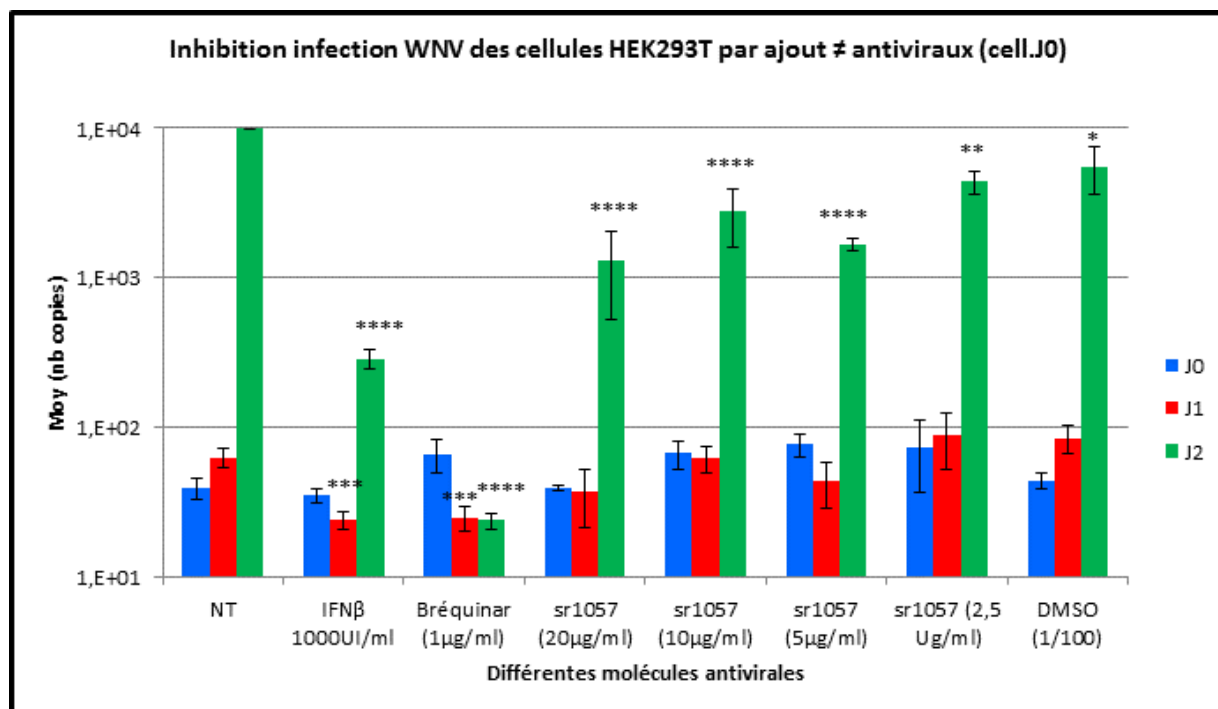


Figure 50 : Inhibition de l'infection WNV des cellules HEK293T distribuées à J0 par l'ajout d'antiviraux

Quantification par RTPCR en temps réel sur 5µl d'éluât des génomes viraux WNV présents dans les surnageants de culture à J0, J1 et J2 pi sur cellules déposées dans les puits au moment de l'infection (0h avant infection). Le graphique représente la Moy (nb copies d'ARN viral) calculée à partir des données obtenues sur 3 répliquats à partir de la RT-PCR en temps réel développée par Linke et al [243] (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

La détermination des titres infectieux dans les surnageants prélevés à J2 pi apporte des informations cohérentes avec les mesures de quantification du génome viral, à savoir une réduction faible du titre viral WNV dans les puits traités par le sr1057 quelle que soit la concentration utilisée, réduction qui n'est cependant pas suffisante pour être statistiquement significative (figure 51).

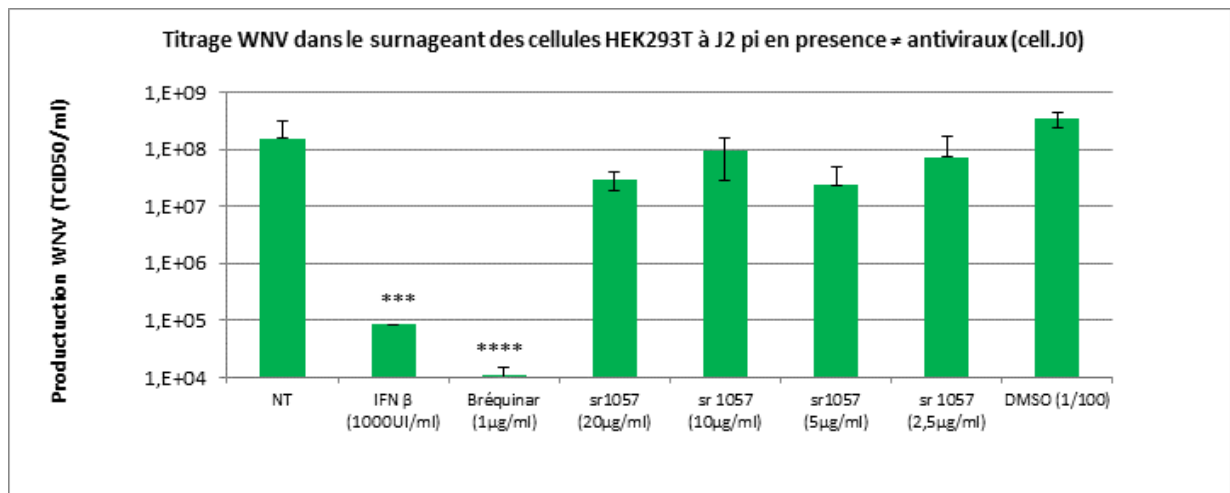


Figure 51 : Titration de l'infection WNV des cellules HEK293T à J2 pi en présence de différents antiviraux (cellules HEK distribuées à J0).

Inhibition estimée à J2 pi par titrage sur cellules Vero des surnageants des puits infectés par le WNV et traités par différentes concentrations de sr1057.

La moyenne du titre infectieux obtenu sur 2 réplicats est représentée (avec * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** = $p < 0,0001$).

Conclusion : L'effet antiviral du sr1057 sur le WNV, souche Italie 2008, est peu marqué même pour une forte concentration de drogue sur les cellules HEK293T non adhérentes.

- ✓ Quantification du génome WNV dans le surnageant de cellules HEK293T déposées 1 jour avant traitement par les antiviraux (2nd protocole)

Des essais sur cellules déposées à J-1 ont aussi été réalisés avec le WNV mais comme pour le JEV et le CHIKV, le pourcentage de réduction du génome viral en présence de sr1057 est beaucoup plus faible sur cellules déposées à J-1 que celui trouvé sur cellules déposées à J0 quelle que soit la concentration en antiviral testée (figure 52).

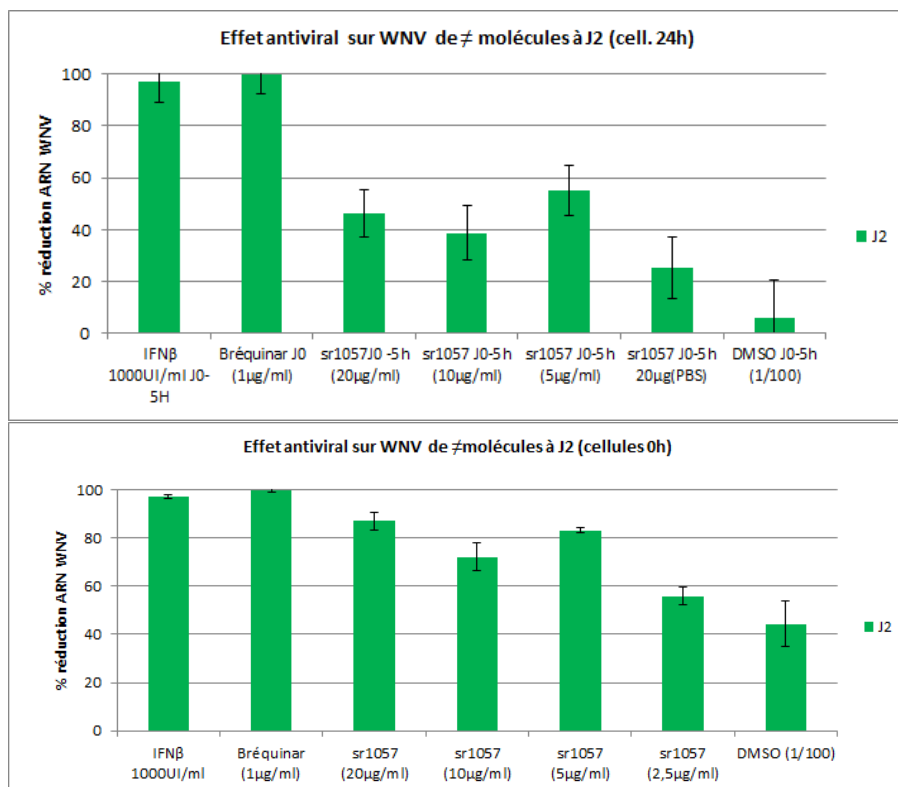


Figure 52 : Comparaison du pourcentage de réduction de l'ARN viral du WNV sur cellules déposées à J-1 ou J0 avant traitement par le sr1057

Conclusion : Comme pour le JEV, l'état physiologique des cellules au moment du traitement est important pour l'activité antivirale du sr1057.

3.1.2.4. Discussion et conclusion

Nous avons démontré que le sr1057 a un effet antiviral marqué sur le CHIKV avec une IC_{50} entre **5-10μg/ml** à J2 pi par la technique de titrage en $TCID_{50}$ quand les cellules sont distribuées de manière concomitante à la molécule (1^{er} protocole).

L'efficacité du sr1057 est de plus dépendante de son solvant, le sr1057 solubilisé dans le DMSO apparaît plus efficace sur les virus testés que le sr1057 dilué dans du PBS (données non fournies). Ce résultat n'est pas surprenant, le DMSO étant souvent utilisé comme solvant de médicaments du fait de sa capacité à transporter efficacement les molécules à travers des membranes cellulaires [343].

L'efficacité du sr1057 n'est pas due à la cytotoxicité de la molécule, la CC_{50} calculée étant de l'ordre de **30μg/ml** à J2 après traitement. Néanmoins, même s'il n'y a pas de mort cellulaire, l'observation des cellules au microscope optique à J0+24h et J0+48h permet d'objectiver des modifications

morphologiques importantes avec des cellules arrondies et en amas (figure 53). Ces changements morphologiques pourraient être préjudiciables à la bonne tolérance de la molécule *in vivo*.

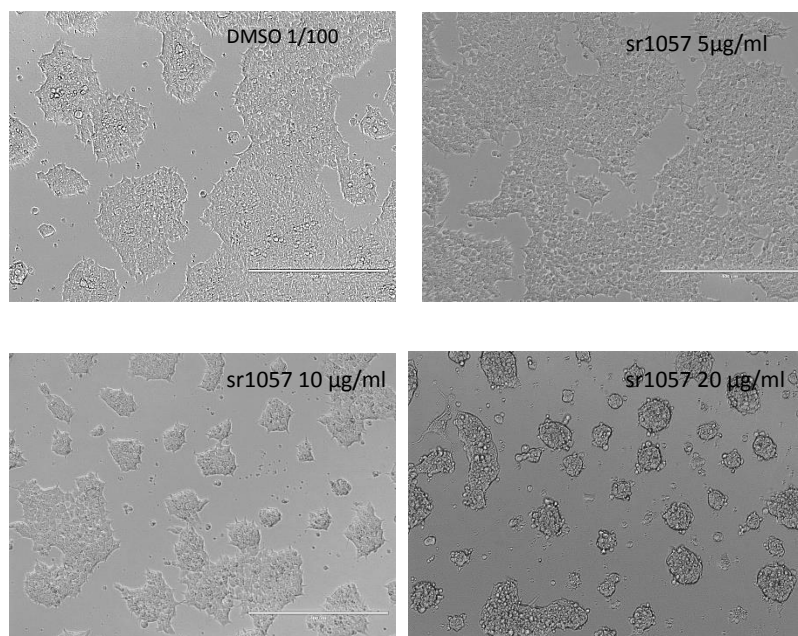


Figure 53 : Visualisation des cellules HEK293T incubées depuis 48 heures avec du sr1057 à 5, 10 et 20µg ou du DMSO et infectées avec CHIKV à 0.0001 MOI au microscope optique

Quand les cellules sont distribuées dans les puits de culture en même temps que l'antiviral, l'efficacité antivirale du sr1057 dilué dans le DMSO a aussi été démontrée sur le JEV et dans une moindre mesure sur le WNV, l' IC_{50} pour ces deux virus n'ayant néanmoins pas pu être calculée. La souche WNV utilisée est une souche de lignée 1 responsable des foyers italiens de 2008. Sa virulence en modèle murin d'infection est équivalente à celles de souches mieux caractérisées de lignée 1 comme Is98 ou NY99 (Perez-Ramirez et al, JGV, accepté). En revanche, la souche Nakayama de JEV (génotype III) a été isolée à partir d'un patient infecté au Japon en 1935. Il est donc difficile de savoir si cette souche est aussi virulente que celles qui circulent actuellement en Asie. De plus, sachant que le génotype I a été introduit récemment en Inde et qu'il est en train de supplanter le génotype III dans de nombreuses régions d'Asie [85, 86], il serait intéressant de tester l'efficacité du sr1057 contre des souches terrain récentes de génotype I et III.

Il a été aussi constaté au cours de de notre étude que le moment d'administration du sr1057 sur les cellules HEK293T est primordial pour son efficacité contre les virus CHIKV, WNV et JEV. Même si nous ne connaissons pas le mode d'action de la molécule, nous pouvons formuler certaines hypothèses.

Le sr1057 semble cibler des facteurs cellulaires étant donné qu'il est efficace contre de nombreux virus de différentes familles. De plus, cette efficacité semble dépendante de l'état de quiescence des

cellules. En effet, les cellules déposées sur une plaque multi-puits mettent environ 12 heures à entrer en division alors que des cellules distribuées depuis 24 heures sont en pleine phase de croissance. On peut donc faire l'hypothèse que le sr1057 influe sur un facteur lié à la réplication cellulaire et virale. Cette modification de l'efficacité des antiviraux sur les *flavivirus* en fonction de l'état de croissance des cellules a été aussi démontrée pour la ribavirine qui est efficace sur cellules confluentes mais pas sur cellules en multiplication [313]. Cependant, dans sa thèse, Samira Khier a démontré que l'ajout d'uridine dans le milieu de culture n'a pas d'impact sur l'activité antivirale du composé sr1057, concluant que la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines n'est pas la cible du sr1057 [330]. De même il a été démontré que le sr1057 ne semble pas être un inhibiteur des kinases cellulaires. Le mode d'action de ce composé est donc inconnu à ce jour.

3.2 Discussion générale et perspectives

3.2.1 Nouvelles stratégies diagnostiques des *flavivirus* neurotropes

3.2.1.1 Diagnostic des *flavivirus* neurotopes par méthode MIA

Perçues à l'origine comme des maladies exotiques, les infections arbovirales sont maintenant une préoccupation majeure en Europe et aux Etats Unis dans le domaine de la santé publique et vétérinaire.

En Europe, une co-circulation de différents *flavivirus* est objectivée dans de nombreux pays. Ainsi en France, les *flavivirus* USUV ou WNV ont émergé (USUV) ou ré-émergé (WNV) conjointement en 2015 [61, 135] (annexe 1). De plus, il faut rester vigilant sur l'introduction possible d'un nouveau *flavivirus* par le biais principalement des oiseaux sauvages ou des échanges internationaux d'animaux et de marchandise, qui ont considérablement augmenté au cours de ces dernières décennies et qui constituent de potentielles sources d'introduction d'animaux virémiques ou de vecteurs infectés [131].

Le diagnostic des infections à *flavivirus* est complexe du fait de la non-spécificité des symptômes neurologiques chez les animaux infectés, d'une virémie brève limitant l'utilisation des méthodes directes, en particulier des méthodes moléculaires, et de l'existence de réactions sérologiques croisées compliquant le diagnostic sérologique différentiel.

Face à ces différentes contraintes, le développement de méthodes multi-analytiques sérologiques, permettant de cibler les différents *flavivirus* en un seul test, est une réponse de choix.

Nous avons donc développé une méthode MIA basée sur l'utilisation des antigènes recombinants spécifiques des *flavivirus* zoonotiques responsables de maladies neurologiques chez les équidés et les ovins. Notre méthode permet la capture spécifique d'anticorps dirigés contre le WNV, JEV ou TBEV chez le cheval ou LIV chez les ovins avec une sensibilité et spécificité comparables à la méthode ELISA suivie d'une analyse par SNT ou HIT (LIV).

Les nombreux avantages de la technologie MIA développée, à savoir son caractère multiplexe, la possibilité de manipuler les échantillons en laboratoire non confiné, la faible quantité de sérum nécessaire (1µl) et un temps d'exécution très court (< 3 heures comparé aux 3-6 jours pour la méthode SNT) plaident en faveur de sa mise en place dans les laboratoires européens de référence.

Cette méthode rapide et multiplexe est particulièrement adaptée pour les études séro-épidémiologiques et les études de surveillance.

Cependant, si on considère le contexte épidémiologique actuel des *flavivirus* européens, il serait intéressant d'ajouter à minima un antigène pour le *flavivirus* USUV [61]. En effet, même si ce *flavivirus* ne semble pas être responsable de symptômes neurologiques chez le cheval, sa diffusion rapide en Europe de l'Ouest en 2015 et 2016 et son potentiel pouvoir pathogène chez l'homme [65, 66] nécessiteraient de suivre son évolution spatio-temporel et de pouvoir le distinguer sérologiquement du WNV.

Nous avons réalisé dans cette optique des tests au laboratoire avec une méthode MIA en 5 plex (WNV.sE, JEV.EDIII, WNV.EDIII, TBEV.EDIII et USUV.EDIII aimablement transmis par l'IP) sur les sérums de chevaux trouvés positifs en IgG contre le JEV, WNV et TBEV et testés dans le manuscrit N°3. Nous avons la contrainte de ne pas posséder de sérums équins terrain correctement caractérisés positifs en anticorps anti-USUV. Sur les 101 sérums JEV positifs, cinquante ont été trouvés positifs en USUV (résultats non présentés) par méthode MIA. Les réactions sérologiques croisées entre les antigènes JEV.EDIII et USUV.EDIII ne permettent donc pas la distinction des anticorps induits après infection JEV et USUV. Les EDIII de JEV et USUV sont très proches génétiquement (homologie de séquences en AA de JEV.EDIII par rapport à USUV.EDIII de 85% contre 75 % entre WNV.EDIII et JEV.EDIII, après analyse NCBI Blastp). Des sérums équins trouvés JEV.EDIII positifs en Europe pourraient donc correspondre à une réaction sérologique croisée avec USUV. Dans ce cas de figure, une SNT avec les virus JEV et USUV est donc encore nécessaire pour poser un diagnostic de certitude dans le cadre d'infections équine suspectes à USUV ou JEV. Une solution pour pallier à ce manque de spécificité de l'analyse des réponses contre les billes USUV.EDIII et JEV.EDIII serait d'ajouter d'autres antigènes comme JEV.NS1 et USUV.NS1 à notre méthode MIA multiplexe et de comparer les réactions des sérums vis-à-vis des couples de billes NS1 et EDIII pour chaque virus.

Le même cas de figure se retrouve avec les sérums ovins LIV positifs qui « cross-réagissent » avec les antigènes TBEV.EDIII et LIV.EDIII (cf. 3.1.1.3). On touche ici aux limites de la méthode MIA quand elle est utilisée sur des virus très proches sur le plan antigénique.

Un second axe de recherche intéressant à développer serait de s'affranchir de la révélation par un anticorps secondaire anti-espèce, ce qui permettrait de disposer d'un protocole MIA multi-espèces. Ce point est d'autant plus intéressant pour les *flavivirus* à réservoirs aviaires car l'on dénombre un grand nombre d'espèces d'oiseaux importantes dans l'épidémiologie de ces infections. De plus cette nouvelle méthode sans anticorps secondaire serait capable de révéler la présence d'isotypes variés d'anticorps (IgG, IgM,...) et serait de ce fait plus proche des caractéristiques de la méthode SNT. Enfin le faible volume de sérum nécessaire pour la technique MIA est un avantage indéniable, en

particulier chez les oiseaux où les prélèvements sanguins sont difficiles à réaliser et souvent en petite quantité.

Lors du stage de Master II d'Audrey Gabassi, nous avons mis au point une technologie MIA avec des antigènes biotinylés comme révélateur de la liaison antigènes/anticorps (figure 54). Cette stratégie a déjà été employée avec succès au laboratoire pour l'étude d'autres maladies vectorielles comme la fièvre catarrhale ovine [344].

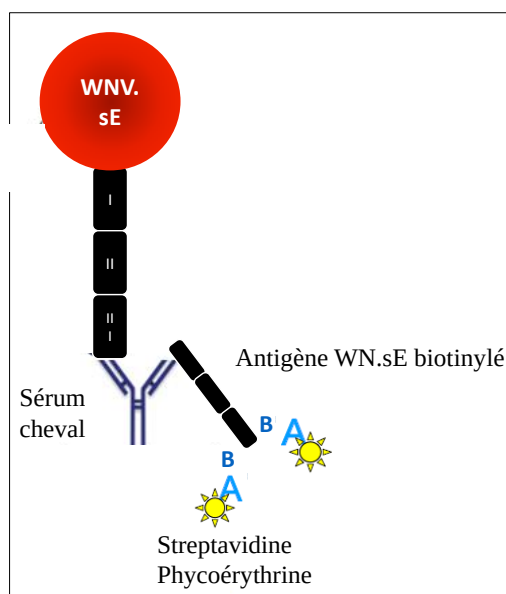


Figure 54 : Méthode MIA par biotinylation des antigènes

Les premiers résultats pour le diagnostic des *flavivirus* ont été en demi-teinte. Nous avons testé un panel de sérums équins positifs en IgG ou IgM anti-WNV. La méthode présente une bonne sensibilité et spécificité pour WNV.sE (Se=92.6% et Sp= 97.4%) mais manque de sensibilité pour WNV.EDIII (Se= 34% et Sp =97.4%)[345]. Ce manque de sensibilité pourrait provenir de la petite taille des EDIII (≈ 30 kDa), qui ne seraient pas correctement biotinylés ou des épitopes EDIII qui seraient en partie masqués par la biotine. L'emploi, en tant qu'anticorps secondaires, de protéines G ou A biotinylées, protéines qui reconnaissent les Ig de nombreuses espèces pourraient être une autre alternative à tester.

Enfin, un dernier axe de recherche serait de mettre en place un test MIA sur sérums équins pour un diagnostic syndromique des encéphalites équine virales. Alors qu'elles représentent la quatrième cause de mortalité chez le cheval, les affections nerveuses virales sont pourtant peu diagnostiquées [346]. Les raisons principales sont une symptomatologie fruste associée à une diversité des agents étiologiques en cause. En effet celles-ci peuvent être causées par de nombreux virus : virus de la rage, *flavivirus* (WNV, JEV, LIV et TBEV), herpès virus équin de type 1 (HVE1), virus de borna, virus de

l'encéphalose équine et encéphalites équines exotiques (encéphalites équines de l'Est, de l'Ouest et vénézuélienne) [347]. Il serait ainsi intéressant d'analyser en parallèle la réponse anticorps contre les différents virus responsables d'encéphalites chez le cheval et de s'affranchir d'une approche par agent étiologique isolé. La synthèse des différents antigènes ainsi que la récolte de sérums positifs pour les différents virus est en cours au laboratoire.

Trouver la cause de l'encéphalite nécessite obligatoirement d'avoir recours à un diagnostic direct ou indirect de l'infection et la confirmation de l'infection virale fait appel à des outils de détection variables en fonction du virus recherché.

Pour la rage et la maladie de Borna, seule une analyse post-mortem à partir du cerveau du cheval malade par histologie (rage), par immunohistochimie (rage + Borna) et/ou PCR (Borna) permet un diagnostic de certitude. De même pour l'HVE1, la forte prévalence du virus dans la population équine ainsi que sa persistance à l'état latent, nécessite le recours à la PCR pour établir un diagnostic de certitude. Concernant les virus à transmission vectorielle (encéphalose équine, WNV et *flavivirus* apparentés, encéphalites équines à alphavirus), la détection directe (PCR ou isolement viral) ou la mise en évidence des IgM par ELISA de capture sont les méthodes de choix pour le diagnostic de confirmation.

Notre test « MIA syndromique », qui détecte la présence d'IgG dans le sérum, donnerait donc une orientation du diagnostic mais ne permettrait pas de s'affranchir des méthodes citées ci-dessus. Pour être plus performant dans ce contexte, ce test devrait évoluer, en particulier pour les virus à transmission vectorielle, vers un MIA détectant les IgM. La faisabilité de détecter les IgM par MIA est en cours d'étude dans notre laboratoire.

3.2.1.2 MIA et vaccination

Circulation endémique du WNV dans des pays européens de plus en plus nombreux et vaccination conjointe contre WNV d'une partie de la population équine (surtout importante à l'heure actuelle en Italie et en Hongrie) posent de nouveaux défis et nécessitent le développement de nouveaux outils sérologiques, pour assurer la distinction entre chevaux vaccinés et infectés. Ce point est d'autant plus important chez le cheval qui est une espèce sentinelle de l'infection à WNV.

Des études précédentes ont démontré la faisabilité d'une telle distinction pour les infections équines et humaines à JEV après vaccination par un vaccin inactivé JEV [348, 349]. Notre étude montre à l'inverse que l'utilisation du vaccin WNV inactivé (Equip® WNV de la firme Zoétis) induit des anticorps anti-NS1 chez le cheval quand il est utilisé sur le terrain suivant les recommandations du fabricant, constatation qui avait déjà été établie par deux précédentes études [291, 350].

Une distinction entre animaux infectés et vaccinés avec le vaccin inactivé pourrait dès lors s'appuyer uniquement sur la mise en évidence d'une réponse IgM spécifique d'une infection récente (manuscrit N°2). Lors de l'épizootie 2015, le diagnostic d'infection à WNV s'est avant tout appuyé sur la mise en évidence des IgM chez le cheval [135] (annexe 1). Cependant, concernant la vaccination, les positions divergent mais il semble, au vu des articles les plus récents, qu'une réaction IgM transitoire puisse être détectée après vaccination en particulier avec le vaccin inactivé [269](annexe 1) mais aussi après vaccination avec le Proteq® West Nile (données personnelles). En présence d'IgM dans le sang, on ne peut donc avec certitude faire un diagnostic d'infection à WNV dans une population de chevaux vaccinés.

Nous avons montré lors de notre enquête que la distinction est possible avec le vaccin recombinant Proteq® West Nile de la firme Merial qui n'exprime pas l'antigène NS1. Le recours à ce type d'approche vaccinale faciliterait donc le volet équin de la surveillance WNV en France et en Europe. Le vaccin chimérique YFV-WNV (Equilis® West Nile d'Intervet) qui n'a pas été utilisé en France lors de l'épizootie 2015, devrait pouvoir offrir les mêmes avantages que le vaccin recombinant canarypox pour un diagnostic DIVA (protéine E de WNV mais NS1 de YFV). Cependant il faudrait s'assurer de l'absence de réactions sérologiques croisées sur les antigènes WNV.NS1 causées par des anticorps anti-NS1 YFV produits après vaccination. Un premier élément de réponse se trouve dans l'article de N. Cleton qui a montré avec la technique de « *micro-array NS1* » que les réactions sérologiques croisées entre les IgG anti NS1-YFV et les IgG anti-NS1-WNV étaient très limitées chez l'homme [282]. Nous souhaiterions dans un avenir proche tester les sérums de chevaux vaccinés par le vaccin Equilis® West Nile afin de confirmer cette assertion.

3.2.2 Nouvelles stratégies thérapeutiques des flavivirus neurotropes

A l'heure actuelle, les infections virales représentent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale et pourtant notre arsenal thérapeutique reste très limité. Concernant les médicaments antiviraux ayant une AMM, leur spectre d'activité est souvent très étroit car ils ne ciblent qu'une protéine virale (ex : inhibiteur de protéases) ou la réplication virale (ex : inhibiteur de la transcriptase inverse, analogues nucléosidiques...). Or les virus à ARN, qui sont les principaux virus impliqués dans les phénomènes d'émergence, sont des virus instables avec de nombreuses mutations générées par les erreurs de l'ARN polymérase. Soumis à la pression d'antiviraux spécifiques, une évolution et sélection des virus s'opèrent et sont responsables de phénomènes de résistance au traitement [318]. La difficulté est encore accrue lors d'émergence d'un nouveau virus pour lequel aucun traitement spécifique n'est immédiatement utilisable.

La stratégie qui consiste à cibler un facteur cellulaire essentiel à la réplication de virus appartenant à différentes familles est donc séduisante car elle permettrait d'agir contre de nombreux virus et de contourner l'obstacle des résistances au traitement. Une grande limite reste néanmoins la toxicité éventuelle des molécules sélectionnées en fonction de la cible cellulaire visée par l'antiviral.

Pour identifier des antiviraux ciblant l'hôte, la mise en place d'un test de criblage est une stratégie originale qui s'appuie sur un nouveau concept d'approche empirique. En effet, on évalue d'abord l'efficacité de la molécule sur la réplication virale de plusieurs familles virales dans un système cellulaire donné et, en fonction des résultats, on identifie par la suite la cible cellulaire. Cette technique a montré son efficacité en terme de découverte de nouvelles molécules [351]. Le système de criblage mis en place par l'unité G2V de l'IP, basé sur la combinaison d'infections *in vitro* par les virus recombinants rMV2/Luc et CHIKV/Ren exprimant la luciférase comme rapporteur de la réplication virale, répond à ce principe. Le composé sr1057, sélectionné par ce test parmi 4640 composés du CERMN, est donc actif, même si on ne connaît pas son mode d'action, contre de nombreux virus à ARN (ex : CHIKV, MV et JEV) appartenant à aux moins trois familles différentes (*Togaviridae*, *Paramyxoviridae* et *Flaviviridae*). D'autres essais dans d'autres équipes ont montré en outre qu'il était efficace *in vitro* contre d'autres virus à ARN comme le virus Ebola (équipe de Sylvain Blaize, laboratoire P4 de Lyon) ou l'artérite virale (Aymeric Hans, ANSES Dozulé) appartenant respectivement aux familles des *Filoviridae* et *Arteriviridae* mais aussi contre des virus à ADN comme l'herpès virus équin de type 1 (équipe de Stéphane Pronost, Labéo Frank Duncombe) ou l'herpès virus humain de type 1 (Laboratoire de Marianne Lucas-Hourani, IP) [330]. Il ne fait donc aucun doute que cette molécule présente un large spectre antiviral.

Néanmoins de nombreux écueils restent à surmonter. Le premier est son index de sélectivité modeste pour le CHIKV ($CC_{50}/IC_{50}=17$ à J1 pi dans le modèle de l'IP et CC_{50}/IC_{50} de l'ordre de 4 à J2 dans notre modèle) et sa faible efficacité pour les *flavivirus* JEV et WNV. Le second est sa demi-vie dans le sang (estimée à 9 minutes) ainsi que sa stabilité métabolique sur les microsomes du foie (estimée à seulement 6 minutes) très courtes, ce qui suggère que cette molécule serait rapidement dégradée *in vivo*. L'amélioration de sa pharmacologie est donc primordiale avant de débiter les tests *in vivo* sur souris. Cependant, la recherche d'analogues de la molécule plus actifs, moins cytotoxiques et plus stables métaboliquement a pour l'instant été infructueuse.

Une autre piste à envisager serait d'étudier les effets synergiques du composé sr1057 quand il est associé à d'autres molécules antivirales bien caractérisées (ex sr1057+ analogues nucléosidiques ou sr1057+ bréquinar ou sr1057 + inhibiteurs des cyclophilines...). De telles combinaisons permettraient en effet de limiter les effets cytotoxiques associés à une molécule en diminuant les concentrations utilisées et d'éviter des phénomènes d'échappement du virus en ciblant plusieurs étapes de son cycle répliatif.

BIBLIOGRAPHIE

1. Chua, K.B. and D.J. Gubler, *Perspectives of public health laboratories in emerging infectious diseases*. Emerg Microbes Infect, 2013. **2**(6): p. e37.
2. Jessica, V., *Approches moléculaires et sérologiques appliquées à la détection et à la caractérisation des pathogènes émergents et des infections associées*. Thèse de Doctorat 2013.
3. Kilpatrick, A.M. and S.E. Randolph, *Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases*. Lancet, 2012. **380**(9857): p. 1946-55.
4. Jones, K.E., et al., *Global trends in emerging infectious diseases*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 990-3.
5. Woolhouse, M.E., *Population biology of emerging and re-emerging pathogens*. Trends Microbiol, 2002. **10**(10 Suppl): p. S3-7.
6. Taylor, L.H., S.M. Latham, and M.E. Woolhouse, *Risk factors for human disease emergence*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1411): p. 983-9.
7. Mackenzie, J.S., D.J. Gubler, and L.R. Petersen, *Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses*. Nat Med, 2004. **10**(12 Suppl): p. S98-109.
8. Bakonyi, T., et al., *Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009*. Vet Microbiol, 2013. **165**(1-2): p. 61-70.
9. Weaver, S.C. and A.D. Barrett, *Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 789-801.
10. Musso, D., *Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(10): p. 1887.
11. Possas, C., *Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil*. Epidemiol Health, 2016. **38**: p. e2016023.
12. ICTV, <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. 2015.
13. Gaunt, M.W., et al., *Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 8): p. 1867-76.
14. Cook, S., et al., *Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 2): p. 223-34.
15. Mackenzie, J.S., A.D. Barrett, and V. Deubel, *The Japanese encephalitis serological group of flaviviruses: a brief introduction to the group*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **267**: p. 1-10.
16. Christensen, H.A., A.M. de Vasquez, and M.M. Boreham, *Host-feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from central Panama*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **55**(2): p. 202-8.
17. Beck, C., et al., *Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(11): p. 6049-83.
18. Clarke, D.H. and J. Casals, *Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses*. Am J Trop Med Hyg, 1958. **7**(5): p. 561-73.
19. Calisher, C.H., et al., *Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera*. J Gen Virol, 1989. **70** (Pt 1): p. 37-43.
20. De Madrid, A.T. and J.S. Porterfield, *The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study*. J Gen Virol, 1974. **23**(1): p. 91-6.
21. Poidinger, M., R.A. Hall, and J.S. Mackenzie, *Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus*. Virology, 1996. **218**(2): p. 417-21.
22. McLean, R.G., et al., *West Nile virus transmission and ecology in birds*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. **951**(1): p. 54-57.

23. Goddard, L.B., et al., *Vertical transmission of west nile virus by three california Culex (Diptera: Culicidae) species*. Journal of medical entomology, 2003. **40**(6): p. 743-746.
24. Nasci, R.S., et al., *West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City, 2000*. Emerging infectious diseases, 2001. **7**(4): p. 742.
25. Bahuon, C., S. Lecollinet, and C. Beck, *West Nile Virus Infection*. eLS. John Wiley & Sons, 2015.
26. Filipe, A.R. and M.R. Pinto, *Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal*. Am J Trop Med Hyg, 1969. **18**(3): p. 423-6.
27. Joubert, L., et al., *[Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]*. Ann Inst Pasteur (Paris), 1970. **118**(2): p. 239-47.
28. Ceianu, C.S., et al., *West nile virus surveillance in Romania: 1997-2000*. Viral Immunol, 2001. **14**(3): p. 251-62.
29. Autorino, G.L., et al., *West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(12): p. 1372-8.
30. Murgue, B., et al., *West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(4): p. 692-6.
31. CDC, <http://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/index.html>. 2015.
32. Papa, A., et al., *Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010*. Euro Surveill, 2010. **15**(34).
33. Bakonyi, T., et al., *Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(4): p. 618-23.
34. Platonov, A.E., et al., *[Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results]*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2011(2): p. 29-37.
35. Danis, K., et al., *Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(10): p. 1868-72.
36. Savini, G., et al., *Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy*. Vet Microbiol, 2012. **158**(3-4): p. 267-73.
37. Hernandez-Triana, L.M., et al., *Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease*. Front Public Health, 2014. **2**: p. 271.
38. Bahuon, C. and S. Lecollinet, *Des saisons de transmission du virus West Nile contrastées en Europe – mise à jour au 29 décembre 2014*. 2015-03.
39. Lanciotti, R.S., et al., *Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East*. Virology, 2002. **298**(1): p. 96-105.
40. Venter, M. and R. Swanepoel, *West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2010. **10**(7): p. 659-664.
41. Bakonyi, T., et al., *Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(2): p. 225-31.
42. Pachler, K., et al., *Putative new West Nile virus lineage in Uranotaenia unguiculata mosquitoes, Austria, 2013*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(12): p. 2119-22.
43. Bondre, V.P., et al., *West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 3): p. 875-84.
44. Hall, R.A., J.H. Scherret, and J.S. Mackenzie, *Kunjin virus: an Australian variant of West Nile?* Ann N Y Acad Sci, 2001. **951**: p. 153-60.
45. Fall, G., et al., *Vector competence of Culex neavei and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Senegal for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile virus*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **90**(4): p. 747-54.
46. Pradier, S., et al., *Importance of wetlands management for West Nile Virus circulation risk, Camargue, Southern France*. Int J Environ Res Public Health, 2014. **11**(8): p. 7740-54.

47. Balenghien, T., et al., *Vector competence of some French Culex and Aedes mosquitoes for West Nile virus*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2008. **8**(5): p. 589-95.
48. Komar, N., et al., *Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(3): p. 311-22.
49. Perez-Ramirez, E., F. Llorente, and M.A. Jimenez-Clavero, *Experimental infections of wild birds with West Nile virus*. Viruses, 2014. **6**(2): p. 752-81.
50. Banet-Noach, C., et al., *Phylogenetic relationships of West Nile viruses isolated from birds and horses in Israel from 1997 to 2001*. Virus Genes, 2003. **26**(2): p. 135-41.
51. LaDeau, S.L., A.M. Kilpatrick, and P.P. Marra, *West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations*. Nature, 2007. **447**(7145): p. 710-3.
52. Kilpatrick, A.M., *Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus*. Science, 2011. **334**(6054): p. 323-7.
53. Wodak, E., et al., *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, 2011. **149**(3-4): p. 358-66.
54. Nash, D., et al., *The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999*. N Engl J Med, 2001. **344**(24): p. 1807-14.
55. Pradier, S., S. Lecollinet, and A. Leblond, *West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe*. Rev Sci Tech, 2012. **31**(3): p. 829-44.
56. Weissenböck, H., et al., *Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(7): p. 652-6.
57. Ashraf, U., et al., *Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe*. Viruses, 2015. **7**(1): p. 219-38.
58. Engel, D., et al., *Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa*. MBio, 2016. **7**(1).
59. East asian australasian flyway partnership, <http://www.eaaflyway.net/migratory-waterbirds-in-eaaf/key-species-of-eaafp/>. 2011.
60. Vittecoq, M., et al., *Recent circulation of West Nile virus and potentially other closely related flaviviruses in Southern France*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2013. **13**(8): p. 610-3.
61. Lecollinet, S., et al., *Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(12): p. 2225.
62. Cadar, D., et al., *Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016*. Euro Surveill, 2017. **22**(4).
63. Rijks, J., et al., *Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016*. Euro Surveill, 2016. **21**(45).
64. Cadar, D., et al., *Usutu virus in bats, Germany, 2013*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(10): p. 1771-3.
65. Nikolay, B., et al., *Usutu virus in Africa*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(11): p. 1417-23.
66. Pecorari, M., et al., *First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009*. Euro Surveill, 2009. **14**(50).
67. Santini, M., et al., *First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August-September 2013: clinical and laboratory features*. J Neurovirol, 2015. **21**(1): p. 92-7.
68. Grottola, A., et al., *Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy*. Clin Microbiol Infect, 2017. **23**(1): p. 33-37.
69. Durand, B., et al., *Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species?* Epidemiol Infect, 2016: p. 1-8.
70. Barbic, L., et al., *Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2013. **13**(10): p. 772-4.
71. Digoutte, J., *Bagaza (BAG) Strain: Dak Ar B 209*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1978. **27**(2 Part 2): p. 376-377.
72. Bondre, V.P., et al., *Genetic characterization of Bagaza virus (BAGV) isolated in India and evidence of anti-BAGV antibodies in sera collected from encephalitis patients*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 11): p. 2644-9.

73. Barnard, B.J., et al., *Turkey meningo-encephalitis in South Africa*. Onderstepoort J Vet Res, 1980. **47**(2): p. 89-94.
74. Diallo, M., et al., *Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal*. Med Vet Entomol, 2005. **19**(2): p. 119-26.
75. Fernandez-Pinero, J., et al., *Bagaza virus and Israel turkey meningoencephalomyelitis virus are a single virus species*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 4): p. 883-7.
76. Agüero, M., et al., *Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(8): p. 1498-501.
77. Llorente, F., et al., *Bagaza virus is pathogenic and transmitted by direct contact in experimentally infected partridges, but is not infectious in house sparrows and adult mice*. Vet Res, 2015. **46**: p. 93.
78. Mackenzie, J.S., et al., *Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(3 Suppl): p. 497-504.
79. Pyke, A.T., et al., *The appearance of a second genotype of Japanese encephalitis virus in the Australasian region*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(6): p. 747-53.
80. Scherer, W.F., J.T. Moyer, and T. Izumi, *Immunologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. V. Maternal antibodies, antibody responses and viremia following infection of swine*. J Immunol, 1959. **83**: p. 620-6.
81. Pfeiffer, M. and G. Dobler, *Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration*. Parasit Vectors, 2010. **3**(1): p. 35.
82. Ricklin, M.E., et al., *Vector-free transmission and persistence of Japanese encephalitis virus in pigs*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10832.
83. Misra, U.K. and J. Kalita, *Overview: Japanese encephalitis*. Prog Neurobiol, 2010. **91**(2): p. 108-20.
84. Schuh, A.J., et al., *Phylogeography of Japanese encephalitis virus: genotype is associated with climate*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(8): p. e2411.
85. Schuh, A.J., et al., *Dynamics of the emergence and establishment of a newly dominant genotype of Japanese encephalitis virus throughout Asia*. J Virol, 2014. **88**(8): p. 4522-32.
86. Fulmali, P.V., et al., *Introduction of Japanese encephalitis virus genotype I, India*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(2): p. 319-21.
87. Platonov, A., et al., *Does the Japanese encephalitis virus (JEV) represent a threat for human health in Europe? Detection of JEV RNA sequences in birds collected in Italy*. Euro Surveill, 2012. **17**(32).
88. Ravanini, P., et al., *Japanese encephalitis virus RNA detected in Culex pipiens mosquitoes in Italy*. Euro Surveill, 2012. **17**(28).
89. Solomon, T. and P.M. Winter, *Neurovirulence and host factors in flavivirus encephalitis--evidence from clinical epidemiology*. Arch Virol Suppl, 2004(18): p. 161-70.
90. Satou, K. and H. Nishiura, *Evidence of the partial effects of inactivated Japanese encephalitis vaccination: analysis of previous outbreaks in Japan from 1953 to 1960*. Ann Epidemiol, 2007. **17**(4): p. 271-7.
91. Kramer, L.D. and L.J. Chandler, *Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus*. Arch Virol, 2001. **146**(12): p. 2341-55.
92. May, F.J., et al., *Genetic variation of St. Louis encephalitis virus*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 8): p. 1901-10.
93. Vazquez, A., et al., *Putative new lineage of west nile virus, Spain*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(3): p. 549-52.
94. Reimann, C.A., et al., *Epidemiology of neuroinvasive arboviral disease in the United States, 1999-2007*. Am J Trop Med Hyg, 2008. **79**(6): p. 974-9.
95. Rosa, R., et al., *Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(11): p. e2537.

96. Williams, D.T., et al., *The Molecular Epidemiology and Evolution of Murray Valley Encephalitis Virus: Recent Emergence of Distinct Sub-lineages of the Dominant Genotype 1*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(11): p. e0004240.
97. Lobigs, M., et al., *Genetic differentiation of Murray Valley encephalitis virus in Australia and Papua New Guinea*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1986. **64** (Pt 6): p. 571-85.
98. Knox, J., et al., *Murray Valley encephalitis: a review of clinical features, diagnosis and treatment*. Med J Aust, 2012. **196**(5): p. 322-6.
99. Gordon, A.N., et al., *Confirmed case of encephalitis caused by Murray Valley encephalitis virus infection in a horse*. J Vet Diagn Invest, 2012. **24**(2): p. 431-6.
100. Gard, G.P., et al., *Association of Australian arboviruses with nervous disease in horses*. Aust Vet J, 1977. **53**(2): p. 61-6.
101. Suss, J., *Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview*. Ticks Tick Borne Dis, 2011. **2**(1): p. 2-15.
102. Jaaskelainen, A.E., et al., *Tick-borne encephalitis virus in ticks in Finland, Russian Karelia and Buryatia*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 11): p. 2706-12.
103. Lindquist, L. and O. Vapalahti, *Tick-borne encephalitis*. Lancet, 2008. **371**(9627): p. 1861-71.
104. Zanotto, P.M., et al., *An arbovirus cline across the northern hemisphere*. Virology, 1995. **210**(1): p. 152-9.
105. Hubalek, Z. and I. Rudolf, *Tick-borne viruses in Europe*. Parasitol Res, 2012. **111**(1): p. 9-36.
106. Randolph, S.E., L. Gern, and P.A. Nuttall, *Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission*. Parasitol Today, 1996. **12**(12): p. 472-9.
107. Labuda, M., et al., *Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts*. Med Vet Entomol, 1993. **7**(2): p. 193-6.
108. Dumpis, U., D. Crook, and J. Oksi, *Tick-borne encephalitis*. Clinical Infectious Diseases, 1999. **28**(4): p. 882-890.
109. Holzmann, H., et al., *Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(10): p. 1671-3.
110. Kaiser, R., *Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical course of the disease*. Int J Med Microbiol, 2002. **291** Suppl 33: p. 58-61.
111. Waldvogel, A., et al., *[Tick-borne encephalitis in the horse]*. Schweiz Arch Tierheilkd, 1981. **123**(5): p. 227-33.
112. Rushton, J.O., et al., *Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(4): p. 635-7.
113. Hubalek, Z., et al., *Antigenic similarity of central European encephalitis and louping-ill viruses*. Acta Virol, 1995. **39**(5-6): p. 251-6.
114. Grard, G., et al., *Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy*. Virology, 2007. **361**(1): p. 80-92.
115. Balseiro, A., et al., *Louping ill in goats, Spain, 2011*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(6): p. 976-8.
116. Ytrehus, B., et al., *Tick-borne encephalitis virus and louping-ill virus may co-circulate in Southern Norway*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2013. **13**(10): p. 762-8.
117. Gao, G.F., et al., *Sequencing and antigenic studies of a Norwegian virus isolated from encephalomyelitic sheep confirm the existence of louping ill virus outside Great Britain and Ireland*. Journal of General Virology, 1993. **74**(1): p. 109-114.
118. Gilbert, L., et al., *Role of small mammals in the persistence of Louping-ill virus: field survey and tick co-feeding studies*. Med Vet Entomol, 2000. **14**(3): p. 277-82.
119. Timoney, P.J., et al., *Encephalitis caused by louping ill virus in a group of horses in Ireland*. Equine Vet J, 1976. **8**(3): p. 113-7.
120. Jeffries, C.L., et al., *Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 5): p. 1005-14.
121. Reid, H.W., et al., *Transmission of louping-ill virus in goat milk*. Vet Rec, 1984. **114**(7): p. 163-5.
122. Brugère-Picoux, J., *Maladies des moutons*. France Agricole Editions, 2004.

123. Davidson, M.M., H. Williams, and J.A. Macleod, *Louping ill in man: a forgotten disease*. J Infect, 1991. **23**(3): p. 241-9.
124. Charrel, R.N., et al., *Tick-borne virus diseases of human interest in Europe*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(12): p. 1040-55.
125. Chastel, C., et al., *The isolation of Meaban virus, a new Flavivirus from the seabird tick Ornithodoros (Alectorobius) maritimus in France*. Arch Virol, 1985. **83**(3-4): p. 129-40.
126. Arnal, A., et al., *Circulation of a Meaban-like virus in yellow-legged gulls and seabird ticks in the western Mediterranean basin*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e89601.
127. Suk, J.E. and J.C. Semenza, *Future infectious disease threats to Europe*. Am J Public Health, 2011. **101**(11): p. 2068-79.
128. Waldenstrom, J., et al., *Migrating birds and tickborne encephalitis virus*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(8): p. 1215-8.
129. Kovalev, S.Y., et al., *Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 12): p. 2884-92.
130. McGuire, K., et al., *Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 5): p. 981-8.
131. Durand, B., et al., *Identification of hotspots in the European union for the introduction of four zoonotic arboviroses by live animal trade*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70000.
132. La Ruche, G., et al., *First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010*. Euro Surveill, 2010. **15**(39): p. 19676.
133. Rizzoli, A., et al., *West Nile virus circulation detected in northern Italy in sentinel chickens*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2007. **7**(3): p. 411-7.
134. Chaintoutis, S.C., et al., *Evaluation of a West Nile virus surveillance and early warning system in Greece, based on domestic pigeons*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2014. **37**(2): p. 131-41.
135. Bahuon, C., et al., *WNV epizootics in Camargue, France, 2015 and reinforcement of WNV surveillance and control networks*. O.I.E Bulletin épidémiologique 2016.
136. Chambers, T.J. and C.M. Rice, *Molecular biology of the flaviviruses*. Microbiol Sci, 1987. **4**(7): p. 219-23.
137. Lindenbach, B.D., et al., *Flaviviridae*. Fields virology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2013. **1**: p. 712-746.
138. Murray, K.O., E. Mertens, and P. Despres, *West Nile virus and its emergence in the United States of America*. Vet Res, 2010. **41**(6): p. 67.
139. Nowak, T., et al., *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, 1989. **169**(2): p. 365-76.
140. Stadler, K., et al., *Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8475-81.
141. Pierson, T.C. and M.S. Diamond, *Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection*. Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e12.
142. Bressanelli, S., et al., *Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation*. Embo j, 2004. **23**(4): p. 728-38.
143. Diamond, M.S., T.C. Pierson, and D.H. Fremont, *The structural immunology of antibody protection against West Nile virus*. Immunol Rev, 2008. **225**: p. 212-25.
144. Nybakken, G.E., et al., *Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody*. Nature, 2005. **437**(7059): p. 764-9.
145. Crill, W.D. and G.J. Chang, *Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13975-86.
146. Metz, S.W. and G.P. Pijlman, *Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system*. J Invertebr Pathol, 2011. **107** Suppl: p. S16-30.

147. Seligman, S.J. and D.J. Bucher, *The importance of being outer: consequences of the distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein E*. Trends Microbiol, 2003. **11**(3): p. 108-10.
148. Sanchez, M.D., et al., *Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus*. Virology, 2005. **336**(1): p. 70-82.
149. Beasley, D.W. and A.D. Barrett, *Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 13097-100.
150. Heinz, F.X. and K. Stiasny, *Flaviviruses and their antigenic structure*. J Clin Virol, 2012. **55**(4): p. 289-95.
151. Falgout, B. and L. Markoff, *Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum*. J Virol, 1995. **69**(11): p. 7232-43.
152. Winkler, G., et al., *Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer*. Virology, 1988. **162**(1): p. 187-96.
153. Scaturro, P., et al., *Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins*. PLoS Pathog, 2015. **11**(11): p. e1005277.
154. Mackenzie, J.M., M.K. Jones, and P.R. Young, *Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication*. Virology, 1996. **220**(1): p. 232-40.
155. Muylaert, I.R., et al., *Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence*. Virology, 1996. **222**(1): p. 159-68.
156. Chung, K.M., et al., *Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis and clearance of West Nile Virus-infected cells*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 9551-5.
157. Muller, D.A. and P.R. Young, *The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker*. Antiviral Res, 2013. **98**(2): p. 192-208.
158. Melian, E.B., et al., *NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness*. J Virol, 2010. **84**(3): p. 1641-7.
159. Rastogi, M., N. Sharma, and S.K. Singh, *Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein*. Virol J, 2016. **13**: p. 131.
160. Mackenzie, J.M., et al., *Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A*. Virology, 1998. **245**(2): p. 203-15.
161. Falgout, B., et al., *Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2467-75.
162. Amberg, S.M., et al., *NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3794-802.
163. Lin, C., et al., *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, 1993. **67**(4): p. 2327-35.
164. Wengler, G. and G. Wengler, *The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity*. Virology, 1993. **197**(1): p. 265-73.
165. Ramanathan, M.P., et al., *Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway*. Virology, 2006. **345**(1): p. 56-72.
166. Puig-Basagoiti, F., et al., *A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis*. Virology, 2007. **361**(1): p. 229-41.
167. Dong, H., B. Zhang, and P.Y. Shi, *Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target*. Antiviral Res, 2008. **80**(1): p. 1-10.

168. Wang, T., et al., *Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1366-73.
169. Davis, C.W., et al., *West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1290-301.
170. Bogachek, M.V., et al., *Immunochemical and single molecule force spectroscopy studies of specific interaction between the laminin binding protein and the West Nile virus surface glycoprotein E domain II*. J Mol Recognit, 2008. **21**(1): p. 55-62.
171. Chu, J.J. and M.L. Ng, *Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54533-41.
172. Lim, P.Y., et al., *Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo*. J Virol, 2011. **85**(10): p. 5197-201.
173. Johnston, L.J., G.M. Halliday, and N.J. King, *Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(3): p. 560-8.
174. Suthar, M.S., M.S. Diamond, and M. Gale, Jr., *West Nile virus infection and immunity*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(2): p. 115-28.
175. Wang, S., et al., *Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 2084-91.
176. Wang, P., et al., *Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile virus entry into the brain*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 8978-85.
177. Verma, S., et al., *Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor*. Virology, 2010. **397**(1): p. 130-8.
178. Cho, H. and M.S. Diamond, *Immune responses to West Nile virus infection in the central nervous system*. Viruses, 2012. **4**(12): p. 3812-30.
179. Samuel, M.A., et al., *Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17140-5.
180. Xiao, S.Y., et al., *West Nile virus infection in the golden hamster (Mesocricetus auratus): a model for West Nile encephalitis*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(4): p. 714-21.
181. Samuel, M.A., J.D. Morrey, and M.S. Diamond, *Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis*. J Virol, 2007. **81**(6): p. 2614-23.
182. Donadieu, E., et al., *Comparison of the neuropathology induced by two West Nile virus strains*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84473.
183. Gamino, V. and U. Höfle, *Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review*. Veterinary research, 2013. **44**(1): p. 39.
184. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 8-32.
185. Shrestha, B., et al., *Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5338-48.
186. Donnelly, R.P. and S.V. Kotenko, *Interferon-lambda: a new addition to an old family*. J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(8): p. 555-64.
187. Arjona, A., et al., *Innate immune control of West Nile virus infection*. Cell Microbiol, 2011. **13**(11): p. 1648-58.
188. Martinez-Gil, L., et al., *Identification of small molecules with type I interferon inducing properties by high-throughput screening*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49049.
189. Daffis, S., et al., *Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10349-58.
190. Town, T., et al., *Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 242-53.
191. Kawai, T. and S. Akira, *Innate immune recognition of viral infection*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 131-7.

192. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
193. Baum, A., R. Sachidanandam, and A. Garcia-Sastre, *Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(37): p. 16303-8.
194. Fredericksen, B.L., et al., *Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 609-16.
195. Keam, S.J. and R.S. Cvetkovic, *Peginterferon-alpha-2a (40 kD) plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C mono-infection*. Drugs, 2008. **68**(9): p. 1273-317.
196. Bergman, S.J., M.C. Ferguson, and C. Santanello, *Interferons as therapeutic agents for infectious diseases*. Infect Dis Clin North Am, 2011. **25**(4): p. 819-34.
197. Keller, B.C., et al., *Resistance to alpha/beta interferon is a determinant of West Nile virus replication fitness and virulence*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9424-34.
198. Toporovski, R., M.P. Morrow, and D.B. Weiner, *Interferons as potential adjuvants in prophylactic vaccines*. Expert Opin Biol Ther, 2010. **10**(10): p. 1489-500.
199. Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell, *Type I interferons keep activated T cells alive*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 521-30.
200. Daniels, B.P., et al., *Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals*. MBio, 2014. **5**(5): p. e01476-14.
201. Caignard, G., *Cartographie des interactions entre protéines virales codées par le gène P des Paramyxoviridae et protéines cellulaires*. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 7 – Denis Diderot, 2010.
202. Diamond, M.S., *Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000452.
203. Wilson, J.R., et al., *West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8262-71.
204. Flamand, M., *The flavivirus NS1 protein's mysteries unveiled?: (Comment on DOI 10.1002/bies.201400182)*. Bioessays, 2015. **37**(5): p. 472.
205. Scholle, F. and P.W. Mason, *West Nile virus replication interferes with both poly(I:C)-induced interferon gene transcription and response to interferon treatment*. Virology, 2005. **342**(1): p. 77-87.
206. Liu, W.J., et al., *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, 2006. **80**(5): p. 2396-404.
207. Munoz-Jordan, J.L., et al., *Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8004-13.
208. Wicker, J.A., et al., *A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice*. Virology, 2006. **349**(2): p. 245-53.
209. Laurent-Rolle, M., et al., *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, 2010. **84**(7): p. 3503-15.
210. Perwitasari, O., et al., *Inhibitor of kappaB kinase epsilon (IKK(epsilon)), STAT1, and IFIT2 proteins define novel innate immune effector pathway against West Nile virus infection*. J Biol Chem, 2011. **286**(52): p. 44412-23.
211. Cacciotti, G., et al., *Variation in interferon sensitivity and induction between Usutu and West Nile (lineages 1 and 2) viruses*. Virology, 2015. **485**: p. 189-98.
212. Martina, B.E., et al., *DC-SIGN enhances infection of cells with glycosylated West Nile virus in vitro and virus replication in human dendritic cells induces production of IFN-alpha and TNF-alpha*. Virus Res, 2008. **135**(1): p. 64-71.

213. Silva, M.C., et al., *Differential activation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells by West Nile virus generated in different host cells*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13640-8.
214. Bai, F., et al., *A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus*. J Infect Dis, 2010. **202**(12): p. 1804-12.
215. Wang, T., et al., *IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2524-31.
216. Stoermer, K.A. and T.E. Morrison, *Complement and viral pathogenesis*. Virology, 2011. **411**(2): p. 362-73.
217. Mehlhop, E., et al., *Complement activation is required for induction of a protective antibody response against West Nile virus infection*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7466-77.
218. Mehlhop, E. and M.S. Diamond, *Protective immune responses against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1371-81.
219. Fuchs, A., et al., *The lectin pathway of complement activation contributes to protection from West Nile virus infection*. Virology, 2011. **412**(1): p. 101-9.
220. Chung, K.M., et al., *West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 19111-6.
221. Avirutnan, P., et al., *Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1*. J Exp Med, 2010. **207**(4): p. 793-806.
222. Shrestha, B. and M.S. Diamond, *Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8312-21.
223. Wang, Y., et al., *CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13323-34.
224. Prince, H.E., et al., *Development and persistence of West Nile virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4316-20.
225. Tardei, G., et al., *Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2232-9.
226. Dauphin, G. and S. Zientara, *West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development*. Vaccine, 2007. **25**(30): p. 5563-76.
227. Sanchez, M.D., et al., *The neutralizing antibody response against West Nile virus in naturally infected horses*. Virology, 2007. **359**(2): p. 336-48.
228. Oliphant, T., et al., *Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus*. J Virol, 2007. **81**(21): p. 11828-39.
229. Vogt, M.R., et al., *Poorly neutralizing cross-reactive antibodies against the fusion loop of West Nile virus envelope protein protect in vivo via Fcγ receptor and complement-dependent effector mechanisms*. J Virol, 2011. **85**(22): p. 11567-80.
230. Gould, E.A., et al., *Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice*. J Gen Virol, 1986. **67** (Pt 3): p. 591-5.
231. Schlesinger, J.J., M.W. Brandriss, and E.E. Walsh, *Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48*. J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2805-9.
232. Douglas, M.W., A.M. Kesson, and N.J. King, *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, 1994. **82**(4): p. 561-70.
233. Harty, J.T. and V.P. Badovinac, *Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 360-5.
234. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.

235. Samuel, M.A. and M.S. Diamond, *Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9349-60.
236. Asensio, V.C., et al., *Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro*. J Virol, 2001. **75**(15): p. 7067-77.
237. Lane, T.E., et al., *Dynamic regulation of alpha- and beta-chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 970-8.
238. McGavern, D.B., D. Homann, and M.B. Oldstone, *T cells in the central nervous system: the delicate balance between viral clearance and disease*. J Infect Dis, 2002. **186 Suppl 2**: p. S145-51.
239. Sitati, E.M. and M.S. Diamond, *CD4+ T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12060-9.
240. Lanteri, M.C., et al., *Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(11): p. 3266-77.
241. Suthar, M.S., et al., *IPS-1 is essential for the control of West Nile virus infection and immunity*. PLoS Pathog, 2010. **6**(2): p. e1000757.
242. Barzon, L., et al., *Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(9): p. 3411-3.
243. Linke, S., et al., *Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR*. J Virol Methods, 2007. **146**(1-2): p. 355-8.
244. De Filette, M., et al., *Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination*. Vet Res, 2012. **43**(1): p. 16.
245. Jimenez-Clavero, M.A., et al., *A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses*. J Vet Diagn Invest, 2006. **18**(5): p. 459-62.
246. Eiden, M., et al., *Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains*. J Vet Diagn Invest, 2010. **22**(5): p. 748-53.
247. Chao, D.Y., B.S. Davis, and G.J. Chang, *Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(2): p. 584-9.
248. Dyer, J., D.M. Chisenhall, and C.N. Mores, *A multiplexed TaqMan assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses*. J Virol Methods, 2007. **145**(1): p. 9-13.
249. Bunning, M.L., et al., *Experimental infection of horses with West Nile virus*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(4): p. 380-6.
250. Nagy, A., et al., *Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period*. Arch Virol, 2016. **161**(7): p. 1797-806.
251. Barzon, L., et al., *Excretion of West Nile virus in urine during acute infection*. J Infect Dis, 2013. **208**(7): p. 1086-92.
252. Alcon, S., et al., *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, 2002. **40**(2): p. 376-81.
253. Young, P.R., et al., *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, 2000. **38**(3): p. 1053-7.
254. Macdonald, J., et al., *NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 13924-33.
255. Ding, X.X., et al., *Development of a double antibody sandwich ELISA for West Nile virus detection using monoclonal antibodies against non-structural protein 1*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108623.

256. Lindsey, H.S., C.H. Calisher, and J.H. Mathews, *Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology*. J Clin Microbiol, 1976. **4**(6): p. 503-10.
257. Weingartl, H.M., et al., *Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum*. Can J Vet Res, 2003. **67**(2): p. 128-32.
258. Buckley, A., et al., *Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 10): p. 2807-17.
259. Yeh, J.Y., et al., *A diagnostic algorithm to serologically differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections and its validation in field surveillance of poultry and horses*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012. **12**(5): p. 372-9.
260. Pugachev, K.V., et al., *Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool*. Am J Trop Med Hyg, 2004. **71**(5): p. 639-45.
261. Pugachev, K.V., et al., *Construction and biological characterization of artificial recombinants between a wild type flavivirus (Kunjin) and a live chimeric flavivirus vaccine (ChimeriVax-JE)*. Vaccine, 2007. **25**(37-38): p. 6661-71.
262. Meister, T., et al., *Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria*. Vet Microbiol, 2008. **127**(3-4): p. 237-48.
263. Holden, P., D. Muth, and R.B. Shriner, *Arbovirus hemagglutinin-inhibition in avian sera: inactivation with protamine sulfate*. Am J Epidemiol, 1966. **84**(1): p. 67-73.
264. Koraka, P., et al., *Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA*. Microbes Infect, 2002. **4**(12): p. 1209-15.
265. Niedrig, M., et al., *Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation*. J Virol Methods, 2007. **139**(1): p. 103-5.
266. Alonso-Padilla, J., et al., *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of West Nile virus infection based on a recombinant envelope protein produced in Trichoplusia ni larvae*. J Virol Methods, 2010. **166**(1-2): p. 37-41.
267. Niedrig, M., et al., *First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection*. BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 72.
268. Khatibzadeh, S.M., et al., *West Nile virus-specific immunoglobulin isotype responses in vaccinated and infected horses*. Am J Vet Res, 2015. **76**(1): p. 92-100.
269. Cleton, N.B., et al., *A Serological Protein Microarray for Detection of Multiple Cross-Reactive Flavivirus Infections in Horses for Veterinary and Public Health Surveillance*. Transbound Emerg Dis, 2016.
270. Beck, C., et al., *A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 678084.
271. Chabierski, S., et al., *Distinguishing West Nile virus infection using a recombinant envelope protein with mutations in the conserved fusion-loop*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 246.
272. Mathengheng, L. and F.J. Burt, *Use of envelope domain III protein for detection and differentiation of flaviviruses in the Free State Province, South Africa*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2014. **14**(4): p. 261-71.
273. Ludolfs, D., M. Reinholz, and H. Schmitz, *Highly specific detection of antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus in humans using a domain III antigen and a sensitive immune complex (IC) ELISA*. J Clin Virol, 2009. **45**(2): p. 125-8.
274. Beasley, D.W., et al., *Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(6): p. 2759-65.
275. Barzon, L., et al., *Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015. **13**(3): p. 327-42.
276. Kitai, Y., et al., *Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate west nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(8): p. 1024-31.

277. Hall, R.A., et al., *Immunodominant epitopes on the NS1 protein of MVE and KUN viruses serve as targets for a blocking ELISA to detect virus-specific antibodies in sentinel animal serum*. J Virol Methods, 1995. **51**(2-3): p. 201-10.
278. Blitvich, B.J., et al., *Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west nile virus in multiple avian species*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(3): p. 1041-7.
279. Konishi, E., et al., *Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(11): p. 5087-93.
280. Kang, X., et al., *Development of an ELISA-array for simultaneous detection of five encephalitis viruses*. Virol J, 2012. **9**: p. 56.
281. Wang, D., et al., *A multiplex ELISA-based protein array for screening diagnostic antigens and diagnosis of Flaviviridae infection*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015. **34**(7): p. 1327-36.
282. Cleton, N.B., et al., *Spot the difference-development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(3): p. e0003580.
283. Koopmans, M., et al., *Profiling of humoral immune responses to influenza viruses by using protein microarray*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(8): p. 797-807.
284. van der Wal, F.J., et al., *Bead-based suspension array for simultaneous detection of antibodies against the Rift Valley fever virus nucleocapsid and Gn glycoprotein*. J Virol Methods, 2012. **183**(2): p. 99-105.
285. Chen, T.H., et al., *Development of a Luminex assay for the detection of swine antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus*. J Immunol Methods, 2013. **396**(1-2): p. 87-95.
286. Sanchez-Matamoros, A., et al., *Development of a Microsphere-based Immunoassay for Serological Detection of African Horse Sickness Virus and Comparison with Other Diagnostic Techniques*. Transbound Emerg dis, 2015.
287. Wong, S.J., et al., *Detection of human anti-flavivirus antibodies with a west nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 65-72.
288. Johnson, A.J., et al., *Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(5): p. 566-74.
289. Janusz, K.B., et al., *Laboratory testing practices for West Nile virus in the United States*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(5): p. 597-9.
290. Wong, S.J., et al., *Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4217-23.
291. Balasuriya, U.B., et al., *Detection of antibodies to West Nile virus in equine sera using microsphere immunoassay*. J Vet Diagn Invest, 2006. **18**(4): p. 392-5.
292. Ng, T., et al., *Equine vaccine for West Nile virus*. Dev Biol (Basel), 2003. **114**: p. 221-7.
293. European Medicines Agency, *EPAR product information : Equip WNV* 2015.
294. Minke, J.M., et al., *Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge*. Arch Virol Suppl, 2004(18): p. 221-30.
295. El Garch, H., et al., *A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse*. Vet Immunol Immunopathol, 2008. **123**(3-4): p. 230-9.
296. Guy, B., et al., *Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses*. Vaccine, 2010. **28**(3): p. 632-49.
297. Venter, M., et al., *Inactivated West Nile Virus (WNV) vaccine, Duvaxyn WNV, protects against a highly neuroinvasive lineage 2 WNV strain in mice*. Vaccine, 2013. **31**(37): p. 3856-62.

298. Minke, J.M., et al., *Protection provided by a recombinant ALVAC((R))-WNV vaccine expressing the prM/E genes of a lineage 1 strain of WNV against a virulent challenge with a lineage 2 strain*. Vaccine, 2011. **29**(28): p. 4608-12.
299. Gray, T.J. and C.E. Webb, *A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus*. Int J Gen Med, 2014. **7**: p. 193-203.
300. Lecollinet, S., et al., *La fièvre West Nile, une maladie ancienne et singulièrement actuelle en France et en Europe*. Pratique vétérinaire équine 2014. **N° spécial**.
301. Luxon, B.A., et al., *Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C infection*. Clin Ther, 2002. **24**(9): p. 1363-83.
302. Samuel, M.A. and M.S. Diamond, *Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13350-61.
303. Morrey, J.D., et al., *West Nile virus-induced acute flaccid paralysis is prevented by monoclonal antibody treatment when administered after infection of spinal cord neurons*. J Neurovirol, 2008. **14**(2): p. 152-63.
304. Morrey, J.D., et al., *Humanized monoclonal antibody against West Nile virus envelope protein administered after neuronal infection protects against lethal encephalitis in hamsters*. J Infect Dis, 2006. **194**(9): p. 1300-8.
305. Shimoni, Z., et al., *Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(4): p. 759.
306. Hamdan, A., et al., *Possible benefit of intravenous immunoglobulin therapy in a lung transplant recipient with West Nile virus encephalitis*. Transpl Infect Dis, 2002. **4**(3): p. 160-2.
307. Paeshuyse, J., K. Dallmeier, and J. Neyts, *Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(6): p. 590-8.
308. De Clercq, E., *Chemotherapy of respiratory syncytial virus infections: the final breakthrough*. Int J Antimicrob Agents, 2015. **45**(3): p. 234-7.
309. Leyssen, P., et al., *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, 2005. **79**(3): p. 1943-7.
310. Ning, Q., et al., *Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3487-93.
311. Jeulin, H., et al., *Quel avenir pour la ribavirine en dehors de l'hépatite C?* Virologie, 2009. **13**(2): p. 83-92.
312. Kirsi, J.J., et al., *Broad-spectrum antiviral activity of 2-beta-D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide, a new antiviral agent*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. **24**(3): p. 353-61.
313. Crance, J.M., et al., *Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses*. Antiviral Res, 2003. **58**(1): p. 73-9.
314. Jordan, I., et al., *Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells*. J Infect Dis, 2000. **182**(4): p. 1214-7.
315. Anderson, J.F. and J.J. Rahal, *Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(1): p. 107-8.
316. Morrey, J.D., et al., *Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models*. Antivir Chem Chemother, 2004. **15**(2): p. 101-9.
317. Chowers, M.Y., et al., *Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(4): p. 675-8.
318. Qing, M., et al., *Characterization of dengue virus resistance to brequinar in cell culture*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(9): p. 3686-3695.
319. Lucas-Hourani, M., et al., *Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity*. PLoS Pathog, 2013. **9**(10): p. e1003678.

320. Tan, Y.H., J.S. Driscoll, and S.M. Mui, *Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors for the treatment of viral-mediated diseases*. 2005, Google Patents.
321. Diamond, M.S., *Progress on the development of therapeutics against West Nile virus*. Antiviral Res, 2009. **83**(3): p. 214-27.
322. Ng, C.Y., et al., *Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing*. Antiviral Res, 2007. **76**(3): p. 222-31.
323. Morrey, J.D., et al., *Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus*. Antiviral Res, 2002. **55**(1): p. 107-16.
324. Farias, K.J., P.R. Machado, and B.A. da Fonseca, *Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in Vero cells but not in C6/36 cells*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 282734.
325. Boonyasuppayakorn, S., et al., *Amodiaquine, an antimalarial drug, inhibits dengue virus type 2 replication and infectivity*. Antiviral Res, 2014. **106**: p. 125-34.
326. Zhu, Y.Z., et al., *Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway*. J Virol, 2012. **86**(24): p. 13407-22.
327. Delvecchio, R., et al., *Chloroquine inhibits Zika Virus infection in different cellular models*. bioRxiv, 2016: p. 051268.
328. Browning, D.J., *Pharmacology of chloroquine and hydroxychloroquine*, in *Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*. 2014, Springer. p. 35-63.
329. Titus, E.O., *Recent developments in the understanding of the pharmacokinetics and mechanism of action of chloroquine*. Ther Drug Monit, 1989. **11**(4): p. 369-79.
330. Khiar, S., *Etude de molécules antivirales originales ciblant les fonctions cellulaires et la réponse immunitaire innée*. Université Paris Diderot, 2016. **Thèse de Doctorat**.
331. Dupont-Rouzeyrol, M., et al., *Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(2): p. 381-2.
332. Fontenille, D., et al., *Facteurs entomologiques d'émergence de Chikungunya et d'arboviroses humaines à La Réunion*. 2011.
333. Niebylski, M.L., et al., *Blood hosts of Aedes albopictus in the United States*. J Am Mosq Control Assoc, 1994. **10**(3): p. 447-50.
334. Lambrechts, L., T.W. Scott, and D.J. Gubler, *Consequences of the expanding global distribution of Aedes albopictus for dengue virus transmission*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(5): p. e646.
335. Vanhomwegen, J., *Approches moléculaires et sérologiques appliquées à la détection et à la caractérisation des pathogènes émergents et des infections associées*. Thèse de Doctorat Université Paris Diderot, 2013.
336. Despres, P., S. Paulous, and E. Crublet, *Procédé à base de mgmt permettant d'obtenir une expression élevée de protéines recombinées*. 2012, Google Patents.
337. Debing, Y., J. Neyts, and L. Delang, *The future of antivirals: broad-spectrum inhibitors*. Curr Opin Infect Dis, 2015. **28**(6): p. 596-602.
338. Lucas-Hourani, M., et al., *High-throughput screening for broad-spectrum chemical inhibitors of RNA viruses*. J Vis Exp, 2014(87).
339. OIE, *West Nile fever*, in *OIE Terrestrial Manual*. 2008. p. 377-385.
340. Pastorino, B., et al., *Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses*. J Virol Methods, 2005. **124**(1-2): p. 65-71.
341. Yang, D.K., et al., *TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus*. J Vet Sci, 2004. **5**(4): p. 345-51.
342. REED, L.J. and H. MUENCH, *A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS*. American Journal of Epidemiology, 1938. **27**(3): p. 493-497.
343. Brayton, C.F., *Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review*. The Cornell Veterinarian, 1986. **76**(1): p. 61-90.

344. Breard, E., et al., *Development of a Double-Antigen Microsphere Immunoassay for Simultaneous Group and Serotype Detection of Bluetongue Virus Antibodies*. Transbound Emerg Dis, 2016.
345. Gabassi, A., *Nouvelle approche Luminex appliquée au diagnostic sérologique multi-espèce des infections à flavivirus* Université de versailles Saint quentin en Yvelines 2014-2015. **Master 2**.
346. Laugier, C. and J. Tapprest, *Fréquence de la pathologie nerveuse et de ses différentes causes dans un effectif de 4319 chevaux autopsiés*. Bull. Epidémio., 2012. **5**(49): p. 9.
347. Bahuon, C., et al., *Les encéphalomyélites virales : quels risques pour les équidés français ?*. le nouveau Praticien vétérinaire, 2014. **9**(34): p. 12-20.
348. Shu, P.Y., et al., *Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination*. Vaccine, 2001. **19**(13-14): p. 1753-63.
349. Konishi, E. and T. Suzuki, *Ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis (JE) virus infections in vaccinated populations: evaluation of an inactivated JE vaccine by comparing the ratios with those in unvaccinated populations*. Vaccine, 2002. **21**(1-2): p. 98-107.
350. Kitai, Y., T. Kondo, and E. Konishi, *Non-structural protein 1 (NS1) antibody-based assays to differentiate West Nile (WN) virus from Japanese encephalitis virus infections in horses: effects of WN virus NS1 antibodies induced by inactivated WN vaccine*. J Virol Methods, 2011. **171**(1): p. 123-8.
351. Swinney, D.C. and J. Anthony, *How were new medicines discovered?* Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(7): p. 507-19.

ANNEXES 2 : Publications, posters et présentations

Articles parus dans des périodiques à comité de lecture

- 1) Vanhomwegen J., **Beck C.**, Desprès P., Figuerola A., García R., Lecollinet S., López-Roig M., Manuguerra JC and Serra-Cobo J. Circulation of zoonotic arboviruses in equine populations of Mallorca Island (Spain) **Vector-Borne and Zoonotic Diseases (accepted)**
- 2) Sánchez-Matamoros A, **Beck C**, Kukielka D, Lecollinet S, Blaise-Boisseau S, Garnier A, Rueda P, Zientara S, Sánchez-Vizcaíno JM. Development of a Microsphere-based Immunoassay for Serological Detection of African Horse Sickness Virus and Comparison with Other Diagnostic Techniques. **Transbound Emerg Dis.** 2016 Dec;63(6):e270-e277. doi: 10.1111/tbed.12340
- 3) Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, Lowenski S, Laloy E, Quenault H, Touzain F, Lucas P, Eraud C, Bahuon C, Zientara S, **Beck C**, Decors A. Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. **Emerg Infect Dis.** 2016 Dec;22(12):2225. doi: 10.3201/eid2212.161272.
- 4) Jurado-Tarifa E, Napp S, Lecollinet S, Arenas A, **Beck C**, Cerdà-Cuellar M, Fernández-Morente M, García-Bocanegra I. Monitoring of West Nile virus, Usutu virus and Meaban virus in waterfowl used as decoys and wild raptors in southern Spain. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2016 Dec;49:58-64. doi: 10.1016/j.cimid.2016.10.001.
- 5) Cleton NB, van Maanen K, Bergervoet SA, Bon N, **Beck C**, Godeke GJ, Lecollinet S, Bowen R, Lelli D, Nowotny N, Koopmans MP, Reusken CB. A Serological Protein Microarray for Detection of Multiple Cross-Reactive Flavivirus Infections in Horses for Veterinary and Public Health Surveillance. **Transbound Emerg Dis.** 2016 Sep 15. doi: 10.1111/tbed.12569.
- 6) C. Bahuon, C. Marcillaud-Pitel, L. Bournez, A. Leblond, **C. Beck**, J. Hars, I. Leparç-Goffart, G. L'Ambert, M.-C. Paty, L. Cavalerie, C. Daix, P. Tritz, B. Durand, S. Zientara & S. Lecollinet - West Nile virus epizootics in Camargue, France in 2015, and reinforcement of West Nile virus surveillance and control networks. **OIE, Bulletin épidémiologique** 2016 June
- 7) Karine Laroucau, Cécile Colaneri, Maryne Jaÿ, Yannick Corde, Antoine Drapeau, Benoit Durand, Stephan Zientara, **Cécile Beck** - European inter-laboratory ring trial to evaluate the complement fixation method for Glanders diagnosis. **Veterinary record** 2016 April 28
- 8) Sánchez-Matamoros A, Nieto-Pelegrín E, **Beck C**, Rivera-Arroyo B, Lecollinet S, Sailleau C, Zientara S, Sánchez-Vizcaíno JM.- Development of a Luminex-based DIVA assay for serological detection of African horse sickness virus in horses. **Transboundary Emerging Diseases** 2016 Avril
- 9) Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachier N, **Beck C**, Lecollinet S. - Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? **Epidemiology and Infection** 2016 Février

- 10) Lecollinet S, Leblond A, Troyano-Groux A, Marcillaud-Pitel C, Lallemand E, **Beck C**, Pradier S, Durand B, Tritz P, Zientara S. 2015. - La fièvre West Nile est de retour en France. **Le nouveau praticien vétérinaire équin**, 37 : 54-59.
- 11) Bournez L, **Beck C**, Troyano-Groux A, Lecollinet S. 2015.- Réémergence du virus West-Nile dans le Sud de la France en 2015 et épizootie équine. **Bulletin épidémiologique santé animale-alimentation**, N°72, p34-35
- 12) Jaeger A, Lecollinet S, **Beck C**, Bastien M, LE Corre M, Dellagi K, Pascalis H, Boulinier T, Lebarbenchon C.-Serological evidence for the circulation of flaviviruses in seabird populations of the western Indian Ocean. **Epidemiol Infect**, 2016. 144(3): p. 652-60
- 13) **Beck, C.**, P. Desprès, S. Paulou, J. Vanhomwegen, S. Lowenski, N. Nowotny, B. Durand, A. Garnier, S. Blaise-Boisseau, E. Guitton, T. Yamanaka, S. Zientara and S. Lecollinet - A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. **Biomed Res Int**, 2015: p. 678084.
- 14) Benoit Durand, Sylvie Lecollinet, **Cécile Beck**, Beatriz Martinez-López, Thomas Balenghien, Véronique Chevalier - Identification de zones à risque d'introduction de quatre arboviroses zoonotiques dans l'Union européenne par le commerce des animaux vivants. **Bulletin épidémiologique santé animale-alimentation**, N°66 ; Mars 2015
- 15) Bahuon Céline; Lecollinet Sylvie; and **Beck Cécile** - West Nile Virus Infection. **eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester**. May 2015; doi: 10.1002/9780470015902.a0023274
- 16) Céline Bahuon, Pierre Tritz, Stéphane Pronost, **Cécile Beck**, Agnès Leblond, Antonin Tortereau, Muriel Couplier, Stéphane Zientara et Sylvie Lecollinet - Les encéphalomyélites virales : quel risque pour les équidés français ? **le Nouveau Praticien Vétérinaire**, vol9 N°34, Mai-Juin 2014
- 17) A. Zohaib, M. Saqib, **C. Beck**, M.H. Hussain, S. Lowenski, S. Levollinet, A. Sial, M. Nadeem Asi, M K. Mansoor, M. Saqalein, M. S. Sajid, K. Ashfaq, G. Muhammad, S. Cao- High prevalence of West Nile virus in equines from the two provinces of Pakistan. **Epidemiol Infect**, 2015. 143(9): p. 1931-5.
- 18) Lecollinet S, **Beck C**, Pradier S, Durand B, Tritz P, Leblond A, Zientara S. 2014.- La fièvre West Nile, une maladie ancienne et singulièrement actuelle en France et en Europe. **Pratique Vétérinaire Equine, numéro spécial Infectiologie**, Octobre 2014
- 19) **Beck C**, Dumas I, Zientara S, Lecollinet S. 2014 - Encéphalites équines « exotiques » : restez vigilants. **Pratique Vétérinaire Equine, numéro spécial Infectiologie**, Octobre 2014
- 20) Serafeim C. Chaintoutisa, Chrysostomos I. Dovasa, Maria Papanastassopoulou , Sandra Gewehr, Kostas Danis, **Cécile Beck**, Sylvie Lecollinet, Vasilis Antalisb ,Stella Kalaitzopoulou, Takis Panagiotopoulosc, Spiros Mourelatos , Stéphane Zientara, Orestis Papadopoulos - Evaluation of a West Nile virus surveillance and early warning system in Greece, based on domestic pigeons" **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** ; Janvier 2014 CIMID-D-13-00108R2
- 21) **Cécile Beck** , Miguel Angel Jimenez Clavero , Agnès Leblond , Benoît Durand , Norbert Nowotny , Isabelle Leparç-Goffart , Stéphane Zientara , Elsa Jourdain and Sylvie Lecollinet - Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West

Nile Disease; 2013, 10- *International Journal of Environmental Research and Public Health* ; doi:10.3390

22) Benoit Durand, Sylvie Lecollinet, **Cécile Beck**, Beatriz Martínez-López, Thomas Balenghien, Véronique Chevalier - Identification of hotspots in the European Union for the introduction of four zoonotic arboviroses by live animal trade. *Plos One* ; Juin 2013

23) **Beck Cécile**, Lecollinet Sylvie et Zientara Stéphan - Le virus West Nile: endémisation en Méditerranée et extension à de nouvelles régions dans les Balkans. *Bulletin épidémiologique Santé animale-alimentation*, Décembre 2013

Articles sans comité de lecture

1) **Cécile Beck**, Anouk Decors, Cyril Eraud, Jean-Yves Chollet, Hélène Quenault, Pierrick Lucas, Yannick Blanchard, Christine Manson, Elsa Jordain, Sylvie Lecollinet - Le virus Usutu fait son apparition en France en 2015 *Lettre Sagir* Avril 2016

2) Tritz P, Leblond A, **Beck C**, **Lecollinet S**. 2016.- Épizootie d'encéphalo-myélites due au virus du Nil occidental (virus West Nile) en Camargue en 2015. *Bulletin RESPE* °37

3) **Beck C**, Bournez L, Tapprest J, Foucher N, Leblond A, Laloy E, Garcia P, Ecolivet B, Lowenski S, Poux A, Troyano-Groux A, Tritz P, Bahuon C, Zientara S, Lecollinet S. 2016.- Le virus West Nile fait sa réapparition dans le sud Est de la France. *Semaine Vétérinaire*. 1657 :32-33

4) Lecollinet Sylvie, Pradier Sophie, **Beck Cécile**, Durand Benoît, Leblond Agnès, Zientara Stéphan - Emergence et réémergence du virus West Nile: sources et détection, *AEEMA*, Novembre 2013

Poster

1) **Beck C.**, Desprès P, Lowenski S, Garnier A, Zientara S, Lecollinet S - "Breakthrough in serological surveillance: the use of multiplex microsphere immunoassays for the differentiation of antibody reactions against close flaviviruses" , **ICAHS 2eme congrès international sur la surveillance des maladies animales**, La Havane Cuba, 7-9 mai 2014.

2) **Beck C.**, Lecollinet S., Olive MM², Ravaomanana J., Lowenski S , Meenowa D, Jaumally M.R. , Melanie J. Rakotoharinome M, Roger M. ⁷, Zientara S., Heraud J.M. et Cardinale E. - « Les flavivirus circulants dans l'Océan Indien: un défi pour le diagnostic sérologique » **Ier Forum international de veille sanitaire et réponses en territoires insulaires** – 11-13/06 2013- Ile de la Réunion

3) N. Berthet, S. Lowenski, **C. Beck**, R. Bergaoui, A. Leon, A. Hans, D. Gaudaire, S. Pronost, G. Fortier, PH Pitel, L. Legrand, A. Gessain, J-C. Manuguerra, S. Lecollinet, S. Zientara. 2013. - Les puces à ADN de reséquençage à haute densité : un outil moléculaire pour l'investigation des syndromes neurologiques d'étiologies inconnues chez les équidés. Journées francophones de virologie, **Institut Pasteur**, Paris, 18-19 avril 2013.

Présentation orale

- 1) **Cécile Beck**, Philippe Desprès, Sylvie Paulous, Jessica Vanhomwegen, Steeve Lowenski, Norbert Nowotny Benoit Durand, Annabelle Garnier, Sandra Blaise-Boisseau, Edouard Guitton, Takashi Yamanaka, Stéphan Zientara and Sylvie Lecollinet - A high-performance multiplex immunoassay for serodiagnosis of flavivirus-associated neurological diseases in horses **IEIDC X** Argentina Buenos Aires, Argentina April 4-8, 2016
- 2) **Beck, Cécile**. "Nouvelles Approches Diagnostiques Des Infections À Flavivirus Chez Le Cheval " In **Journées des doctorants de l'IFCE**. Paris, 2016.
- 3) **Cécile Beck**, Philippe Desprès, Stéphan Zientara and Sylvie Lecollinet - The Luminex Microsphere immunoassay, a technologic innovation for the serological diagnosis of flavivirus infections **Epizone** 2014 meeting-Copenhagen-September 24-25 th 2014
- 4) **Beck C.**, Desprès P. ,Zientara S. , Lecollinet S. - Méthode de diagnostic sérologique multiplexe des infections équine à flavivirus chez le cheval. **Colloque CIFMA , 6eme colloque international Francophone de Microbiologie animale**, Toulouse, France, 15et 16 Mai 2014.
- 5) **Beck C.**, Desprès P. ,Zientara S. , Lecollinet S. - Diagnostic sérologique des flavivirus équins par méthode sérologique multiplexe. **Journée Francophone virologie** , Paris 6-7 mars 2014

Titre : Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre les *flavivirus* neurotropes en médecine vétérinaire

Mots clés : Flavivirus, virus West Nile, réactions croisées, diagnostic sérologique, méthode d'immuno-essais, antiviraux

Les *flavivirus* ayant un impact en médecine vétérinaire sont largement distribués dans le monde (à l'exemple de la fièvre West Nile (WNV) présente sur les cinq continents ou de l'Encéphalite japonaise (EJ) en Asie) et sont responsables de maladies à dominante neurologique chez l'homme et/ou le cheval.

La virémie étant généralement brève lors de ces infections virales, les méthodes de diagnostic utilisées sont essentiellement sérologiques. Or le chevauchement fréquent des aires de répartition des *flavivirus* complique le diagnostic sérologique. En effet, des réactions sérologiques croisées entre *flavivirus* sont observées lors de l'utilisation de méthodes de diagnostic usuelles telles que l'ELISA et l'immunofluorescence (IF). Les résultats sérologiques doivent donc être confirmés par la méthode fastidieuse de séroneutralisation (SNT) virale avec les différents *flavivirus* existants dans la région. De plus, le risque d'émergence sur un territoire donné de nouveaux *flavivirus*, comme le virus Zika au Brésil ou en Amérique du Nord, ne peut être exclu.

Nous avons donc développé dans la première partie de ce travail une nouvelle stratégie de diagnostic sérologique multiplexe à l'aide de la méthode d'immuno-essai (MIA) sur billes. Sachant que la glycoprotéine d'enveloppe soluble (sE) des *flavivirus* est divisée en 3 domaines (D) structuraux, DI, DII et DIII et que les épitopes du DIII sont spécifiques de chaque *flavivirus*, des protéines EDIII recombinantes de différents *flavivirus* d'intérêt ont été synthétisées en système d'expression *Drosophila* S2 et leur antigénicité a été testée sur sérums équins et ovins.

Nous avons obtenu des résultats très encourageants en démontrant

que l'utilisation des rEDIII, associée à la capacité de multiplexage de la méthode MIA, apparaît comme une réponse adaptée au défi du diagnostic sérologique des infections à *flavivirus*.

Nous avons en outre utilisé la même méthode de multiplexage mais avec des antigènes NS1 du WNV pour mettre en place un test DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) permettant de différencier les chevaux infectés par le WNV des chevaux vaccinés avec un vaccin recombinant WNV.

Un autre écueil en médecine vétérinaire est le traitement des affections à *flavivirus*. En effet l'arsenal thérapeutique est limité et le traitement est avant tout symptomatique. Nous avons dans la seconde partie de ce travail testé *in vitro* une molécule antivirale à large spectre, le sr1057 sur nos virus d'intérêt (WNV et JEV).

Cette molécule qui provient d'une stratégie de criblage développée par l'Institut Pasteur a probablement pour cible la cellule de l'hôte car elle est capable d'inhiber des virus très différents, à génome à ARN de polarité positive ou négative et ADN.

Les résultats que nous avons obtenus avec ce composé sont en demi-teinte pour les *flavivirus* testés avec une efficacité démontrée pour le JEV mais plus modeste pour le WNV. Ils n'excluent cependant pas une possible utilisation de cet antiviral en médecine vétérinaire équine car une activité inhibitrice *in vitro* sur les virus de l'Herpes équin de type I et de l'artérite virale a été confirmée par d'autres collaborateurs.

Title : New diagnostic and therapeutic strategies against neurotropic flaviviruses in veterinary medicine

Keywords : Flavivirus, West Nile virus, cross-reactions, serological tests, microsphere immunoassays, antivirals

Abstract: *Flaviviruses* with a major impact in veterinary medicine are widely distributed (e.g. West Nile fever (WNV) has spread across the five continents and Japanese Encephalitis (JE) is reported in South-East Asia) and are mainly responsible for neurological diseases in humans and/or horses.

After *flavivirus* infection, viremia in mammal hosts is generally short and consequently indirect methods are mostly used to diagnose *flavivirus* infections. However, frequent spatial overlapping in their circulation areas renders the interpretation of serological assays difficult. Indeed, cross-reactions between *flaviviruses* are observed in rapid serological tests such as in ELISA and immunofluorescence assays (IFA). Serological assay results should thus be confirmed by the tedious comparative virus neutralization test (VNT) using a panel of viruses known to circulate in the area. Moreover, the risk of emergence of new *flaviviruses* such as reported recently with the Zika virus in Brazil or in North America should be considered when studying *flavivirus* epidemiology.

In the first section, a new strategy aiming at improving the serological diagnosis of *flavivirus* infections was developed using the multiplexing capacity of microsphere immunoassays (MIA). The *flavivirus* soluble envelope (sE) glycoprotein ectodomain is composed of three domains (D), e.g. DI, DII and DIII, with EDIII containing virus-specific epitopes. Recombinant EDIIIs of different *flaviviruses* were synthesized in the *Drosophila* S2 expression system. The microspheres coupled with rEDIIIs were assayed with equine and ovine sera from natural and experimental *flavivirus* infections.

Very encouraging results have been obtained and this innovative multiplex immunoassay based on *flavivirus* rEDIIIs appears to be a powerful alternative to ELISAs and VNTs for veterinary diagnosis of *flavivirus*-related diseases. MIA with WNV nonstructural 1 protein were also implemented to differentiate Infected from Vaccinated Animals (DIVA). Such a DIVA approach was only successful when horses had been immunized with a recombinant canarypox vaccine, while horses receiving inactivated WNV vaccine developed immune responses close to the ones induced after natural infection.

Another pitfall in veterinary medicine is the lack of therapeutics for viral diseases and specifically for *flaviviruses*. The therapeutic arsenal is indeed rather limited and animals are generally administered supportive treatments only. In the second part, the results of the *in vitro* testing of a broad spectrum antiviral named sr1057 on WNV and JEV replication are presented. This chemical, identified from a unique screening strategy developed by Pasteur Institute, is probably targeting the host cell and was found to inhibit the replication of varied RNA and DNA viruses belonging to different virus families.

The sr1057 compound was not as efficient at inhibiting the replication of *flaviviruses* as for other RNA+ viruses, with a modest antiviral effect demonstrated for WNV and a higher efficacy on JEV. This antiviral presents however potentials for applications in equine veterinary medicine because it efficiently inhibited equine herpes virus-1 and equine arteritis virus *in vitro*, as clearly shown by other collaborators.

